



BÁRBARA ALVES DOS SANTOS

**DETECÇÃO DE ESTIRPES DO *Potato virus Y*
(PVY) EM PLANTAS COM INFECÇÕES
SIMPLES E MISTAS**

LAVRAS – MG

2014

BÁRBARA ALVES DOS SANTOS

**DETECÇÃO DE ESTIRPES DO *Potato virus Y* (PVY) EM PLANTAS
COM INFECÇÕES SIMPLES E MISTAS**

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

Orientadora

Dra. Antonia dos Reis Figueira

LAVRAS – MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Santos, Bárbara Alves dos.

Detecção de estirpes do *Potato vírus Y*(PVY) em plantas com
infecções simples e mistas / Bárbara Alves dos Santos. – Lavras :
UFLA, 2014.

64 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Antonia dos Santos Figueira.

Bibliografia.

1. DAS-ELISA. 2. TAS-ELISA. 3. RT-PCR. 4. qRT-PCR. 5.
Vírus Y da batata. 6. Diagnose. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

CDD – 632.8

BÁRBARA ALVES DOS SANTOS

**DETECÇÃO DE ESTIRPES DO *Potato virus Y* (PVY) EM PLANTAS
COM INFECÇÕES SIMPLES E MISTAS**

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

APROVADA em 28 de Fevereiro de 2014

Dra. Suellen Bárbara Ferreira Galvino Costa UFLA

Dr. César Augusto Brasil Pereira Pinto UFLA

Dra. Antonia dos Reis Figueira
Orientadora

LAVRAS – MG

2014

*Aos meus pais e irmãos pelo amor, apoio e
paciência; pelo carinho e pelo abraço; por
vocês serem sempre o ombro que recebeu
minhas lágrimas e o sorriso que refletiu minhas
vitórias,*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir a conclusão de mais uma etapa em minha vida e por sempre me guiar, em minhas decisões diante dos obstáculos que encontro. Sei que o Senhor caminha sempre comigo, ainda que eu não o reconheça

Aos meus pais, Roselene e Antonio Carlos, pelo incentivo nos momentos difíceis e, principalmente, pelos conselhos e apoio incondicional às minhas decisões. Aos meus irmãos, Nicolás e Lucas, pelo carinho e, sobretudo, pela paciência.

Ao meu namorado, Giancarlo, pelo apoio quando pensei em vacilar; compreensão e companhia nos momentos que exigiam de mim mais força do que imaginava ter; e, principalmente, pela paciência nos momentos em que o cansaço me tomou.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, por conceder toda estrutura e reconhecimento para a minha formação profissional; e ao CNPq pela concessão da bolsa.

À Prof. Dra. Antonia, por todo o aprendizado e contribuição na minha formação profissional e por conceder todas as condições necessárias para a realização do projeto.

À toda equipe do Laboratório de Virologia, pelo convívio e por todo conhecimento que me proporcionaram durante esses anos que trabalhamos juntos.

Agradeço, especialmente, à Suellen e Priscilla pelo aprendizado, pela ajuda fundamental para o desenvolvimento e conclusão do trabalho, pelas noites trabalhando juntas no laboratório, pelas palavras de apoio e, principalmente, pela paciência;

À Thaís, Luciana, Nara, Danielle e Carzinho pela grande ajuda, apoio e amizade, essenciais para minha formação não apenas profissional, mas pessoal. Vocês são pessoas que quero ter sempre em minha vida.

A todos os meus amigos, especialmente aos Caminheiros de Emaús e à Equipe de Música, por estarem sempre comigo, fortalecendo-me quando acreditei que não conseguiria vencer esta etapa. Vocês foram para mim, mais que anjos, vocês também fazem parte dessa vitória! Sem vocês, eu, certamente, não conseguiria.

A alegria que comemoro hoje tem a participação de cada um de vocês, por isso, agradeço a Deus por colocá-los em meu caminho.

MUITO OBRIGADA!

*“Sede bendito, ó Deus, por tudo que me enviais. Sem a Vossa vontade nada
sucede debaixo do sol.”*

Diário, 1208 - Santa Faustina

RESUMO

O Potato virus Y (PVY) é atualmente, um dos vírus mais importantes da cultura da batata em todo mundo. Além da sua alta capacidade de disseminação no campo, o constante aparecimento de novas variantes genéticas tem dificultado a sua detecção e manejo no campo. Dentre os mecanismos que promovem essa variabilidade genômica, a recombinação é o principal deles, provavelmente, em razão da ocorrência de infecções mistas no campo. Neste trabalho, foram comparadas as técnicas de DAS e TAS-ELISA e RT-PCR multiplex, visando determinar a sua eficiência para diagnose e discriminação entre as principais estirpes que ocorrem no Brasil, PVY^O, PVY^{Wi} e PVY^{NTN}, em infecções simples e mistas. Para isso, plantas de *Nicotiana tabacum* cv. Turkish foram inoculadas com essas estirpes, individualmente e em combinações para gerar plantas com infecções mistas. Foram também desenvolvidas sondas para detecção e quantificação dessas estirpes por PCR em tempo real (qPCR). Também foram coletados 90 tubérculos provenientes de plantas de batata com suspeita de infecção por vírus e analisados por DAS e TAS-ELISA. Desses tubérculos, foram escolhidos 50 para análise por RT-PCR multiplex. As plantas de fumo inoculadas com cada uma dessas estirpes mostraram os sintomas esperados, variando de mosaico leve a necrose, de acordo com a estirpe. Entretanto, em todas as combinações em que o PVY^O foi inoculado junto com as estirpes necróticas, a planta de fumo não apresentou a necrose esperada, indicando uma predominância dos sintomas induzidos pela estirpe comum. Os testes sorológicos revelaram uma tendência de maior concentração das estirpes com sorologia O (PVY^O e PVY^{Wi}) quando a planta estava com infecção mista. O RT-PCR foi capaz de discriminar entre as três estirpes, apresentando os padrões de bandas específicos para cada uma delas. Dos 90 tubérculos testados por TAS-ELISA, cinco foram negativos, 11 foram positivos para a estirpe necrótica PVY^{NTN} e 74 para a estirpe comum e/ou Wilga, sendo 8 deles positivos para infecções mistas. A ocorrência de infecções mistas, aliada ao clima altamente favorável à multiplicação e disseminação do PVY, pode explicar a alta variabilidade genômica desse vírus derivada de recombinações entre isolados. Algumas das amostras apresentaram comportamento sorológico atípico e foram separados para investigações posteriores. As sondas e primers desenhados para cada uma das três estirpes mencionadas foram eficientes na detecção dessas por qPCR, tanto em infecções simples (*single*) como em infecções mistas (*multiplex*). Em decorrência da maior sensibilidade apresentada por essa técnica, essas sondas poderão ser posteriormente empregadas para detecção e quantificação dessas estirpes em plantas de batata infectadas.

Palavras-chave: DAS e TAS-ELISA. RT-PCR. qRT-PCR. *Potato virus Y*. PVY. Diagnose.

ABSTRACT

The Potato Virus Y (PVY) is currently one of the most important in potato cultures around the world. In addition to its high field dissemination capacity, the constant appearance of new genetic variants has made its detection and field management difficult. Among the mechanisms which promote this genomic variability, the recombination is the main one, probably because of the occurrence of mixed infections in the field. In this work, the DAS and TAS-ELISA and RT-PCR multiplex technique were compared, aiming at determining its efficiency for diagnosing and discriminating between the main strains occurring in Brazil, PVY^O, PVY^{Wi} and PVY^{NTN}, in simple and mixed infections. For this, *Nicotiana tabacum* cv. Turkish plants were inoculated with these strains, individually and in combination to generate plants with mixed infections. Probes were also developed for the detection and quantification of these strains by PCR in real time (qPCR). Ninety tubers derived from potato plants suspected of virus infection were collected and analyzed by RT-PCR multiplex. The plants inoculated with each of these strains presented the expected symptoms, ranging from light mosaic to necrosis, according to the strain. However, in all combinations in which the PVY^O was inoculated along with the necrotic strains, the plant did not present the expected necrosis, indicating a predominance of the symptoms induced by the common strain. The serological tests revealed a tendency of higher concentration of strains with O serology (PVY^O and PVY^{Wi}) when the plant presented mixed infection. The RT-PCR was capable of discriminating between the three strains, presenting the patterns of bands specific to each of them. Of the 90 tubers tested by TAS-ELISA, five were negative, 11 were positive for the PVY^{NTN} necrotic strain and 74 for the common and/or Wilga strain, with 8 being positive for mixed infections. The occurrence of mixed infections, allied to the climate highly favorable to the multiplication and dissemination of the PVY, may explain the high genomic variability of this virus derived from recombination between isolates. A few of the samples presented atypical serological behavior and were separated for posterior investigations. The probes and primers designed for each of the three strains mentioned were efficient for its detection by qPCR, either in simple (*single*) infections or in mixed (*multiplex*) infections. As a result of the higher sensitivity presented by this technique, these probes might, posteriorly, be employed for detection and quantification of these strains in infected potato plants.

Keywords: DAS and TAS-ELISA. RT-PCR. qRT-PCR. *Potato virus Y*. PVY. Diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sintomas apresentados pelas plantas de <i>N. tabacum</i> , 14 dias após a inoculação com as estirpes PVY ^{NTN} , PVY ^O e PVY ^{Wi} em infecções simples e mistas. (A) PVY ^{NTN} ; (B) PVY ^O ; (C) PVY ^{Wi} ; (D) PVY ^{NTN} + PVY ^O ; (E) PVY ^{NTN} + PVY ^{Wi} ; (F) PVY ^O + PVY ^{Wi} ; (G) PVY ^{NTN} +PVY ^O +PVY ^{Wi} ; (H) <i>mock</i>	35
Figura 2	Absorbâncias obtidas no teste sorológico TAS-ELISA com os anticorpos monoclonais IF5 e MAb2 da empresa Agdia, sete e 14 dias após a inoculação.....	38
Figura 3	Absorbâncias obtidas no teste sorológico TAS-ELISA com os anticorpos monoclonais SASA-N e SASA-O produzidos pela SASA, sete e 14 dias após a inoculação.....	39
Figura 4	Análise eletroforética dos produtos de PCR amplificados a partir do RNA de plantas de fumo inoculadas mecanicamente com uma ou mais estirpes. M: marcador 100pb; 2-3: PVY ^{NTN} ; 3-4: PVY ^O ; 5-6: PVY ^{Wi} ; 7-8: <i>mock</i> ; 9-10: PVY ^{NTN} +PVY ^O ; 11-12: PVY ^{NTN} +PVY ^{Wi} ; 13-14: PVY ^O +PVY ^{Wi} ; 15-16: PVY ^{NTN} +PVY ^O +PVY ^{Wi} ; 17: controle negativo.....	40
Figura 5	Detecção de estirpes de PVY por qPCR <i>singleplex</i> . (A) <i>Standard Curve</i> e (B) <i>Amplification Plot</i> para reações <i>singleplex</i> do PVY ^O	43
Figura 6	Detecção de estirpes de PVY por qPCR <i>singleplex</i> . (A) <i>Standard Curve</i> e (B) <i>Amplification Plot</i> para reações <i>singleplex</i> do PVY ^{NTN}	44
Figura 7	Detecção de estirpes de PVY por qPCR <i>singleplex</i> . (A) <i>Standard Curve</i> e (B) <i>Amplification Plot</i> para reações <i>singleplex</i> do PVY ^{Wi}	45
Figura 8	Detecção de estirpes de PVY por qPCR <i>multiplex</i> . (A) <i>Standard Curve</i> e (B) <i>Amplification Plote</i> para reações <i>multiplex</i> de detecção das estirpes PVY ^O , PVY ^{NTN} e PVY ^{Wi}	46
Figura 9	Análise eletroforética dos produtos de RT-PCR <i>multiplex</i> , obtidos com os primers desenvolvidos por Lorenzen et al. (2006). A: amostras 1 a 25; B: amostras 26 a 50.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Combinação de <i>primers</i> utilizados na técnica RT-PCR multiplex e tamanho do fragmento genômico esperado como produto da PCR para cada um dos variantes genéticos do <i>Potato virus Y</i> (PVY)31
Tabela 2	Sintomas induzidos pelas estirpes de PVY em infecções simples e mistas em plantas de fumo, 14 dias após a inoculação35
Tabela 3	Sequência de nucleotídeos dos <i>primers</i> e sondas desenvolvidos para a detecção de variantes genéticos do PVY por qRT-PCR42
Tabela 4	Caracterização sorológica de isolados de PVY presentes nos campos produtores de batata do Sul de Minas por TAS-ELISA com anticorpos monoclonais.....48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	A bataticultura no Brasil e no mundo	16
2.2	As doenças viróticas e a produção de batata	16
2.3	O Potato virus Y (PVY)	18
2.3.1	As estirpes do PVY e seus variantes	21
2.4	Deteção de estirpes e variantes do PVY	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	Obtenção dos isolados e plantas com infecção mista	29
3.2	Deteção das estirpes de PVY por DAS e TAS-ELISA	29
3.3	Deteção das estirpes de PVY por RT-PCR	30
3.4	Deteção das estirpes de PVY por RT-PCR em tempo real	31
3.4.1	Síntese do cDNA e qPCR	31
3.4.2	Curva padrão	32
3.5	Caracterização sorológica e molecular de isolados de PVY presentes nas lavouras de batata do sul de Minas Gerais	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	Avaliação dos sintomas apresentados pelas plantas inoculadas mecanicamente com uma ou mais estirpes	34
4.2	Deteção das estirpes de PVY por TAS-ELISA e RT-PCR multiplex nas plantas inoculadas mecanicamente com uma ou mais estirpes	36
4.3	Desenvolvimento de sondas e <i>primers</i> para deteção de PVY por qRT-PCR	41
4.4	Caracterização sorológica e molecular de isolados de PVY presentes nas lavouras de batata do sul de Minas Gerais	47
5	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

O *Potato virus Y* (PVY), pertence à família Potyviridae, gênero *Potyvirus*, do qual é o membro tipo. A partícula viral é alongada, filamentosa e flexível, com dimensões de aproximadamente 730nm x 11nm e o seu genoma é constituído por um RNA de fita simples, senso positivo (ssRNA+), de 9,7Kb (DE BOKX; HUTTINGA, 1981; SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994). A transmissão ocorre principalmente por meio do afídeo *Myzus persicae* de modo não persistente, ou estiletar. Além disso, o vírus também pode ser transmitido mecanicamente ou por enxertia. Os principais sintomas causados pelo PVY e demais *Potyvirus* são mosaico, mosqueado, clorose, necrose e deformação foliar (SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994), os quais podem ser fortemente agravados quando em infecções mistas (PRUSS et al., 1997).

De modo geral, o PVY é classificado em cinco estirpes com base na reação a genes de resistência específicos e nos sintomas induzidos em *Nicotiana tabacum* (DE BOKX; HUTTINGA, 1981; SINGH et al., 2008). As estirpes PVY^O e PVY^C induzem reação de hipersensibilidade (HR) contra os genes *Ny_{ibr}* e *Nc*, respectivamente (COCKERHAM, 1970; JONES, 1990) e não induzem necrose em *N. tabacum*. O PVY^N induz necrose das nervuras em fumo e não induz HR em batata (JONES, 1990; VALKONEN, 2007). A estirpe PVY^Z induz HR contra um gene hipotético *Nz* e não induzem necrose em fumo (JONES, 1990); já o PVY^E não induz HR em batata (KERLAN; LE ROMANCER, 1999). Sorologicamente, as estirpes são divididas em dois grandes grupos: o tipo N, que abrange a estirpe PVY^N; e tipo O, que abrange as demais estirpes (GLAIS et al., 1996; HEUVEL et al., 1994) bem como o hipotético gene *Nz*.

Além das estirpes genéticas, têm sido encontradas diversas estirpes variantes do PVY, que resultam da recombinação entre fragmentos genômicos de estirpes diferentes. Atualmente, as principais estirpes recombinantes, no

Brasil, são PVY^{NTN} e PVY^{Wi}, ambas surgidas por diferentes combinações entre a estirpe necrótica (PVY^N) e a estirpe comum (PVY^O). A estirpe NTN induz necrose em *N. tabacum*, apresenta sorologia do tipo N e é capaz de induzir sintomas de PTNRD (*potato tuber necrosis ringspot disease*) em tubérculos de batata (PICHE et al., 2004), enquanto que a estirpe ‘Wilga’ (Wi) induz necrose leve em fumo, mas apresenta sorologia do tipo O (CHRZANOWSKA, 1991; SINGH et al., 2008). Entretanto, diversos variantes genéticos dessas estirpes têm sido encontrados no Brasil (GALVINO-COSTA et al., 2012a, 2012b), indicando que os processos biológicos que levam ao aparecimento de novos variantes devem ser bastante dinâmicos.

Não se sabe ao certo se as plantas de batata que têm sido encontradas infectadas com o vírus Y no campo apresentam infecções simples ou mistas, uma vez que as técnicas empregadas podem não apresentar a sensibilidade necessária para detectar ambas as estirpes, caso uma delas esteja em concentrações muito inferiores. Conhecer a frequência com que essas infecções múltiplas ocorrem no campo poderia explicar, por exemplo, a causa da alta variabilidade do PVY nos campos produtores do Brasil.

A detecção de estirpes de PVY tem sido realizada, principalmente, por meio de técnicas sorológicas, com anticorpos monoclonais que distinguem os sorotipos N e O, e moleculares, utilizando-se primers específicos para cada estirpe, especialmente para as junções de recombinação (GALVINO-COSTA et al., 2012b). Entretanto, nem sempre a separação entre essas estirpes é uma tarefa fácil. Diversos grupos de pesquisa têm se dedicado ao desenvolvimento de técnicas que proporcionem um diagnóstico rápido e confiável, especialmente nos casos de infecções por duas ou mais estirpes (BOONHAM et al., 2002; CROSSLIN et al., 2002; LORENZEN et al., 2006; NIE; SINGH, 2002, 2003).

Mesmo sendo bem mais sensível que o DAS-ELISA, o RT-PCR pode ainda ser limitado na detecção de quantidades mínimas de diferentes estirpes,

que podem ocorrer em infecções mistas. Para superar essa limitação, o uso do PCR em tempo real (qPCR) tem se apresentado como uma alternativa bastante atraente. Além de ser mais sensível, essa técnica permite fazer a quantificação de cada uma das estirpes na planta, fornecendo dados importantes a respeito do comportamento dos diferentes variantes de PVY em infecções simples e mistas, e das possíveis interações entre eles.

Visando a desenvolver uma metodologia eficiente para a detecção dos diferentes isolados de PVY em infecções simples e mistas, no presente trabalho compararam-se as técnicas DAS e TAS-ELISA com RT-PCR na análise de amostras de batata infectadas, coletadas em campos de produção do Sul de Minas e também plantas de fumo artificialmente infectadas com as estirpes que têm sido mais frequentemente encontradas no campo, a estirpe comum (PVY^O) NTN e Wilga, em infecções simples e mistas. Foram também desenvolvidas sondas para a diagnose dessas estirpes em infecções simples e mistas por meio da técnica de PCR em tempo real.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A bataticultura no Brasil e no mundo

A batata (*Solanum tuberosum*) é um dos principais alimentos consumidos no mundo, no entanto, tal consumo ocorre de forma bastante diferenciada em diferentes regiões. Devido às suas características nutricionais, bem como ao seu baixo custo, a batata vem se apresentando como uma importante alternativa no combate à fome nos países mais pobres (ANUÁRIO..., 2011). Segundo dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO (2013), a produção mundial de batata, no ano de 2012, girou em torno de 368 milhões de toneladas, sendo que a área plantada corresponde a 19,3 milhões de hectares. Além disso, tem-se observado uma queda na produção dos países desenvolvidos e um notável crescimento na produção da batata nos países em desenvolvimento, justificada pelos incentivos governamentais (ANUÁRIO..., 2011).

A produção brasileira, em 2013, foi de cerca de 3,5 milhões de toneladas, com destaque para o estado de Minas Gerais, o maior produtor do país, com 1,26 milhões de toneladas; seguido pelo estado de São Paulo, com 567 mil toneladas de batata (ANUÁRIO..., 2014; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2013).

2.2 As doenças viróticas e a produção de batata

As viroses constituem um dos principais problemas fitossanitários da cultura da batata, que pode ser agravado pelo abandono da prática de utilização de tubérculos-sementes de alta qualidade. As perdas na produção causadas por

vírus em batata são muito variáveis, em função das diferentes condições de crescimento das plantas e os métodos de análise utilizados (ÁVILA et al., 2009).

A propagação da batata é feita por meio de tubérculos-semente, os quais podem transmitir diversas doenças viróticas da lavoura de origem para a que está sendo formada. Dessa forma, as perdas causadas pelas viroses, aliadas àquelas causadas pelos outros patógenos, não estão restritas apenas ao ano em que ocorreu a infecção primária. Tais perdas aumentam progressivamente todas as vezes em que tubérculos-semente de lavouras infectadas são utilizados (HUANG; YAN; DIN, 2009; KHURANA, 2004; MORTENSEN et al., 2010).

As doenças viróticas são responsáveis por grandes perdas na bataticultura no Brasil e no mundo. No passado, o *Potato leafroll virus* (PLRV) era considerado o vírus de maior importância para a cultura da batata, ocasionando perdas de até 50% da produtividade da lavoura (CAMARA; CUPERTINO; FILGUEIRA, 1986). Atualmente, o *Potato virus Y* (PVY) caracteriza-se como o vírus mais importante para a bataticultura nacional e mundial, sendo responsável por prejuízos similares ou superiores aos dos vírus de grande importância no passado (AVILA et al., 2009; FIGUEIRA, 1999). Na década de 90, o PVY acarretou infecções que variaram de 30 a 100% do campo, dependendo das estirpes presentes nas plantas, da cultivar envolvida, da idade da planta infectada, bem como das condições ambientais às quais estavam submetidas (SOUZA-DIAS, 2001).

Devido à grande importância econômica das viroses da batata, o manejo adequado é fundamental, baseado, principalmente, no princípio de exclusão do patógeno, ou seja, impedindo a contaminação dos estoques de tubérculos-sementes. Medidas efetivas para o manejo adequado das doenças viróticas incluem quarentena, erradicação, controle de vetores, certificação de sementes, etc. (FIGUEIRA, 2000; KHUARANA, 2004).

Segundo Mortensen et al. (2010), a importância das doenças viróticas na agricultura também tem feito com que os vírus da batata sejam amplamente estudados e a maioria das espécies caracterizadas em nível molecular, a fim de investigar as relações entre as espécies.

2.3 O Potato virus Y (PVY)

O vírus Y da batata, ou PVY, pertence ao gênero *Potyvirus*, do qual é o membro tipo e foi descrito pela primeira vez por Smith em 1931. O gênero *Potyvirus*, por sua vez, pertence à família Potyviridae, a qual abrange cerca de 20% dos fitovírus conhecidos. A partícula do PVY é alongada, filamentosa e flexível, com dimensões de, aproximadamente, 730nm x 11nm, sendo que o seu genoma é constituído por um RNA de fita simples, senso positivo, de 9,7Kb (DE BOKX; HUTTINGA, 1981; REGENMORTEL, 2000; SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994).

Inicialmente, acreditava-se que o RNA genômico apresentava uma única ORF, que codificava uma única poliproteína, com aproximadamente 350KDa que seria, por sua vez, clivada em 10 proteínas funcionais: P1, HC-PRO, P3, 6K1, CI, 6K2, VPG, NIa, NIb, e CP (MURPHY; JÄRLFORS; SHAW, 1991). No entanto, Chung et al. (2008) relataram a existência de uma nova ORF, de tamanho reduzido, incorporada à ORF maior, mais especificamente na região P3 e, possivelmente, com função semelhante à da proteína P3.

A proteína P1 está localizada na região amino terminal da poliproteína, apresenta a função de protease, realizando a clivagem do terminal carboxílico ligado a HC-Pro. Entretanto, pode atuar também como fator acessório na replicação do genoma viral. A HCPro (Helper Component-Proteinase) está envolvida na transmissão por afídeos e movimentação sistêmica, atua como protease, como fator acessório na replicação, na indução de sintomas e na

supressão do silenciamento gênico. A proteína P3 está envolvida na patogenicidade e na replicação viral. A proteína CI atua na formação das inclusões citoplasmáticas, tem atividade de RNA helicase, ATPase e também atua no movimento célula-a-célula e replicação. As proteínas 6k1 e 6k2 estão, provavelmente, relacionadas à replicação do genoma viral. NIa (Nuclear inclusion A) tem função de protease e também atua na localização celular e interação proteína-proteína; enquanto Nib (Nuclear Inclusion b) é a RNA polimerase, dependente do RNA (RdRp), atua na replicação viral e na interação com fatores do hospedeiro. A proteína do capsídeo (CP), além de compor estruturalmente a capa proteica viral, está relacionada com a, indução de sintomas, transmissão por vetores movimentação sistêmica e célula-a-célula. Além disso, as regiões não traduzíveis 5' e 3' NTR primeira atuam como promotoras replicação viral. A proteína VPg (viral protein genome linked) encontra-se ligada covalentemente à extremidade 5' do genoma tem função de protease e de proteína de movimento, além de atuar na transmissão por afídeos (ARBATOVA; LEHTRO; PEHU, 1998; DOUGHERTY et al., 1988; KASSCHAU; CRONIN; CARRINGTON, 1997; KERLAN, 2006; MURPHY; JÄRLFORS; SHAW, 1991; PRUSS et al., 1997; ROBERTS et al., 1998; SHAND et al., 2009; SHI et al., 1997; SHUKLA; FRENKEI; WARD, 1991; SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994; URCUQUI-INCHIMA; HAENNI; BERNARDI, 2001; VANCE et al., 1995).

O PVY infecta naturalmente uma ampla gama de hospedeiras que abrange mais de nove famílias, incluindo importantes culturas como pimentão (*Capsicum* spp.), batata (*Solanum tuberosum*), fumo (*Nicotiana* spp.), tomate (*Lycopersicon esculentum*), algumas ornamentais do gênero *Dahlia* spp. e *Petunia* spp., e muitas daninhas, tais como *Datura* spp., *Physalis* spp., entre outras (GLAIS; TRIBODET; KERLAN, 2005; JEFFRIES, 1998).

A transmissão do PVY ocorre principalmente por meio de vetores, dentre os quais o afídeo *Myzus persicae* é o mais eficiente; nesse caso, a transmissão ocorre de modo não persistente, ou estiletar. Além disso, o vírus também pode ser transmitido mecanicamente ou por enxertia..

De modo geral, os sintomas induzidos por *Potyvirus* são mosaico, mosqueado, clorose, necrose e deformação foliar, sendo que estes podem variar de acordo com o estágio fenológico da planta, bem como diversos fatores ambientais (SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994). No entanto, tais sintomas podem ser dramaticamente agravados quando da ocorrência de infecções mistas, nas quais um dos vírus que coinfectam o hospedeiro é um potivírus (PRUSS et al., 1997). O aumento dos sintomas está principalmente correlacionado ao maior acúmulo de partículas do não-potivírus envolvido na coinfecção, contudo, não foi observada alteração correspondente na concentração do potivírus envolvido (VANCE, 1991).

Diversas doenças sinérgicas, ou seja, causadas pela interação de dois vírus independentes, envolvem um membro do grupo *Potyvirus*. Nesses casos, o outro vírus envolvido pode ser qualquer um de uma ampla variedade de vírus não relacionados, incluindo pararetrovirus, como o *Cauliflower mosaic virus* e vírus de RNA dos supergrupos Alfavírus, como o PVX, e Picornavirus, como o *Cowpea mosaic virus* (PRUSS et al., 1997).

Segundo Begon e Mortimer (1986), as interações entre vírus ocorrem de diversas maneiras e apresentam três efeitos básicos: 1) um vírus causa, direta ou indiretamente, um aumento na replicação e/ou na transmissão do outro vírus; 2) um vírus causa a diminuição na replicação e/ou transmissão do outro; 3) a interação não tem efeito. Diversos tipos de interação entre vírus têm sido observados, como dependência do *helper*, proteção cruzada, substituição, supressão mútua e uma mistura de interações antagonísticas e sinérgicas. No entanto, a ocorrência do sinergismo e o associado aumento na severidade dos

sintomas têm importantes implicações práticas, como por exemplo, algumas doenças que são causadas exclusivamente pelo resultado de uma interação sinérgica (ZHANG; HOLT; COLVIN, 2001).

De modo geral, as interações entre vírus encontram-se bem caracterizadas, especialmente quando envolvem um membro do gênero *Potyvirus*, no entanto, pouco se sabe a respeito da interação entre duas ou mais estirpes de um mesmo vírus. No caso específico da interação entre estirpes do PVY, não existem relatos na literatura acerca do efeito de infecções simultâneas por duas ou mais estirpes desse vírus.

2.3.1 As estirpes do PVY e seus variantes

Devido à grande variabilidade de sintomas induzidos em seus hospedeiros, os isolados de PVY foram agrupados de acordo com os sintomas observados em diferentes cultivares de batata (SINGH et al., 2008).

Os isolados de PVY foram historicamente divididos em três grupos principais, de acordo com os sintomas induzidos em diferentes cultivares diferenciadoras de batata e em *N. tabacum* cv. Samsun, *S. tuberosum* e *Physalis floridana* inoculados experimentalmente (DE BOKX; HUTTINGA, 1981; SINGH et al., 2008). As estirpes PVY^O e PVY^C foram separadas com base em reações de hipersensibilidade em cultivares de batata contendo os genes de resistência *Nytr* e *Nc*, respectivamente (COCKERHAM, 1970; JONES, 1990); sendo que alguns isolados da estirpe PVY^C não são transmissíveis por afídeos (BLANCO-URGOITI et al., 1998; TRIENNAL..., 1978).

Diferentemente, o PVY^N causa severa necrose das nervuras em fumo e não é capaz de induzir resposta de hipersensibilidade em cultivares de batata, salvo raras exceções (JONES, 1990). Em batata, a estirpe N induz poucos sintomas, os quais podem variar de mosaico leve a severo. Além disso, o PVY^N

tem características sorológicas distintas das estirpes O e C (GLAIS et al., 1996; HEUVEL et al., 1994) é frequentemente associado a perdas na qualidade, produtividade em cultivares resistentes ou assintomáticas (PICHE et al., 2004).

Duas outras estirpes genéticas, denominadas Z e E, foram descritas por Blanco-Urgoiti et al. (1998) e Jones (1990). Os isolados da então denominada estirpe Z, apesar de muito semelhantes aos da estirpe N, apresentam perfil sorológico O e não são capazes de induzir necrose em *N. tabacum*. Tais isolados, pertencentes à estirpe Z, diferenciam-se das estirpes O e C por sua habilidade de superar os genes de hipersensibilidade Ny_{ibr} e Nc , os quais conferem resistência ao PVY^O e PVY^C respectivamente, e induzir resposta de hipersensibilidade em cultivares de batata contendo um gene Nz hipotético (JOHNSTON; ROWBERRY, 1981; JONES, 1990). A estirpe E, inicialmente considerada um variante da estirpe Z, também não é capaz de induzir necrose em *N. tabacum*. No entanto, os isolados dessa estirpe caracterizam-se por sua capacidade de superar os genes Ny_{ibr} e Nc , bem como o hipotético gene Nz (KERLAN; LE ROMANCER, 1999).

Nas últimas três décadas, foram relatadas duas estirpes variantes relacionadas ao PVY^N, chamadas PVY^{NTN} e PVY^{Wi} (GLAIS; TRIBODET; KERLAN, 2002). A estirpe NTN é caracterizada por induzir necrose em *N. tabacum* e apresentar sorologia do tipo N. No entanto, sua principal característica é a capacidade de induzir sintomas de PTNRD (*potato tuber necrosis ringspot disease*). Inicialmente, ocorre o aparecimento de anéis necróticos na superfície dos tubérculos, que evoluem para lesões deprimidas e, posteriormente, necróticas. Tais sintomas tornam-se mais intensos após armazenamento dos tubérculos em câmara fria, o que reduz a qualidade do tubérculo e o torna inadequado para comercialização como semente, além de ser rejeitado pelo consumidor. Além disso, os isolados de PVY^{NTN} induzem mosaico

clorótico severo em batata (BECZENER et al., 1984; PICHE et al., 2004; WEIDEMANN; MAISS, 1996).

Outro variante do grupo necrótico, o PVY^{Wi}, foi inicialmente detectado na cultivar de batata Wilga, por Chrzanowska (1991). Os isolados de PVY^{Wi}, assim como os da estirpe N, induzem necrose em *N. tabacum*, no entanto, apresentam sorologia do tipo O (SINGH et al., 2008). De modo geral, o PVY^{Wi} não induz o aparecimento de anéis necróticos em tubérculos (NIE; SINGH, 2003), contudo, Barker et al. (2009) relataram a ocorrência de isolados de PVY^{Wi} capazes de induzir sintomas de PTNRD. Segundo Chrzanowska (1991), em plantas de batata, os isolados da estirpe PVY^{Wi} são mais infecciosos, quando comparados a outras estirpes, atingindo mais rapidamente uma maior concentração, além de induzirem sintomas mais amenos.

Análises das sequências de nucleotídeos de isolados de PVY^{NTN} e PVY^{Wi} indicaram que ambos os variantes são recombinantes e seus genomas consistem em segmentos de PVY^O e de PVY^N (GLAIS; TRIBODET; KERLAN, 2002); sendo que os isolados de PVY^{Wi} geralmente apresentam uma única junção de recombinação (*recombination junction, RJ*), enquanto os isolados de PVY^{NTN} apresentam três (HU et al., 2009; SINGH et al., 2003).

A recombinação é caracterizada como uma troca de material genético entre dois vírus, duas estirpes de um mesmo vírus, ou mesmo entre o vírus e seu hospedeiro (WOROBAY; HOLMES, 1999). Tal fenômeno foi claramente descrito em 1960 para o caso de dois fitovírus de RNA, PVY e PVC, sendo que o último foi, posteriormente, identificado como uma estirpe do PVY (WATSON, 1960). Além disso, o mecanismo de recombinação também foi sugerido para explicar propriedades particulares de alguns variantes do PVY (GLAIS et al., 1998).

Uma análise detalhada acerca do quadro epidemiológico das viroses da batata predominantes nos estados brasileiros foi realizado por Ávila et al.

(2009). Nesse levantamento, foi incontestável a alta incidência da variante necrótica do grupo PVY^{NTN} nos estados amostrados em relação às demais estirpes, indicando fortemente a predominância do PVY^{NTN} em todo país. No entanto, Galvino-Costa et al. (2012b) apontam para um aumento na incidência de variantes necróticas do grupo PVY^{Wi}, com indicativos de que as populações de estirpes e recombinantes do PVY encontram-se em constante evolução, sendo que- possivelmente, o PVY^{Wi} pode estar começando a superar o PVY^{NTN} no Brasil.

Segundo Galvino-Costa et al. (2012b), a introdução de estirpes recombinantes, no Brasil, acarretou diversas mudanças no sistema de produção de batata, tanto semente quanto para consumo; aumentando, principalmente, a escolha por cultivares menos suscetíveis à PTNRD. Um exemplo é a cultivar Ágata, uma vez que não apresenta sintomas nas folhas, bem como nos tubérculos, quando infectada pela maioria das estirpes de PVY e seus recombinantes.

Segundo Draper, Pasche e Gudmestad (2002), a ampla distribuição do PVY pode ser, em grande parte, em razão do uso de cultivares de batata que não expressam os sintomas da doença, comprometendo a certificação de sementes, bem como inspeções regulatórias. Portanto, faz-se necessário um sistema de certificação eficiente, baseado em técnicas capazes de detectar a presença do vírus de forma rápida e confiável.

2.4 Detecção de estirpes e variantes do PVY

De modo geral, as técnicas de detecção e fitovírus podem ser classificadas em: a) técnicas biológicas; b) técnicas sorológicas; c) técnicas moleculares, sendo que aplicabilidade de cada uma depende do vírus, bem como do hospedeiro em que se encontra. É válido ressaltar que, atualmente, a detecção

de doenças viróticas pode ser realizada a partir de técnicas que se baseiam na combinação de métodos, como é o caso da técnica de IC-RT-PCR, que combina as técnicas sorológica e molecular.

As técnicas moleculares, de forma geral, são promissoras para diagnose, visto que são bastante seguras e eficientes para a realização dos testes em tecidos vegetais (BOONHAM et al., 2002; GLAIS; TRIBODET; KERLAN, 2005; LORENZEN et al., 2006; LOUWS; RADEMAKER; DE BRUIJN, 1999; MONTERO-ASTÚA et al., 2008; SCHAAD; JONES; CHUM, 2001; WANG et al., 1999), sendo as mais indicadas para uma diagnose de forma sensível, precisa e rápida.

A técnica de PCR foi desenvolvida há mais de trinta anos e tem se tornado cada vez mais utilizada na diagnose de doenças de plantas, tornando-se muito comum em laboratórios de diagnose. Essa técnica apresenta grandes vantagens para a detecção de patógenos, incluindo rapidez, especificidade e sensibilidade. A sensibilidade do método foi constatada por Hadidi et al. (1993), trabalhando com a detecção do vírus PLRV em batata.

A técnica de RT-PCR, em especial, tem sido válida não apenas para detecção de espécies de vírus, mas também tem tido eficiência inclusive para detecção de estirpes viróticas proximamente relacionadas (BOONHAM et al., 2002; LORENZEN et al., 2006; SINGH et al., 1998).

No caso das estirpes do PVY, particularmente, a grande variabilidade observada, bem como a alta frequência de recombinação entre isolados, exigem a aplicação de técnicas de alta sensibilidade, capazes de detectar pequenas variações em regiões específicas no genoma do vírus.

Várias técnicas têm sido utilizadas no sentido de diferenciar estirpes do PVY e seus variantes. Os testes biológicos em cultivares específicas de batata, bem como em *N. tabacum* são muitas vezes utilizados para distinguir os isolados necróticos dos não necróticos. No entanto, alguns autores relataram a ocorrência

de isolados dos grupos PVY^Z e PVY^E com genomas recombinantes capazes de induzir necrose em *N. tabacum*, o que não era esperado (GALVINO-COSTA et al., 2012a; KERLAN et al., 2011). Além disso, os testes biológicos são muito laboriosos, demandam muito tempo para a obtenção dos resultados e são, facilmente, influenciados pelas condições ambientais.

Segundo Galvino-Costa et al. (2012b), duas abordagens laboratoriais têm sido utilizadas na detecção de estirpes de PVY: sorologia com anticorpos monoclonais específicos para PVY^N e PVY^O; e RT-PCR com primers específicos para as estirpes de PVY e seus recombinantes.

As técnicas sorológicas foram e continuam sendo amplamente utilizadas na caracterização de isolados de PVY, no entanto, elas permitem a separação dos isolados de PVY em apenas dois grandes grupos, os necróticos, com sorologia do tipo N, e os não necróticos, com sorologia do tipo O. Os anticorpos comercialmente disponibilizados e mais comumente utilizados são o IF5 (Agdia, Elkhart, EUA) e SASA-N (Scottish Agricultural Science Agency - SASA, Edimburgo, Escócia), que reagem com os sorotipos N; e o MAb2 (Agdia) e SASA-O (SASA), que detectam os sorotipos O.

Atualmente, essa técnica é utilizada na grande maioria dos órgãos fitossanitários responsáveis pela certificação de tubérculos em todo mundo, graças ao seu baixo custo e à possibilidade de processar rapidamente um grande número de amostras. No entanto, a sensibilidade da técnica sorológica é relativamente baixa, quando comparada à sensibilidade e confiabilidade das técnicas moleculares, que vêm sendo amplamente difundida nos últimos anos, especialmente para fins diagnósticos.

Diversos autores já relataram a ocorrência de isolados com caracterização sorológica inesperada com base nos sintomas induzidos em plantas indicadoras (GALVINO-COSTA et al., 2012a; HU et al., 2009; MCDONALD; SINGH, 1996; ROBLES-HERNÁNDEZ et al., 2010). Como

exemplo, pode-se mencionar a estirpe PVY^{Wi}, variante do grupo necrótico com perfil sorológico O (BLANCO-URGOITI et al., 1998) e o PVY^O-O5, um variante do grupo O incapaz de induzir necrose em *N. tabacum* e apresenta sorologia do tipo N, para o anticorpo IF5 (Agdia) (ELISS et al., 1996; KARASEV et al., 2010).

Segundo Karasev et al. (2010), a mudança no perfil sorológico do PVY^O-O5, especificamente, deve-se à substituição de um único aminoácido na proteína capsidial, no entanto, tal justificativa não pode ser aplicada a outros casos. De acordo com Singh et al. (2008), como não há nenhuma evidência de que a capa proteica do PVY é responsável pelos sintomas induzidos em plantas indicadoras, é possível que a utilização de critérios sorológicos somente, apresente diagnósticos errôneos a respeito da estirpe de um isolado de PVY.

Sendo assim, as técnicas moleculares constituem uma alternativa rápida e eficiente na detecção e diferenciação de estirpes de PVY. De modo geral, as metodologias desenvolvidas até então, têm como alvo as junções de recombinação, visto que tais permitem a diferenciação de estirpes recombinantes de modo confiável.

Vários ensaios foram desenvolvidos, a fim de tornar a técnica mais rápida e exequível, principalmente para os órgãos fitossanitários responsáveis pela análise de batata-semente comercializada internacionalmente. Sendo assim, é fundamental a detecção simultânea das estirpes de PVY em um único ensaio, como ocorre na PCR multiplex, ou seja, com mais de um par de primers.

Nie e Singh (2002) desenvolveram uma metodologia capaz de detectar simultaneamente PVY^O e PVY^N, incluindo seus variantes PVY^{NTN} e PVY^{N:O} em infecções simples ou mistas. Os mesmos autores, em 2003, desenvolveram um ensaio para identificar isolados da estirpe PVY^N e seus recombinantes PVY^{NTN} e PVY^{N:O} (NIE; SINGH; 2003). Outros autores também desenvolveram diversos conjuntos de primers para a detecção de misturas de estirpes, no entanto, não

eram eficientes na distinção de infecções mistas, envolvendo os variantes do grupo necrótico (BOONHAM et al., 2002; CROSSLIN et al., 2002). Atualmente, a metodologia mais completa acerca da detecção de estirpes de PVY utiliza o conjunto de primers desenvolvido por Lorenzen et al. (2006), capaz de diferenciar a maioria das estirpes de PVY em infecções mistas, em um único ensaio.

Nesse cenário, a técnica de PCR quantitativa, ou PCR em tempo real (qPCR) apresenta-se como uma excelente ferramenta na detecção de misturas de estirpes de PVY, dada sua alta sensibilidade, confiabilidade e praticidade. No entanto, a principal vantagem da qPCR em relação à PCR convencional é a possibilidade de quantificar as partículas virais no tecido vegetal, baseado na especificidade da sequência de nucleotídeos (BALME-SINIBALDI et al., 2006), além de permitir o estudo mais detalhado do comportamento das estirpes de PVY em infecções simples e mistas, baseado em sua concentração do hospedeiro. As concentrações dos vírus que coinfectam uma planta, podem ser muito variáveis (AGINDOTAM; SHIEL; BERGER, 2007) e podem representar um forte indicativo da ocorrência, ou não, de interações entre as estirpes.

Balme-Sinibaldi et al. (2006) desenvolveram um sistema de detecção e quantificação simultânea de estirpes de PVY, por meio da técnica de qRT-PCR multiplex. No entanto, os primers e sondas propostos pelos autores são capazes de diferenciar apenas as estirpes PVY^N e PVY^O, o que gera resultados ambíguos, visto que as estirpes recombinantes não são diferenciadas dos grupos N e O.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos isolados e plantas com infecção mista

As estirpes PVY^O, PVY^{NTN} e PVY^{Wi} foram escolhidas neste trabalho, por serem as de maior incidência no país nos últimos anos. Foram utilizados os isolados YO-ANT25 (PVY^O), PEN-AG2 (PVY^{NTN}) e SGS-AG (PVY^{Wi}), provenientes da coleção do Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais, multiplicados por inoculação mecânica em plantas de *N. tabacum* e submetidos à RT-PCR multiplex (LORENZEN et al., 2006) a fim de confirmar a presença das estirpes. Posteriormente, foram feitas inoculações mecânicas, também em plantas de *N. tabacum*, individualmente ou nas combinações NTN+O, NTN+Wi, O+Wi e NTN+O+Wi na concentração final de 0,5 g de tecido por ml de tampão de inoculação. As plantas foram mantidas em casa de vegetação.

3.2 Detecção das estirpes de PVY por DAS e TAS-ELISA

A detecção das estirpes de PVY foi feita por meio das técnicas DAS e TAS-ELISA, seguindo-se o protocolo do fabricante e a metodologia descrita por Karasev et al. (2010). Foram empregados anticorpos policlonais da empresa Agdia, e dois anticorpos monoclonais da mesma empresa: MAb2, que detecta o PVY^O, PVY^{N:O}, PVY^{Wi} e a estirpe PVY^C (MCDONALD; KRISTJANSSON, 1993), e IF5 capaz de detectar as estirpes PVY^N, PVY^{O-O5} e PVY^{NTN} (ELLIS et al., 1996; KARASEV et al., 2010). Foram empregados também dois anticorpos monoclonais da Science and Advice for Scottish Agriculture- SASA), o SASA-O para PVY^O, PVY^{N:O}, PVY^{Wi} e PVY^C e o SASA-N que detecta PVY^N e PVY^{NTN}.

3.3 Detecção das estirpes de PVY por RT-PCR

A extração do RNA total foi realizada a partir das folhas de fumo inoculadas mecanicamente com as estirpes de PVY, seguindo-se o protocolo do Trizol (AFGC PROTOCOLS, 2014). As folhas foram maceradas na presença de nitrogênio líquido, e homogeneizadas em Trizol (solução aquosa contendo 38% de fenol saturado, 0,8M de tiocianato de guanidina, 0,4M de tiocianato de amônio e 0,1M de acetato de sódio, pH 5 e 5% de glicerol), na proporção de 1 g/15mL. O extrato obtido foi transferido para microtubos e estes foram posteriormente incubados por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi transferido para outros microtubos e foram adicionados 300µL de clorofórmio. Esses tubos foram agitados em vortex, deixados à temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a transferência da fase aquosa para outros tubos, foi adicionado ½ do volume da solução contendo 0,8M de Citrato de Sódio e 1,2M de Cloreto de Sódio e ½ volume de isopropanol, misturando-se cuidadosamente por inversão. Depois de permanecerem à temperatura ambiente por 10 minutos, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol a 70%, gelado. O RNA foi, então, secado a vácuo e ressuscitado em 25µL de água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). O RNA total extraído foi analisado em gel de agarose a 0,7%, contrastado com *Gel Red Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium).

A reação de RT-PCR Multiplex foi realizada conforme descrito por Lorenzen et al. (2006), empregando-se um conjunto de oito *primers*, que estão discriminados na Tabela 1. O resultado da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,7%, contrastado com *Gel Red Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium).

Tabela 1 Combinação de *primers* utilizados na técnica RT-PCR multiplex e tamanho do fragmento genômico esperado como produto da PCR para cada um dos variantes genéticos do *Potato virus Y* (PVY)

Combinação de <i>primers</i>	Tamanho do amplicon	Variante detectado
n2258 + o2439c	181 bp	PVY ^{NTN} , PVY ^{N-Wi}
o2172 + o2439c	267 bp	PVY ^O
n2258 + n2650c	398 bp	PVY ^N
n5707 + A6032m	328 bp	PVY ^N , PVY ^{NA-N/NTN}
S5585m + A6032m	452 bp	PVY ^{NTN}
S5585m + o6266c	689 bp	PVY ^{N-Wi} , PVY ^O

Fonte: Lorenzen et al. (2006)

3.4 Detecção das estirpes de PVY por RT-PCR em tempo real

Para a diagnose por qRT-PCR foram desenhadas sondas específicas para o PVY^O, PVY^{NTN} e PVY^{Wi}, com base nas regiões do genoma onde são encontradas as junções de recombinação que são, potencialmente, capazes de diferenciar as estirpes em estudo, das sequências de PVY disponíveis no GenBank – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). O desenho dessas sondas foi feito com o auxílio do programa RDP4 (MARTIN et al., 2010) e Primer Quest (Integrated DNA Technologies, IDT®).

3.4.1 Síntese do cDNA e qPCR

O cDNA foi sintetizado utilizando-se o primer reverse de cada par desenhado, o RNA total extraídos de acordo com o método do Trizol e a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Promega), seguindo as instruções do fabricante. O ensaio de qPCR foi realizado para um volume final de 20µl, contendo 10µl de

TaqMan Universal Master Mix II (Applied Biosystems), 0,9 μ M de cada primer, 0,25 μ M da sonda específica para a estirpe a ser detectada e 2 μ l de cDNA. A reação foi realizada utilizando-se o aparelho Eco Real-Time PCR (Illumina) e o ciclo utilizado foi 50°C por 02 min, 95°C por 10 min, 95°C por 15 seg, 60°C por 1 min.(40 ciclos)

3.4.2 Curva padrão

Os produtos de PCR obtidos com os pares de primers específicos para cada estirpe foram purificados, utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) individualmente. Os fragmentos foram ligados no vetor pGEM®-T Easy (Promega) e clonados em *Escherichia coli*. Os plasmídeos foram extraídos quantificados com o espectrofotômetro NanoDrop, para o cálculo do número de cópias por μ l de cada estirpe e análise de pureza. Em seguida, os plasmídeos foram linearizados por meio da restrição com a enzima SacI e transcritos com auxílio da enzima T7 RNA polimerase. O transcrito foi, então, purificado por meio do kit SV RNA Total Isolation System (Promega), quantificado e utilizado na síntese do cDNA para qPCR. Foram feitas diluições seriadas com concentrações variando de 10¹ até 10⁹ cópias/ μ l.

3.5 Caracterização sorológica e molecular de isolados de PVY presentes nas lavouras de batata do sul de Minas Gerais

Com o objetivo de identificar a ocorrência de infecções simples e mistas em plantas infectadas em condições de campo, foram selecionados 50 tubérculos provenientes de lavouras de batata das cidades de Maria da Fé, Pedralva e Cristina infectados com PVY. Os brotos desses tubérculos foram submetidos aos testes sorológicos DAS-ELISA e TAS-ELISA, conforme já descrito no item 3.2.

Além disso, a partir dos brotos dos tubérculos infectados, foi realizada a extração do RNA total pelo método do Trizol (AFGC PROTOCOLS, 2014), síntese do cDNA e RT-PCR multiplex, conforme descrito por Lorenzen et al. (2006).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação dos sintomas apresentados pelas plantas inoculadas mecanicamente com uma ou mais estirpes

Os sintomas observados nas plantas de fumo, cv. Turkish, inoculadas mecanicamente, encontram-se discriminados na Tabela 2. As plantas de fumo inoculadas com cada uma das estirpes de PVY, individualmente, apresentaram sintomas característicos específicos, porém, 14 dias após inoculação, as plantas inoculadas com PVY^{Wi} ainda não apresentavam necrose nas nervuras. Sabe-se que uma das características dessa estirpe é a de causar necrose bem mais leve do que a induzida pelas demais estirpes necróticas (BLANCO-URGOITI et al., 1998; NIE; SINGH, 2002). No caso das infecções mistas, em que a estirpe PVY^O estava presente, não foi observada nenhuma necrose nas nervuras e/ou espaço internerval, indicando uma predominância do seu efeito nas plantas infectadas (Figura 1). Naquelas, contendo apenas as estirpes NTN+Wi foi observada intensa necrose das nervuras, superiores àquelas induzidas por infecções simples de cada uma dessas estirpes.

Esses resultados sugerem a ocorrência de uma possível interação entre elas, uma vez que houve alteração nos sintomas tipicamente observados em infecções simples. Contudo, a sintomatologia é apenas um indicativo da interação entre ela. Para que seja possível inferir a respeito dessa interação, estudos mais detalhados devem ser realizados, envolvendo, principalmente, a quantificação absoluta das partículas virais, bem como a avaliação de sua taxa de transmissão por vetores (ZHANG; HOLT; COLVIN, 2001).

Tabela 2 Sintomas induzidos pelas estirpes de PVY em infecções simples e mistas em plantas de fumo, 14 dias após a inoculação

Estirpes	Sintomas		
	mosaico	Enrugamento	necrose
PVY ^{NTN}	+	++	++
PVY ^O	++	não	não
PVY ^{Wi}	+	não	+
PVY ^{NTN} + PVY ^O	+	+	não
PVY ^{NTN} + PVY ^{Wi}	+	+++	+++
PVY ^O + PVY ^{Wi}	++	não	não
PVY ^{NTN} + PVY ^O + PVY ^{Wi}	++	+	não

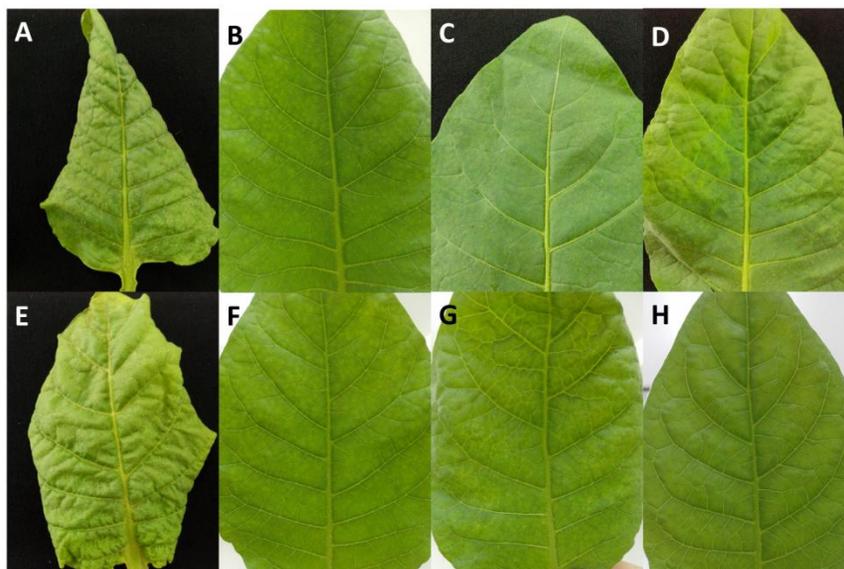


Figura 1 Sintomas apresentados pelas plantas de *N. tabacum*, 14 dias após a inoculação com as estirpes PVY^{NTN}, PVY^O e PVY^{Wi} em infecções simples e mistas. (A) PVY^{NTN}; (B) PVY^O; (C) PVY^{Wi}; (D) PVY^{NTN}+PVY^O; (E) PVY^{NTN}+PVY^{Wi}; (F) PVY^O+PVY^{Wi}; (G) PVY^{NTN}+PVY^O+PVY^{Wi}; (H) *mock*

Diversos autores já relataram a ocorrência de sinergismo entre dois ou mais vírus, sendo que, frequentemente, um potivírus está envolvido na interação (ANJOS; JARFORS; GHABRIAL, 1992; VANCE, 1991). No sinergismo, normalmente um vírus, cujo número de partículas não é aumentado, regula positivamente a replicação e/ou o movimento do outro vírus, não relacionado, resultando, principalmente, no agravamento dos sintomas da espécie não relacionada (ANJOS; JARFORS; GHABRIAL, 1992; BOURDIN; LECOQ, 1994; CALVERT; GHABRIAL, 1983; PRUSS et al., 1997; VANCE, 1991). Na maioria dos casos, o vírus que regula positivamente a replicação do outro é um potivírus (CHOI et al., 2002). Nas interações sinérgicas, o agravamento dos sintomas está fortemente relacionado ao aumento da concentração de partículas virais do não-potivírus (GOLDBERG; BRAKKE, 1987; PRUSS et al., 1997; VANCE, 1991), no entanto, pouco se sabe a respeito do sinergismo entre dois membros do gênero *Potyvirus* ou mesmo de entre duas estirpes de um mesmo vírus. Diante disso, é reforçada a necessidade de se desenvolver uma metodologia capaz de quantificar as partículas virais presentes no tecido vegetal, de modo seguro e eficaz.

4.2 Detecção das estirpes de PVY por TAS-ELISA e RT-PCR multiplex nas plantas inoculadas mecanicamente com uma ou mais estirpes

Todas as plantas de *N. tabacum* inoculadas foram testadas inicialmente por DAS-ELISA, utilizando antissoro policlonal, tendo sido confirmada a infecção pelo PVY. Quando submetidas ao teste sorológico TAS-ELISA, empregando os anticorpos monoclonais, aquelas que foram inoculadas com a estirpe PVY^{NTN} ou com misturas contendo essa estirpe, houve reação com os anticorpos monoclonais IF5 e SASA-N; da mesma forma, aquelas inoculadas com as estirpes PVY^O e PVY^{Wi}, em infecções simples ou mistas, reagiram com

os anticorpos monoclonais MAb2 e SASA-O. De modo geral, as absorvâncias apresentadas sete dias após a inoculação foram menores que as observadas 14 dias após a inoculação, indicando um aumento da concentração de partículas virais ao longo do tempo. No entanto, utilizando-se apenas o teste sorológico com anticorpos monoclonais (TAS-ELISA) não é possível distinguir a estirpe PVY^O da estirpe PVY^{Wi}. Além disso, não é possível determinar a concentração absoluta de cada uma delas nas plantas.

No caso específico das plantas inoculadas com duas ou mais estirpes, houve uma mudança na concentração das estirpes predominantes ao longo do tempo, de acordo com o anticorpo utilizado (Figuras 2 e 3). Nos testes em que foram utilizados os anticorpos da empresa Agdia, a estirpe PVY^{NTN} apresentou maiores absorvâncias, enquanto os testes com os anticorpos produzidos pela SASA resultaram em maiores absorvâncias para as estirpes PVY^O e PVY^{Wi}, as quais apresentam perfil sorológico do tipo O. No entanto, essa variação pode estar mais associada a diferenças na sensibilidade/concentração dos anticorpos de cada empresa, ou ainda pelo fato de detectarem diferentes epitopos na proteína capsidial do vírus.

Os resultados obtidos, quando foram empregados os antissoros produzidos pela SASA, aliados aos sintomas mostrados pelas plantas com infecções mistas, contendo as estirpes comum e necróticas, permitem inferir que, provavelmente, elas não apresentam sintomas de necrose, devido a maior concentração da estirpe comum na planta. Entretanto, para que esses dados sejam confirmados, seria desejável uma investigação empregando a técnica de qPCR, para uma quantificação adequada. Não existem dados, relacionados a essa questão, disponíveis na literatura.

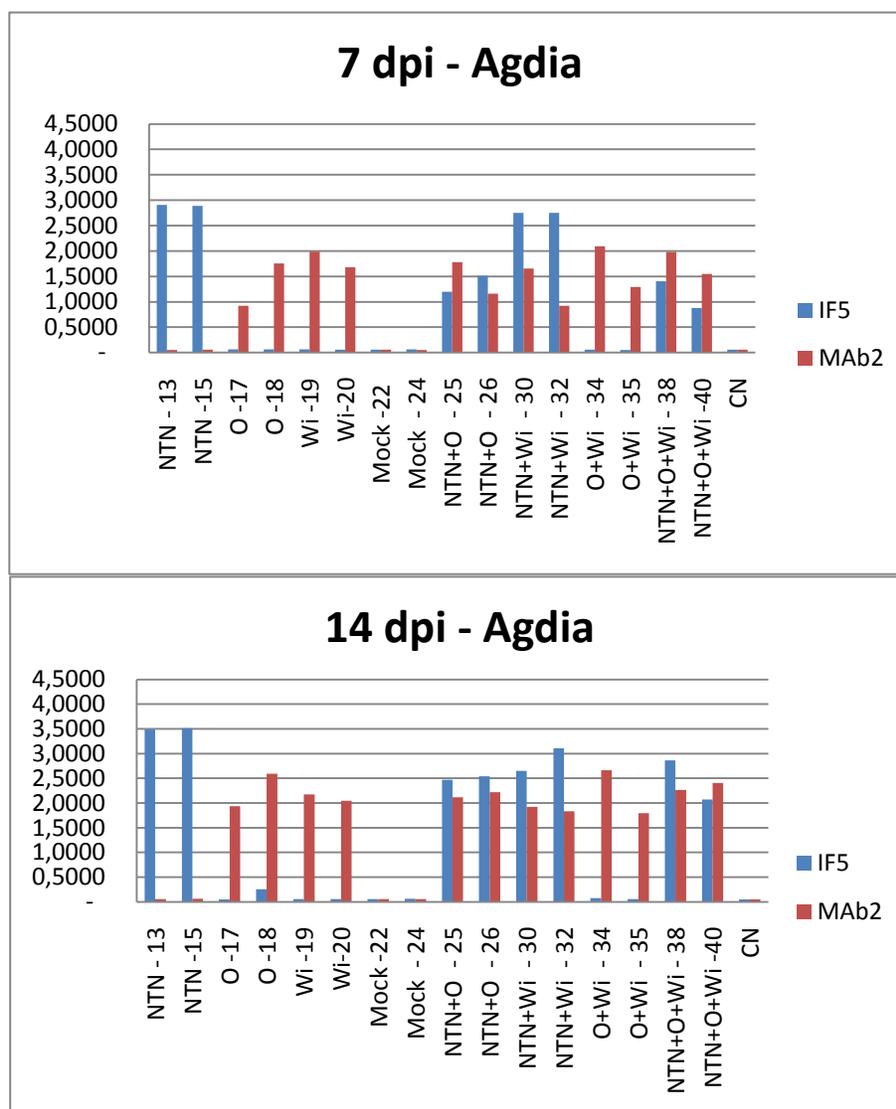


Figura 2 Absorbâncias obtidas no teste sorológico TAS-ELISA com os anticorpos monoclonais IF5 e MAb2 da empresa Agdia, sete e 14 dias após a inoculação

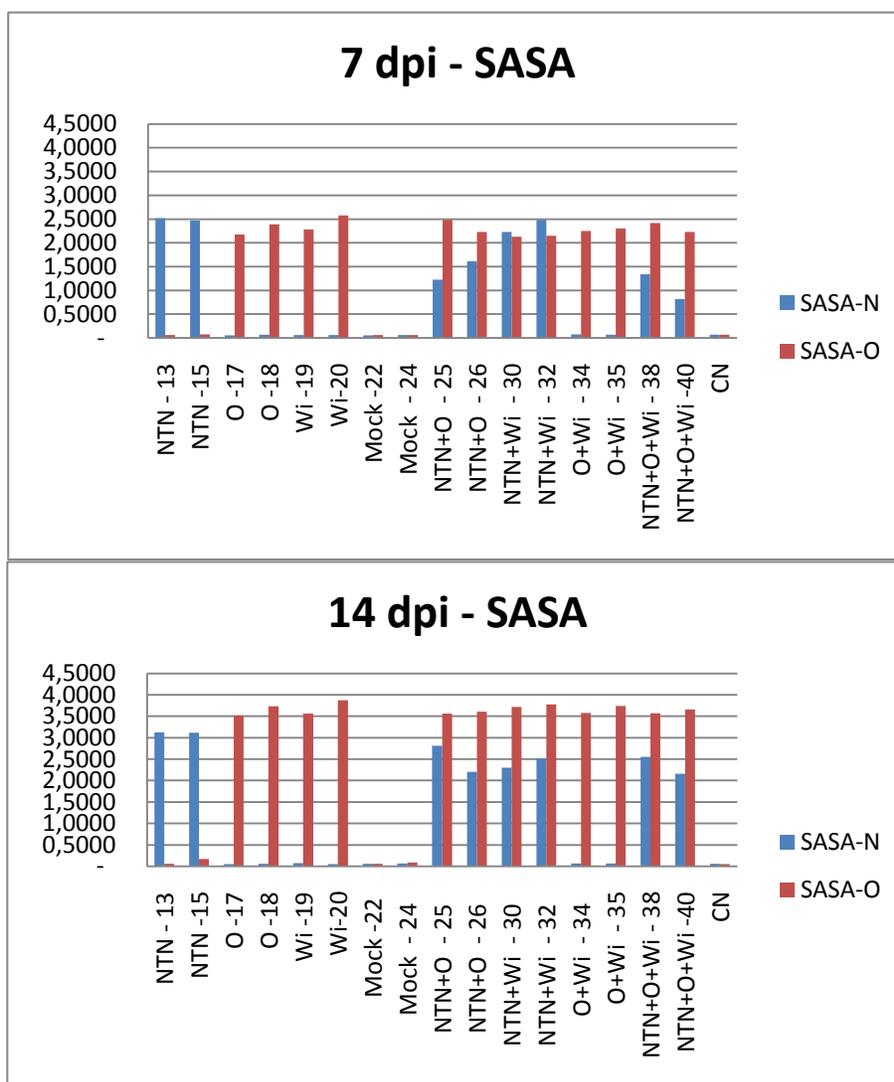


Figura 3 Absorbâncias obtidas no teste sorológico TAS-ELISA com os anticorpos monoclonais SASA-N e SASA-O produzidos pela SASA, sete e 14 dias após a inoculação

O teste de RT-PCR multiplex, utilizando o conjunto de *primers* desenvolvidos por Lorenzen et al. (2006) mostrou-se altamente eficiente na detecção das estirpes de PVY em infecções simples e mistas com sete e 14 dias

após a inoculação (Figuras 4). As plantas inoculadas com PVY^{NTN} individualmente ou com misturas contendo essa estirpe apresentaram amplicons dentro do tamanho esperado, ou seja, de 181 e 452pb; aquelas inoculadas com PVY^O ou com misturas contendo essa estirpe, apresentaram amplicons de 689 e 267pb; finalmente, as inoculadas com PVY^{Wi} ou misturas contendo essa estirpe apresentaram amplicons de 689 e 181pb.

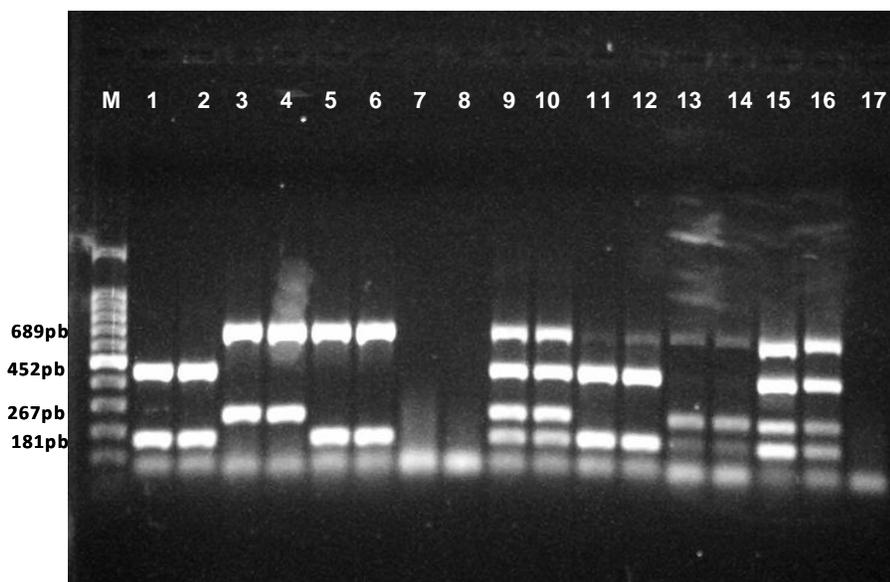


Figura 4 Análise eletroforética dos produtos de PCR amplificados a partir do RNA de plantas de fumo inoculadas mecanicamente com uma ou mais estirpes. M: marcador 100pb; 2-3: PVY^{NTN}; 3-4: PVY^O; 5-6: PVY^{Wi}; 7-8: *mock*; 9-10: PVY^{NTN}+PVY^O; 11-12: PVY^{NTN}+PVY^{Wi}; 13-14: PVY^O+PVY^{Wi}; 15-16: PVY^{NTN}+PVY^O+PVY^{Wi}; 17: controle negativo

No caso de infecções mistas, observou-se a formação de todas as bandas características de cada estirpe. Desse modo, a técnica detectou cada uma das estirpes envolvidas em infecções simples e mistas em cada uma das plantas testadas. Na RT-PCR realizada com cDNA das plantas inoculadas apenas com o

tampão de inoculação, sem extrato vegetal contendo partículas virais, nenhum fragmento foi amplificado.

4.3 Desenvolvimento de sondas e *primers* para detecção de PVY por qRT-PCR

Três pares de primers foram desenhados para discriminar as estirpes PVY^O, PVY^{NTN} e PVY^{Wi} em PCR tempo real (Tabela 3). Cada primer foi construído, flanqueando as regiões de junção de recombinação exclusiva de cada estirpe.

As sondas marcadas com fluoróforos específicos foram desenhadas exatamente na posição da troca de segmentos recombinantes, estando, portanto dentro do fragmento amplificado pelos primers flanqueadores. Para PVY^{NTN}, o primer *forward* foi desenhado entre os nucleotídeos 5767-5787 e o primer *reverse* entre 5853-5874, dentro do gene da proteína VPg. Entre esses dois primers foi construída uma sonda PVY^{NTN}-específica marcada com o fluoróforo HEX e localizada entre os nucleotídeos 5824-5849. Para estirpe PVY^O, o primer *forward* foi desenhado entre os nucleotídeos 2255-2275 e o *reverse* entre 2381 – 2403, no gene da HC-Pro. A sonda específica dessa estirpe se localiza entre as posições 2296-2322 e é marcada com o fluoróforo FAM. Para estirpe PVY^{Wi}, os primers estão situados no gene da proteína P1, sendo o primer *forward* situado nas posições 402 a 420 e *reverse* nas posições 506 a 527. A sonda específica para PVY^{Wi} localiza-se entre os nucleotídeos 431-441 e carrega marcação com fluoróforo Cy5. As sequências do conjunto de *primers* e sondas desenvolvidos para cada variante encontram-se descritas na tabela 3.

Tabela 3 Sequência de nucleotídeos dos *primers* e sondas desenvolvidos para a detecção de variantes genéticas do PVY por qRT-PCR

Variante detectado	Conjunto de <i>primers</i>/sondas desenvolvido
PVY ^{NTN}	Primer F: 5'-GGGCTGGCTTTGAAATTGAC- 3' Primer R: 5'-TACCAACAGTGGTGCCTTTAC- 3' Sonda: 5'HEX-TGGATCTGCATACAGGAAGAAGGGA- 3'
PVY ^O	Primer F: 5'-GGTTGACTCATTTGGCTCGCA- 3' Primer R: 5'-CATTAGGAACACCACCAACTCTA- 3' 5'FAM-AGCATCCAGCGTGTCTCAACTTATCT- 3'
PVY ^{Wi}	Primer F: 5'-ACGCGCATCCAGAAGAAA- 3' Primer R: 5'-TCTCCACCAGCAATAGTGATCTTTGAC- 3' 5' Cy5-TCACTTCCAGATGGCAGCTCCTAGTA- 3'

As sondas e primers de cada estirpe foram eficientes na detecção das estirpes virais, tanto em reações de PCR em tempo real *single e multiplex*. Nas figuras 5 a 7 (A e B) é possível verificar que as sondas e primers em reações *singleplex* detectaram as estirpes virais em diferentes concentrações, o que é evidenciado pelos diferentes grupos de curvas que foram amplificadas em diferentes Cq (número do ciclo da PCR no qual a fluorescência atinge o limiar de detecção – *threshold*) com R² entre 0,989 e 0,920 (gráfico à direita). A combinação de todas as sondas e primers em uma reação de tempo real *multiplex* também mostrou-se eficiente na detecção das estirpes, mesmo quando estas estão em infecção mista. Na figura 8 (A e B), observa-se a presença de curvas de diferentes cores, cada cor corresponde à curva de detecção de uma estirpe presente na amostra com infecção mista (O+NTN+Wi). Na reação multiplex os valores de R² variaram de 0,987 a 0,989.

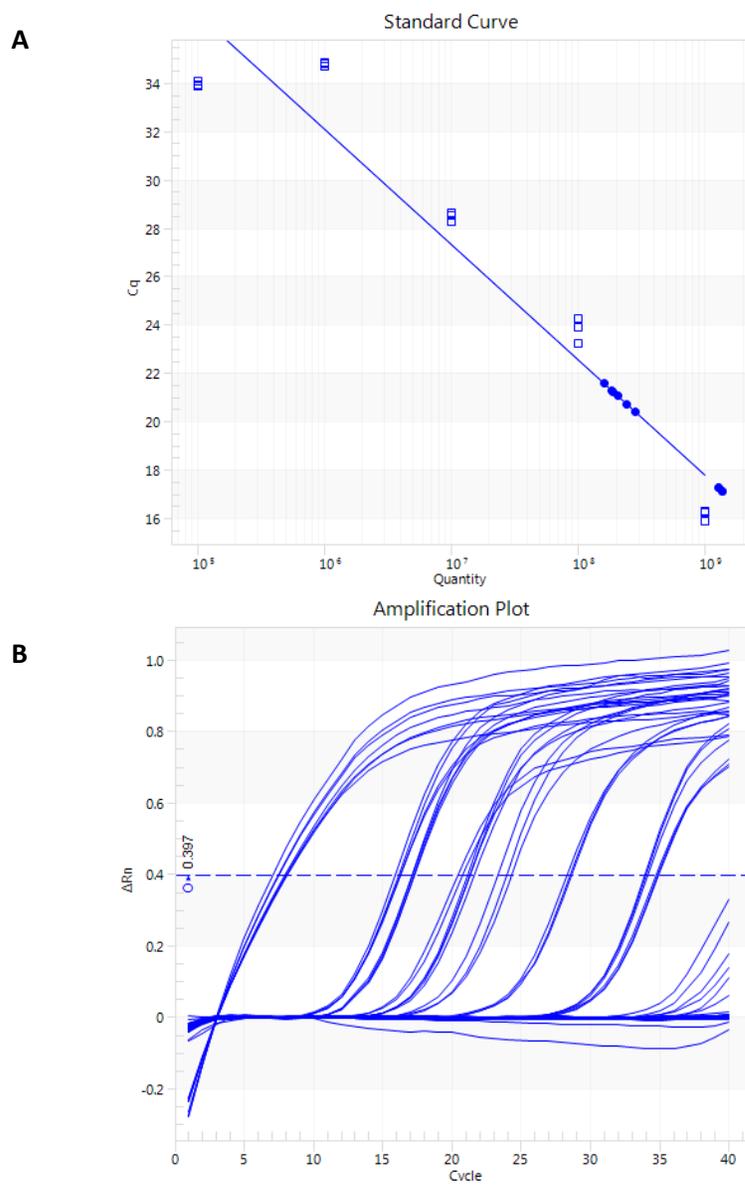


Figura 5 Detecção de estirpes de PVY por qPCR *singleplex*. (A) *Standard Curve* e (B) *Amplification Plot* para reações *singleplex* do PVY⁰

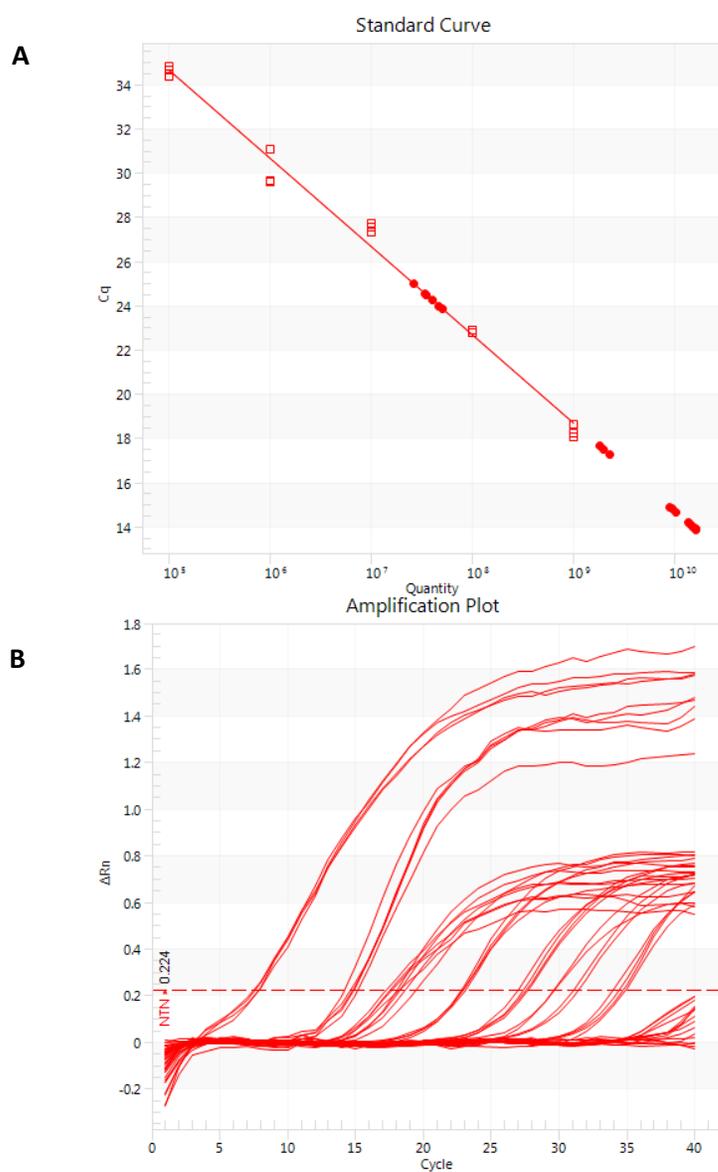


Figura 6 Detecção de estirpes de PVY por qPCR *singleplex*. (A) *Standard Curve* e (B) *Amplification Plot* para reações *singleplex* do PVY^{NTN}

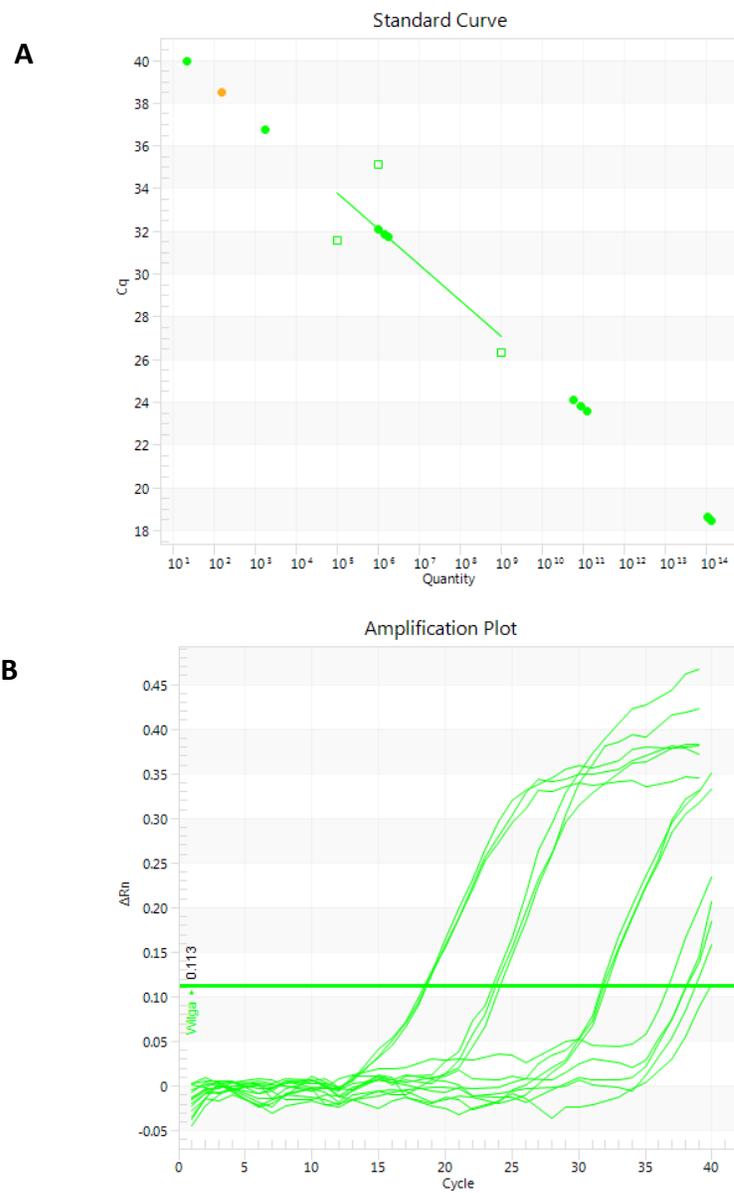


Figura 7 Detecção de estirpes de PVY por qPCR *singleplex*. (A) *Standard Curve* e (B) *Amplification Plot* para reações *singleplex* do PVY^{Wi}

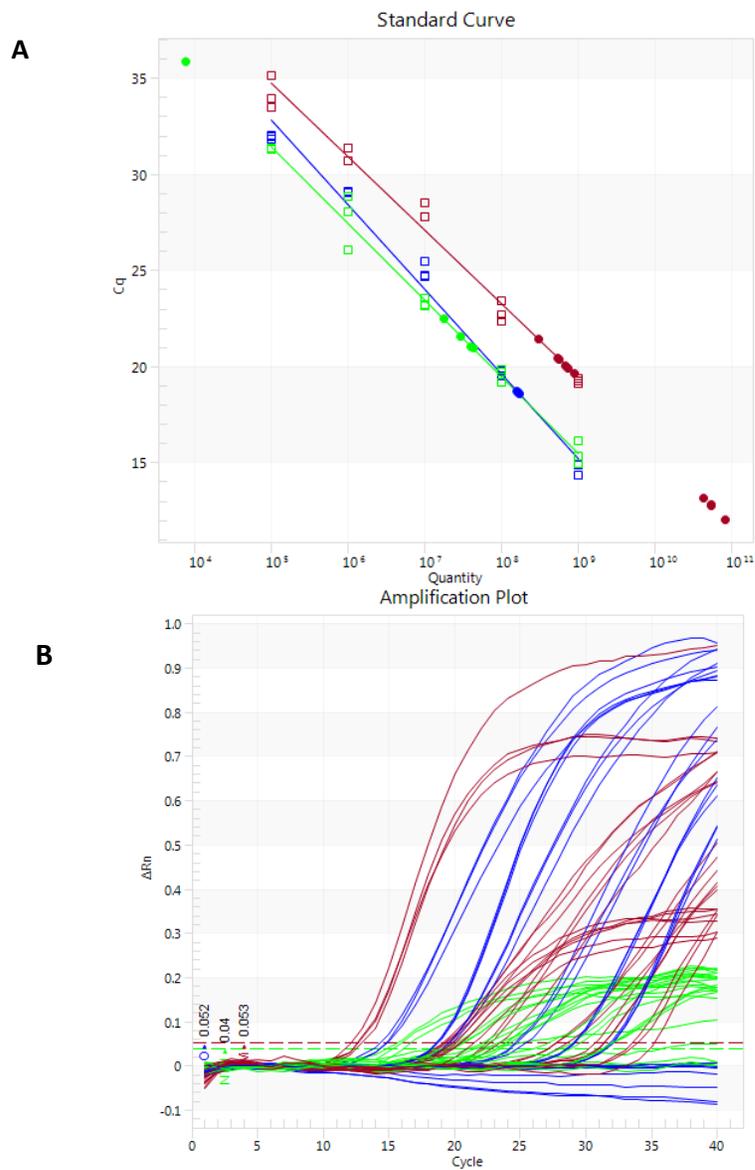


Figura 8 Detecção de estirpes de PVY por qPCR *multiplex*. (A) *Standard Curve* e (B) *Amplification Plote* para reações *multiplex* de detecção das estirpes PVY^O, PVY^{NTN} e PVY^{Wi}

É a primeira vez que se realiza um teste de qPCR multiplex para a detecção das estirpes PVY^{NTN}, PVY^O e PVY^{Wi}. Balme-Sinibaldi et al. (2006) desenvolveram um sistema de detecção e quantificação simultânea de estirpes de PVY por meio da técnica de qRT-PCR multiplex. Porém, os primers e sondas propostos por esses autores diferenciam apenas as estirpes PVY^N e PVY^O, diferentemente do conjunto proposto no presente trabalho, que permite distinguir as estirpes NTN e Wilga além da estirpe O.

Kogovsek et al. (2008) também desenvolveram um sistema de detecção de estirpes de PVY, mais especificamente das estirpes NTN, N e O. Contudo, o trabalho propõe que a detecção dessas estirpes seja realizada em ensaios singleplex, o que torna o processo mais lento e pouco prático, uma desvantagem em relação ao ensaio multiplex. Além disso, os primers e sondas propostos por esses autores não detectam a estirpe Wilga, que tem se mostrado como uma das mais importantes, no Brasil, atualmente.

4.4 Caracterização sorológica e molecular de isolados de PVY presentes nas lavouras de batata do sul de Minas Gerais

Dos 90 tubérculos provenientes das lavouras de batata do sul de Minas Gerais, de plantas com suspeita de virose, que foram testados inicialmente por DAS-ELISA utilizando antissoro policlonal, 84 foram positivos para PVY, enquanto que seis foram negativos. Quando testados com os anticorpos monoclonais, 73 foram positivos para a estirpe comum e/ou Wilga, 11 para a estirpe necrótica, sendo 8 positivos para infecções mistas (Tabela 4). Oito amostras (5, 10, 12, 25, 29, 30, 33 e 40) reagiram apenas com um dos antissoros que reconhecem estirpes necróticas, o IF5, apresentando resultado negativo quando testados com o SASA-N, tendo, por outro lado, reagido com o SASA-O, mostrando um padrão de infecção mista com NTN e Wilga/O. Três amostras

(36, 43 e 45) reagiram com os antissoros IF5 e SASA-N, sendo que o último (45) reagiu também com o MAb2 e SASA-O, o único isolado que reagiu com os quatro antissoros, mostrando um típico padrão de infecção mista, proveniente do município de Cristina.

Finalmente, três amostras reagiram com o SASA-O, mas não reagiram com MAb2 (20, 26 e 37). 70 amostras reagiram com os anticorpos MAb2 e SASA-O, apresentando padrão sorológico típico das estirpes O e Wilga. Diversos isolados de PVY com padrões sorológicos atípicos são comumente relatados na literatura (PICHE et al., 2004). Karasev et al. (2010), por exemplo, relata a ocorrência de um variante da estirpe comum (PVY^O) capaz de reagir com o antissoro IF5, denominado PVY^O-O5, o que não era esperado para isolados da estirpe O.

Tabela 4 Caracterização sorológica de isolados de PVY presentes nos campos produtores de batata do Sul de Minas por TAS-ELISA com anticorpos monoclonais

Amostra	Localidade	IF5	MAb2	SASA-N	SASA-O
01	Maria da Fé	-	+	-	+
02	Pedralva	-	+	-	+
03	Pedralva	-	+	-	+
04	Pedralva	-	+	-	+
05	Pedralva	+	+	-	+
06	Pedralva	-	+	-	+
07	Pedralva	-	+	-	+
08	Pedralva	-	+	-	+
09	Pedralva	-	+	-	+
10	Pedralva	+	+	-	+
11	Pedralva	-	+	-	+
12	Pedralva	+	+	-	+
13	Pedralva	-	+	-	+
14	Pedralva	-	+	-	+
15	Pedralva	-	+	-	+
16	Pedralva	-	+	-	+
17	Pedralva	-	+	-	+

“Tabela 4, continua”

Amostra	Localidade	IF5	MAb2	SASA-N	SASA-O
18	Pedralva	-	+	-	+
19	Pedralva	-	+	-	+
20	Pedralva	-	-	-	+
21	Pedralva	-	+	-	+
22	Maria da Fé	-	+	-	+
23	Maria da Fé	-	+	-	+
24	Maria da Fé	-	+	-	+
25	Maria da Fé	+	-	-	+
26	Maria da Fé	-	-	-	+
27	Maria da Fé	-	+	-	+
28	Maria da Fé	-	+	-	+
29	Maria da Fé	+	+	-	+
30	Maria da Fé	+	+	-	+
31	Maria da Fé	-	+	-	+
32	Maria da Fé	-	+	-	+
33	Maria da Fé	+	+	-	+
34	Maria da Fé	-	+	-	+
35	Maria da Fé	-	+	-	+
36	Maria da Fé	+	-	+	-
37	Maria da Fé	-	-	-	+
38	Maria da Fé	-	+	-	+
39	Maria da Fé	-	+	-	+
40	Maria da Fé	+	+	-	+
41	Maria da Fé	-	+	-	+
42	Maria da Fé	-	+	-	+
43	Maria da Fé	+	-	+	-
44	Cristina	-	+	-	+
45	Cristina	+	+	+	+
46	Cristina	-	+	-	+
47	Cristina	-	+	-	+
48	Cristina	-	+	-	+
49	Maria da Fé	-	+	-	+
50	Maria da Fé	-	+	-	+
51	Maria da Fé	-	-	-	-
52	Maria da Fé	-	-	-	-
53	Maria da Fé	-	-	-	-
54	Maria da Fé	-	+	-	+
55	Maria da Fé	-	-	-	-

“Tabela 4, conclusão”

Amostra	Localidade	IF5	MAb2	SASA-N	SASA-O
56	Maria da Fé	-	+	-	+
57	Maria da Fé	-	+	-	+
58	Maria da Fé	-	+	-	+
59	Maria da Fé	-	+	-	+
60	Maria da Fé	-	+	-	+
61	Pedralva	-	+	-	+
62	Pedralva	-	-	-	-
63	Pedralva	-	+	-	+
64	Pedralva	-	+	-	+
65	Pedralva	-	+	-	+
66	Pedralva	-	-	-	-
67	Pedralva	-	+	-	+
68	Pedralva	-	+	-	+
69	Pedralva	-	+	-	+
70	Pedralva	-	+	-	+
71	Pedralva	-	+	-	+
72	Pedralva	-	+	-	+
73	Pedralva	-	+	-	+
74	Pedralva	-	+	-	+
75	Pedralva	-	+	-	+
76	Pedralva	-	+	-	+
77	Pedralva	-	+	-	+
78	Maria da Fé	-	+	-	+
79	Maria da Fé	-	+	-	+
80	Maria da Fé	-	+	-	+
81	Maria da Fé	-	+	-	+
82	Maria da Fé	-	+	-	+
83	Maria da Fé	-	+	-	+
84	Maria da Fé	-	+	-	+
85	Maria da Fé	-	+	-	+
86	Maria da Fé	-	+	-	+
87	Maria da Fé	-	+	-	+
88	Maria da Fé	-	+	-	+
89	Cristina	-	+	-	+
90	Maria da Fé	-	+	-	+

Alguns isolados com padrões sorológicos atípicos já foram relatados no Brasil por Galvino-Costa et al. (2012b) e Ramalho (2012). Um deles,

denominado MAF-VOY, apresentou reação sorológica positiva para os anticorpos MAb2, SASA-O e IF5, assim como isolados do tipo PVY^O-O5, e padrão de bandas típico da estirpe Wilga, na caracterização molecular por RT-PCR multiplex. Ramalho (2012), também relatou a ocorrência, no Brasil, de um isolado de PVY^{NTN} capaz de reagir somente com os anticorpos MAb2 e SASA-O, que detectam perfil sorológico do tipo O.

Na caracterização molecular por RT-PCR multiplex, as três amostras com sorologia N (36, 40 e 43), apresentaram padrão de bandas típicos da estirpe PVY^{NTN} (Figuras 9A e 9B). Das oito amostras, que apresentaram infecção mista nos testes sorológicos (5, 10, 12, 25, 29, 30, 33 e 45) apenas três apresentaram o padrão típico descrito por Lorenzen et al. (2006), para Wilga e NTN. As demais, apresentaram banda para o isolado Wilga e uma banda ligeiramente menor, característica do isolado necrótico europeu. Entretanto, o isolado europeu mostra uma banda de 398bp e outra de 328bp. Três isolados, que não apresentaram resultado positivo para estirpes necróticas no TAS-ELISA, mostraram as bandas típicas para o PVY^{NTN}, indicando que o RT-PCR foi mais sensível para detectar essa estirpe que, provavelmente, encontrava-se numa concentração abaixo da sensibilidade do teste sorológico. Dos isolados que apresentaram sorologia do tipo O/Wilga nos testes sorológicos, 11 (8, 9, 13, 21, 24, 26, 31, 34, 35, 47 e 48) apresentaram o padrão típico de bandas da estirpe Wilga, de 689 e 181pb, confirmando o que havia sido indicado por Galvino-Costa et al. (2012b), a respeito de um possível aumento na incidência do PVY^{Wi} em relação ao PVY^{NTN}, até então considerado mais frequente no Brasil (ÁVILA et al., 2009). A demais amostras com padrão sorológico O/Wilga mostraram, além das bandas de 689 e 181pb, uma banda adicional com cerca de 398pb.

Esses resultados demonstram a complexidade dos testes diagnósticos para detecção de variantes genéticas do PVY. Normalmente, a diferença entre as

estirpes são mínimas, dificultando a distinção entre elas, tanto nos testes sorológicos como nos testes moleculares.

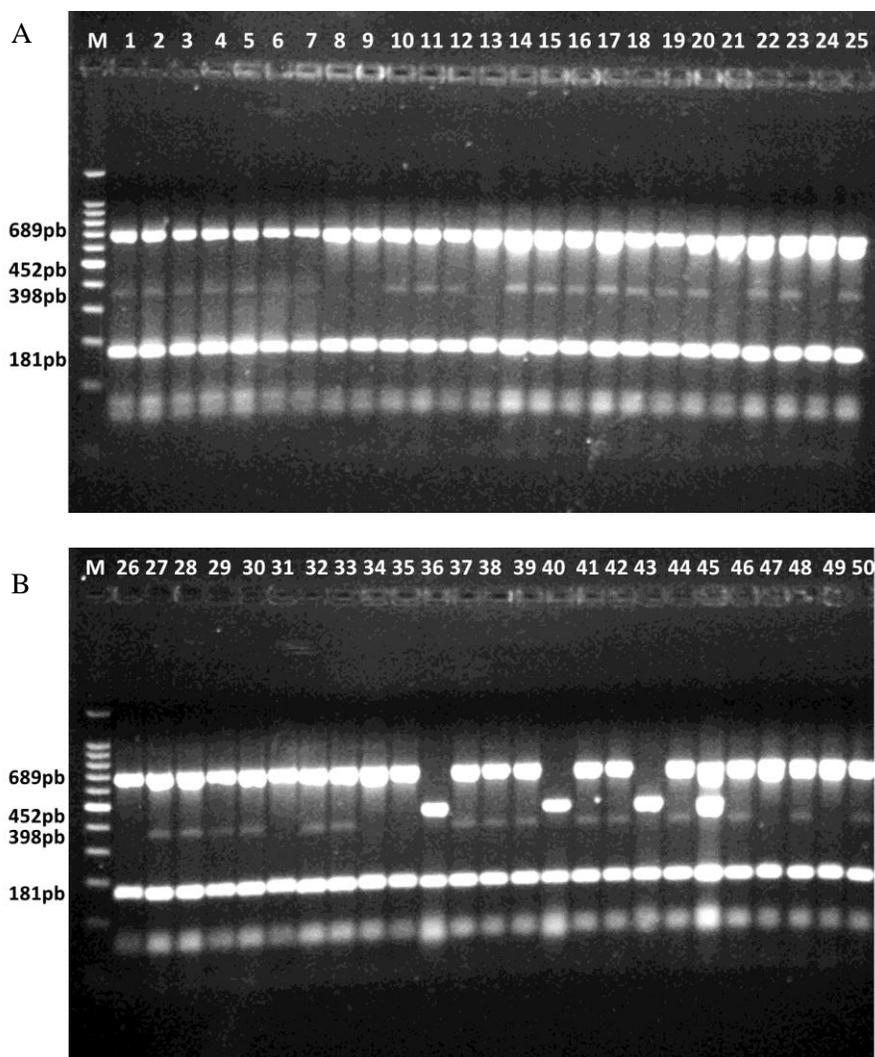


Figura 9 Análise eletroforética dos produtos de RT-PCR multiplex, obtidos com os primers desenvolvidos por Lorenzen et al. (2006). A: amostras 1 a 25; B: amostras 26 a 50

Desse modo, a grande diversidade apresentada pelas estirpes de PVY, cria um cenário no qual o uso de uma única metodologia não é suficiente para caracterizar devidamente um isolado de PVY sob condições de campo (GALVINO-COSTA et al., 2012a; GRAY et al., 2010).

5 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho confirmaram a alta eficiência da técnica de RT-PCR na detecção de estirpes de PVY, mostrando-se mais sensível do que o TAS-ELISA, além de permitir a distinção entre estirpes que não podem ser separadas por meio do teste sorológico com anticorpos monoclonais. O conjunto de *primers* desenvolvidos por Lorenzen et al. (2006) apresentou grande sensibilidade na detecção de infecções simples e mistas das estirpes PVY^O, PVY^{NTN} e PVY^{Wi}, entretanto, pode-se notar a amplificação de mais uma banda que indica a presença de uma estirpe europeia, não prevista de ser amplificada com esse grupo de *primers* específico para as estirpes mencionadas. Desse modo, existe a necessidade de sempre considerar o aparecimento de novas variantes genéticas, capazes de gerar padrões variados de bandas, quando se realiza um teste de diagnose do PVY.

A comprovação de infecções mistas nas plantas de batata infectadas, em condições de campo, ligada às condições ambientais favoráveis para a multiplicação do PVY, são altamente favoráveis aos eventos de recombinação, explicando de certa forma a alta variabilidade genômica do PVY no Brasil, a exemplo do que acontece em outras partes do mundo.

É possível que a técnica de RT-PCR em tempo real possa ser ainda mais sensível que a RT-PCR, sendo, provavelmente, capaz de detectar concentrações de estirpes ainda menores em infecções supostamente simples. Assim sendo, novos experimentos devem ser realizados com a finalidade de utilizar a técnica qPCR para detectar e quantificar de modo mais preciso as estirpes que aparecem infectando uma planta de batata no campo. O conjunto de *primers* e sondas capazes de detectar as estirpes PVY^O, PVY^{NTN} e PVY^{Wi} em ensaios de qRT-PCR *singleplex* e *multiplex* já foram testados e mostraram boa eficiência, tendo sido o primeiro passo nessa direção.

REFERÊNCIAS

AFGC PROTOCOLS. Disponível em:

<<http://www.arabidopsis.org/portals/masc/AFGC/RevisedAFGC/site2RnaL.htm#isolation>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

AGINDOTAM, B. O.; SHIEL, P. J.; BERGER, P. H. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan® real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 142, n. 1/2, p. 1-9, June 2007.

ANJOS, R. J.; JARFORS, U.; GHABRIAL, S. A. Soybean mosaic potyvirus enhances the titre of two comoviruses in dually-infected soybean plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, n. 10, p. 1022-1027, 1992.

ANUÁRIO da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria, 2011. 214 p.

ARBATOVA, J.; LEHTRO, K.; PEHU, T. Localization of the P1 protein of *Potato Y* potyvirus in association with cytoplasmatic inclusion bodies and in the cytoplasm of infected cells. **Journal of General Virology**, London, v. 79, n. 10, p. 2319-2323, Oct. 1998.

AVILA, A. C. et al. Ocorrência de vírus em batata em sete estados do Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 4, p. 490-497, out./dez. 2009.

BALME-SINIBALDI, V. et al. Improvement of *Potato virus Y* (PVY) detection and quantitation using PVYN E PVYO specific real time RT-PCR assays. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 134, n. 1/2, p. 261-266, June 2006.

BARKER, H. et al. Comparison of genome sequence of PVY isolates with biological properties. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 86, n. 3, p. 227-238, June 2009.

BECZNER, L. et al. Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. **Potato Research**, Wageningen, v. 27, n. 3, p. 339-352, Sept. 1984.

BEGON, M.; MORTIMER, M. **Population ecology**: a united study of animals and plants. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1986. 256 p.

BLANCO-URGOITI, B. et al. Characterization of potato virus Y (PVY) isolates from seed potato batches: situation of the NTN, Wilga and Z isolates. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, n. 8, p. 811-819, Nov. 1998.

BOONHAM, N. et al. The detection of tuber necrotic isolate of *Potato virus Y*, and the accurate discrimination of PVYO, PVYN and PVYC strains using RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 102, n. 1/2, p. 103-112, Apr. 2002.

BOURDIN, D.; LECOQ, H. Increase in cucurbit aphid-borne yellows virus concentration by co-infection with sap-transmissible viruses does not increase its aphid transmissibility. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 141, n. 2, p. 143-152, June 1994.

CALVERT, L. A.; GHABRIAL, S. A. Enhancement by soybean mosaic virus of bean pod mottle virus titre in doubly infected soybean. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, p. 992-997, 1983.

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

CHOI, S. K. et al. Systemic movement of a movement-deficient strain of Cucumber mosaic virus in zucchini squash is facilitated by a cucurbit-infecting potyvirus. **Journal of General Virology**, London, v. 83, n. 12, p. 3173-3178, Dec. 2002.

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

CHUNG, B. Y. W. et al. An overlapping essential gene in the Potyviridae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 105, n. 15, p. 5897-5902, Apr. 2008.

COCKERHAM, G. Genetical studies on resistance to potato virus X and Y. **Heredity**, London, v. 25, n. 3, p. 309-348, Aug. 1970.

CROSSLIN, J. M. et al. First report of necrotic strain of Potato virus Y (PVYN) on potatoes in the Northwestern United States. **Plant Disease**, Quebec, v. 86, n. 10, p. 1177-1177, Oct. 2002.

DE BOKX, J. A.; HUTTINGA, H. **Potato virus Y**. Kew: Commonw Mycology Institute, 1981. 242 p.

DOUGHERTY, W. G. et al. Biochemical and mutation analysis of a plant virus cleavage site. **European Molecular Biology Organization Journal**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 1281-1287, May 1988.

DRAPER, M. D.; PASCHE, J. S.; GUMESTAD, N. C. Factors influencing PVY development and disease expression in three potato cultivars. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 79, n. 3, p. 155-165, May 2002.

ELLIS, P. et al. Production of monoclonal antibodies for detection and identification of strains of potato virus Y. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 18, n. 1, p. 64-70, 1996.

FIGUEIRA, A. R. **Manejo de doenças viróticas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 99 p.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Database collection**: agricultural data. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 18 dez. 2013.

GALVINO-COSTA, S. B. F. et al. Molecular and serological typing of *Potato virus Y* isolates from Brazil reveals a diverse set of recombinant strains. **Plant Disease**, Quebec, v. 96, n. 10, p. 1451-1458, Oct. 2012a.

GALVINO-COSTA, S. B. F. et al. A novel type of Potato virus Y recombinant genome, determined for the genetic strain PVYE. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 60, n. 2, p. 388-398, Apr. 2012b.

GLAIS, L. et al. Molecular characterization of potato virus YN isolates by PCR-RFLP. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 102, n. 7, p. 656-662, Sept. 1996.

GLAIS, L. et al. RFLP mapping of the whole genome of ten viral isolates representative of different biological groups of Potato virus Y. **Archives of Virology**, Amsterdam, v. 143, p. 2077-2091, 1998.

GLAIS, L.; TRIBODET, M.; KERLAN, C. Genomic variability in *Potato virus Y* (PVY): evidence that PVYN-W and PVYNTN variants are single to multiple recombinants between PVYO and PVYN isolates. **Archives of Virology**, New York, v. 147, n. 2, p. 363-378, Feb. 2002.

GLAIS, L.; TRIBODET, M.; KERLAN, C. Specific detection of the PVYNW variant of *Potato virus Y*. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 125, n. 2, p. 131-136, May 2005.

GOLDBERG, K. B.; BRAKKE, M. K. Concentration of maize chlorotic mosaic virus increased in mixed infections with maize dwarf mosaic virus strain B. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 77, p. 162-167, 1987.

GRAY, S. et al. An evolution concern for potato crops in the United States and Canada. **Plant Disease**, Quebec, v. 94, n. 12, p. 1384-1397, Dec. 2010.

HADIDI, A. et al. Detection of potato leaf roll and strawberry mild-yellow-edge luteoviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. **Plant Disease**, Quebec, v. 77, n. 6, p. 577-595, 1993.

HEUVEL, J. F. J. M. van den et al. Characteristics of a resistance-breaking isolate of potato virus Y causing tuber necrotic disease. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 100, n. 5, p. 347-356, Oct. 1994.

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

HUANG, P.; YAN, Q.; DIN, G. Y. Occurrence and control of potato virus S in Guizhou. **Guizhou Agricultural Sciences**, Ontario, v. 37, n. 8, p. 88-89, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.
Levantamento sistemático de produção agrícola. Rio de Janeiro, 2014.
Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/>>.
Acesso em: 10 mar. 2014.

JEFFRIES, C. **FAO/IPGRI technical guidelines for the safe movement of germplasm**. Rome: FAO, 1998. 177 p.

JOHNSTON, G. R.; ROWBERRY, R. G. Yukon gold: a new yellowfleshed, medium-early high quality table and French-fry cultivar. **American Potato Journal**, Orono, v. 58, n. 5, p. 241-244, May 1981.

JONES, R. A. C. Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potatocultivars. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 117, n. 1, p. 93-105, Aug. 1990.

KARASEV, A. V. et al. Serological properties of ordinary and necrotic isolates of *Potato virus Y*: a case study of PVYN misidentification. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 87, n. 1, p. 1-9, Feb. 2010.

KASSCHAU, K. D.; CRONIN, S.; CARRINGTON, J. C. Genome amplification and long distance movement functions associated with the central domain of Tobacco etch potyvirus helper component proteinase. **Virology**, Orlando, v. 228, n. 2, p. 251-262, Feb. 1997.

KERLAN, C. **Potato virus Y**: descriptions of plant viruses. Warwick: AAB, 2006. (Association of Applied Biologists, 414). Disponível em: <<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=414>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

KERLAN, C. et al. Identification of the molecular make-up of the *Potato virus Y* strain PVYZ: genetic typing of PVYZ-NTN. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, n. 9, p. 1052-1060, Sept. 2011.

KERLAN, C.; LE ROMANCER, M. Potato tuber necrotic ringspot disease. In: EAPR MEETING VIROLOGY SECTION, 1., 1999, Vitoria-Gasteiz. **Proceedings...** Vitoria-Gasteiz: The European Association for Potato Research, 1999. p. 77-79.

KHURANA, S. M. P. Potato viruses and their management. In: NAQVI, S. A. M. H. (Ed.). **Diseases of fruits and vegetables**: diagnosis and management. Dordrecht: Kluwer Academic, 2004. v. 2, p. 389-440.

KOGOVSĚK, P. et al. Single-step RT real time PCR for sensitive detection and discrimination of *Potato virus Y* isolates. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 149, n. 1, p. 1-11, Apr. 2008.

LORENZEN, J. H. et al. A multiplex PCR assay to characterize *Potato virus Y* isolates and identify strain mixtures. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 7, p. 935-940, July 2006.

LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: diversity, detection and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.

MARTIN, D. P. et al. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 19, p. 2462-2463, Oct. 2010.

MCDONALD, J. G.; KRISTJANSSON, G. T. Properties of strains of potato virus YN in North America. **Plant Disease**, Quebec, v. 77, n. 1, p. 87-89, Feb. 1993.

MCDONALD, J. G.; SINGH, R. P. Host range, symptomology and serology of isolates of potato virus Y (PVY) that shared properties with the PVYN and PVYO strain groups. **American Potato Journal**, Orono, v. 73, n. 7, p. 309-315, July 1996.

MONTERO-ASTÚA, M. et al. First report of *Xylella fastidiosa* in avocado in Costa Rica. **Plant Disease**, Quebec, v. 92, n. 1, p. 175-176, 2008.

MORTENSEN, R. J. et al. Characterization of viruses infecting potato plants from a single location in Shetland, an isolated Scottish archipelago. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, n. 9, p. 633-640, Sept. 2010.

MURPHY, J. F.; JÄRLEFORS, U.; SHAW, J. G. Development of cylindrical inclusions in Potyvirus-infected protoplasts. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 4, p. 371-374, Apr. 1991.

NIE, X.; SINGH, R. P. Evolution of North American PVYNTN strains Tu 660 from local PVYN by mutation rather than recombination. **Virus Genes**, Norwell, v. 26, n. 1, p. 39-47, Feb. 2003.

NIE, X.; SINGH, R. P. A new approach for the simultaneous differentiation of biological and geographical strains of *Potato virus Y* by uniplex and multiplex RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 104, n. 1, p. 41-54, June 2002.

PICHE, L. M. et al. Diversity among Potato virus Y isolates obtained from potatoes grown in the United States. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 12, p. 1368-1375, Dec. 2004.

PRUSS, G. et al. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 6, p. 859-868, June 1997.

RAMALHO, T. O. **Caracterização genômica de isolados de Potato virus Y (PVY) e determinação do seu efeito em plantas de batata cv. Ágata**. 2012. 89 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

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

ROBERTS, I. R. et al. Ultrastructural and temporal observations of the potyvirus cylindrical inclusions (CIs) show that the CI protein acts transiently in aiding virus movement. **Virology**, Orlando, v. 245, n. 1, p. 173-181, May 1998.

ROBLES-HERNÁNDEZ, L. et al. First identification of an unusual recombinant Potato virus Y strain in potato in Mexico. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 10, p. 1262-1266, Oct. 2010.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUM, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. Saint Paul: APS, 2001. 373 p.

SHAND, K. et al. Expression of *Potato virus Y* cytoplasmatic inclusion protein in tobacco results in disorganization of parenchyma cells, distortion of epidermal cells, and membrane whorls and atypical lipid accumulation. **Micron**, New York, v. 40, n. 7, p. 730-736, Oct. 2009.

SHI, X. et al. Mutations in the region encoding the central domain of helpercomponent-proteinase (HC-Pro) eliminate *Potato virus X*/potyviral synergism. **Virology**, Orlando, v. 231, n. 1, p. 35-42, Apr. 1997.

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

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

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

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

SINGH, R. P. et al. Possible escape of a recombinant isolate of Potato virus Y by serological indexing and methods of its detection. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, n. 6, p. 679-685, June 2003.

SOUZA-DIAS, J. A. C. Raças do vírus Y da batata (PVY) e a questão da variante NTN. **Batata Show**, Itapetininga, v. 1, n. 2, p. 16-21, 2001.

TRIENNIAL CONFERENCE OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR POTATO RESEARCH, 7., 1978, Warsaw. **Abstracts...** Warsaw: EAPR, 1978. p. 244.

URCUQUI-INCHIMA, S.; HAENNI, A. L.; BERNARDI, F. Potyvirus proteins: a wealth of functions. **Virus Research**, Amsterdam, v. 74, n. 1/2, p. 157-175, Apr. 2001.

VALKONEN, J. P. T. Potato viruses: economic losses and biotechnological potential. In: VIOLA, R. et al. (Ed.). **Potato biology and biotechnology**. San Diego: Elsevier, 2007. p. 619-641.

VANCE, V. B. Replication of potato virus X RNA is altered in coinfections with potato virus Y. **Virology**, Orlando, v. 182, n. 2, p. 486-494, June 1991.

VANCE, V. B. et al. 5' proximal potyviral sequence mediate Potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. **Virology**, Orlando, v. 206, n. 1, p. 583-590, Jan. 1995.

WANG, Z. K. A. et al. Comparison of PCR, BIO-PCR, DIA, ELISA and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 48, n. 2, p. 245-252, Apr. 1999.

WATSON, M. A. Evidence for interaction or genetic recombination between potato viruses Y and C in infected plants. **Virology**, Orlando, v. 10, p. 211-232, 1960.

WEIDEMANN, H. L.; MAISS, E. Detection of the potato tuber necrotic ringspot strain of potato virus Y (PVYNTN) by reverse transcription and immunocapture polymerase chain reaction. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Berne, v. 103, n. 4, p. 337-345, Aug. 1996.

WOROBAY, M.; HOLMES, E. C. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. **General Virology**, London, v. 80, n. 10, p. 2535-2543, Oct. 1999.

ZHANG, X. S.; HOLT, J.; COLVIN, J. Synergism between plant viruses: a mathematical analysis of the epidemiological implications. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 50, n. 6, p. 732-746, Dec. 2001.