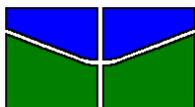


UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA ESPÉCIE DE  
*Potyvirus* INFECTANDO MANDIOQUINHA-SALSA**

**ANELISE FRANCO ORÍLIO**

**BRASÍLIA – DF  
2007**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

## **CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA ESPÉCIE DE *Potyvirus* INFECTANDO MANDIOQUINHA-SALSA**

**ANELISE FRANCO ORÍLIO**

Dissertação apresentada ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

BRASÍLIA – DF  
2007

Trabalho desenvolvido junto ao Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (Embrapa Hortaliças), sob a orientação da Dra. Alice Kazuko Inoue-Nagata e com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Banca examinadora:

---

Dra. Alice Kazuko Inoue-Nagata (Orientadora)  
Universidade de Brasília  
Embrapa Hortaliças

---

Dr. Renato de Oliveira Resende  
Universidade de Brasília

---

Dra. Simone da Graça Ribeiro  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Suplente:

Dr. Paulo de Tarso de Oliveira Ferreira – Universidade de Brasília

*A Deus e a Nossa Senhora Aparecida,*  
pela presença constante em minha vida,  
**OFEREÇO**

Aos meus pais, *Antônio & Sernelita*, a minhas irmãs, *Anelita*  
*e Aline*, a minha sobrinha *Giovanna* e ao meu namorado  
*Cleber*, pelo carinho, incentivo, confiança, apoio constante e  
alegrias vividas, com amor,  
**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela minha vida, oportunidade e a graça de mais uma etapa alcançada.

Com muita admiração a Dra. Alice Kazuko Inoue-Nagata, pela orientação, apoio, confiança, paciência, amizade, incentivo profissional e pelo exemplo de dedicação científica.

Ao Dr. André Nepomuceno Dusi, por me permitir iniciar uma carreira científica, pelo apoio, confiança e orientação.

Ao Dr. Nuno Rodrigo Madeira, pelo incentivo, apoio e colaboração na realização deste trabalho.

Ao Dr. Tatsuya Nagata por estimular a iniciar uma carreira científica, juntamente aos demais professores da Universidade Católica de Brasília, que muito contribuíram em minha formação como bióloga.

Ao Dr. Bergmann Morais Ribeiro pela contribuição no trabalho de microscopia eletrônica.

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, pela oportunidade de aprendizado, em especial ao professor Renato Resende, pela atenção e empenho em meu crescimento profissional. A todos os funcionários do departamento de fitopatologia e em especial ao Ribamar Frazão, Silene Ramalho, Kamila Araújo, Leila Santos e César Castro, pela disposição constante em ajudar, incentivar e apoiar os alunos do departamento.

A professora Dr. Cláudia Renata Fernandes Martins, pelo exemplo de professora, pesquisadora e mulher. Sempre muito organizada, dedicada e disposta a ensinar. Uma estrela que sempre irá brilhar.

Aos amigos do curso de pós-graduação em Fitopatologia pelos momentos de aprendizado e alegrias: Keize, Patrícia, Cristiane, Leonardo A., Silvia, Eliane, Leonardo M., Leonardo L., Magno, Gisele, Sebastião, Ana Paula, Jaqueline, Paulo, Uéllen, Leandro, Rafael, Marcelo, Débora Melo, Reinaldo, Magali, Edinalva, Michele, Andreza, Éder, Carolina e Ana Angélica.

A Embrapa Hortaliças, e aos pesquisadores Dr. Antônio Carlos de Ávila, a Dra. Nirlene Junqueira Vilela, Dr. Antônio Carlos Torres e aos funcionários Hamilton, Oneilson, Leni e Getúlio pelo auxílio, atenção e ensinamentos.

Ao amigo e funcionário da Embrapa Hortaliças, Lúcio Flávio (LF), pela contribuição direta na realização deste trabalho, com auxílio, ensinamentos, amizade e apoio.

A Élcio Lopes, pelo grande aprendizado.

Aos amigos que contribuíram para tornar as horas de trabalho ainda mais agradáveis: Cristiane, Carmen, Carolina, Edimércia, Érico, Fabrício, Filipe, Gleydson, Juliano, Keizeane, Leonardo, Lindolfo, Mariana H., Mariana M., Patrícia, Paulo, Pedro Paulo, Rita, Sarah, Silvia, Taís, Vinícius e Wesley.

A toda minha família, especialmente a meus pais, por terem sido o contínuo apoio em todos os anos, ensinando-me o principal, a importância de construir os meus próprios valores. Ao meu namorado, por me apoiar, incentivar, me erguer, estar sempre presente, confiança, compreensão e ao seu amor.

A todos os meus amigos, que compreenderam a minha ausência e sempre me incentivaram, muito obrigada!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida para realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

PREFÁCIO.....	2
DEDICATÓRIA.....	4
AGRADECIMENTOS.....	5
SUMÁRIO.....	7
INTRODUÇÃO GERAL.....	9
CAPÍTULO 1: Revisão Bibliográfica.....	11
CAPÍTULO 2: Caracterização de uma nova espécie de <i>Potyvirus</i> isolada de mandioquinha-salsa no Brasil.....	33
2.1. Introdução.....	33
2.2. Material e métodos.....	35
2.2.1. Local de realização do trabalho, origem do isolado e manutenção.....	35
2.2.2. Círculo de hospedeiros.....	35
2.2.3. Transmissão por inseto-vetor.....	36
2.2.4. Purificação da partícula viral.....	37
2.2.5. Microscopia eletrônica.....	38
2.2.6. Produção de anti-soro policlonal.....	38
2.2.7. Teste eficiência anti-soro bruto - ELISA indireto.....	39
2.2.8. Teste eficiência IgG e IgG-conjugada – DAS-ELISA.....	40
2.2.9. Dot-ELISA.....	41
2.2.10. Análise proteína.....	41
2.2.10.1. SDS-PAGE.....	42
2.2.10.2. <i>Western blotting</i> .....	42
2.2.11. Extração do RNA total.....	43
2.2.12. Síntese da primeira fita do cDNA da região 3' terminal.....	43
2.2.13. Amplificação via PCR e confirmação por eletroforese em gel de agarose.....	44
2.2.14. Clonagem.....	45
2.2.15. Seleção dos clones recombinantes.....	46

2.2.16. Sequenciamento e análise das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos.....	47
2.2.17. Desenvolvimento de ferramenta de detecção por RT-PCR.....	48
2.2.18. Avaliação do banco de germoplasma de mandioquinha-salsa da Embrapa Hortaliças por ELISA.....	48
2.2.19. Obtenção plantas livres de vírus.....	49
2.3. Resultados.....	50
2.4. Discussão.....	66
CAPÍTULO 3: Clonagem do genoma de Arracacha mottle virus.....	71
3.1. Introdução.....	71
3.2 Material e métodos.....	73
3.2.1. Desenho primers.....	73
3.2.2. Extração do RNA viral.....	73
3.2.3. Síntese da primeira fita do cDNA.....	74
3.2.4. Amplificação via PCR e confirmação por eletroforese em gel de agarose.....	75
3.2.5. Preparo de células competentes para eletroporação.....	76
3.2.6. Clonagem.....	76
3.2.7. Seleção dos clones recombinantes.....	78
3.2.8. Sequenciamento e análise das seqüências.....	79
3.3. Resultados.....	81
3.4. Discussão.....	88
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
RESUMO.....	93
ABSTRACT.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

## INTRODUÇÃO GERAL

A mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) é um alimento essencialmente energético, com propriedades diuréticas e alta digestibilidade (Pereira, 1997). É originária da região andina (Zanin & Casali, 1984) e foi introduzida no Brasil no início do século passado (Balbino *et al.* 1990; Souza, 1992; Santos & Carmo, 1998). A planta de mandioquinha-salsa tem grande importância social e econômica nas regiões onde seu cultivo é intenso (Madeira & Souza, 2004). O mercado é amplo nas regiões sul e sudeste, onde é comum seu consumo, com a produção abaixo da demanda, atingindo elevadas cotações e com pequena oscilação de preços (Henz, 2001).

No Brasil, apesar de diferentes denominações, o cultivo da mandioquinha-salsa se restringe a poucas cultivares com grande uniformidade genética, decorrente da introdução de reduzido número de clones no país e pela sua propagação ser essencialmente vegetativa (Giordano *et al.*, 1995). A uniformidade genética limita a expansão do cultivo em regiões que apresentam condições climáticas diferentes das tradicionais e eleva os riscos de incidência de pragas, principalmente aquelas causadas por vírus. (Santos, 1997).

Sete vírus foram relatados para mandioquinha-salsa na região andina. Nenhum destes vírus foi oficialmente registrado no Brasil, mas há evidências de que grande parte do material de mandioquinha-salsa cultivado no Brasil está infectado com vírus. Madeira (2004) verificou que 95 % de plantas da cultivar Amarela de Carandaí e 78,6 % da Amarela de Senador Amaral coletadas em Brasília-DF em 2001 estavam possivelmente infectadas com vírus a partir de testes de inoculação em plantas indicadoras. Porém, a identificação e caracterização destes vírus não foram realizadas, sendo apenas observadas por microscopia eletrônica partículas alongadas e flexuosas semelhantes a de *Potyvirus*.

A exemplo do que ocorre com outras hortaliças propagadas vegetativamente, como alho e batata-doce, plantas de mandioquinha-salsa afetadas por viroses podem apresentar menor desenvolvimento e produção em relação a plantas sadias. A avaliação da disseminação e dos prejuízos que uma doença causa somente poderá ser realizada quando ferramentas de diagnose forem disponíveis. Logo, estudos de caracterização e detecção, com técnicas adequadas, são imprescindíveis para a realização de um levantamento sistematizado de vírus e avaliação de perdas em mandioquinha-salsa no Brasil.

Devido a esses fatores, o objetivo desse trabalho foi caracterizar em nível biológico, sorológico e molecular um vírus isolado de mandioquinha-salsa coletada em Brasília, DF. Em nível biológico, foi realizado a inoculação mecânica do isolado de potyvírus em plantas da espécie *Apiaceae*, bem como em plantas de outras famílias, o vírus também foi transmitido de maneira não-persistente por afídeos e a partícula viral foi observada por microscopia eletrônica. A caracterização sorológica consistiu da purificação da partícula viral, produção de anti-soro policlonal, análise da proteína da capa por gel de poliacrilamida e *Western blotting*, e da avaliação de amostras de mandioquinha-salsa do campo por ELISA. Molecularmente, a extremidade 3' do genoma de *Potyvirus* foi clonada e sequenciada, primers específicos foram desenhados para a proposição de ferramenta de detecção por RT-PCR, e o genoma parcial foi clonado e sequenciado.

A dissertação está dividida em 3 capítulos:

O capítulo 1 apresenta a revisão bibliográfica sobre mandioquinha-salsa e a família *Potyviridae*.

O capítulo 2 descreve a caracterização biológica, sorológica e molecular de uma nova espécie de *Potyvirus* que foi isolada de mandioquinha-salsa em Brasília, DF.

No capítulo 3, é apresentada a clonagem e sequenciamento parcial do genoma de *Arracacha mottle virus*.

## CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

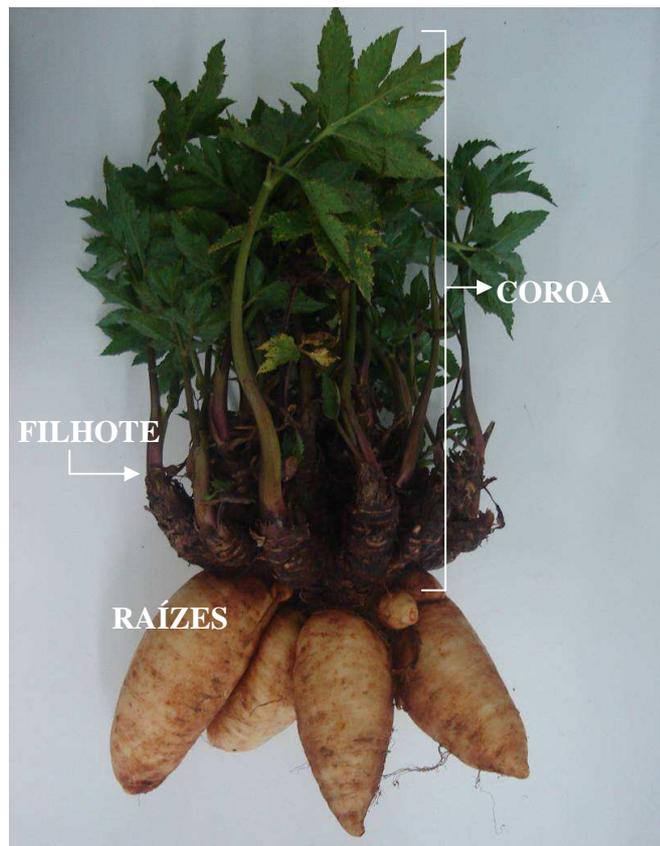
### Cultura da mandioquinha-sala

A mandioquinha-salsa é uma planta eudicotiledônea, da ordem Umbellales, família Apiaceae (Umbelliferae), gênero *Arracacia*, espécie *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. A família das apiáceas compreende também outras hortaliças importantes, como cenoura, salsa, coentro, aipo (salsão) e erva-doce (funcho). Em 1825, a partir de plantas coletadas na Jamaica, Bancroft a classificou taxonomicamente estabelecendo o gênero e a espécie.

A planta de mandioquinha-salsa é descrita como de ciclo de vida anual, bi-anual ou perene. Raras vezes ela completa seu ciclo, pois a colheita é realizada antes do florescimento, ao final do estágio vegetativo (Hermann, 1997). O caule compõe-se de uma cepa ou coroa, de cuja parte superior saem as ramificações curtas, os rebentos, filhotes ou propágulos, de onde nascem as folhas de formato pinatisectas (Zanin & Casali, 1984). Esse conjunto forma a coroa (Bustamante, 1994), também chamada de touça ou touceira (Figura 1.1).

Da parte inferior da cepa saem as raízes tuberosas, que constituem a parte comercializável, com coloração variando de branco a amarelo intenso ou púrpura-escuro, de acordo com o clone. Estas raízes são produzidas em número de seis ou mais por planta (Filgueira, 2000). O mercado brasileiro, porém, apresenta preferência por raízes de formato cônico alongado e de coloração amarela (Santos *et al.*, 1991).

A mandioquinha-salsa é originária nos Andes no norte da América do Sul, compreendendo as montanhas andinas da Colômbia, Peru, Bolívia, Equador e Venezuela, onde seu cultivo é realizado de forma rudimentar e de subsistência, sendo essencial à alimentação da população indígena (Zanin & Casali, 1984). Bukasov (1981) afirma que é a planta cultivada mais antiga da América do Sul e seu cultivo entre os Chibchas de Bogotá pode ter antecedido o da batata e o do milho. Na Colômbia é onde se encontra a maior variabilidade de clones do gênero *Arracacia*, o que tem levado a concluir que lá seja seu verdadeiro centro de origem (León, 1964).



**Figura 1.1:** Planta de mandioquinha-salsa. Parte superior denominada de coroa, de onde saem os filhotes ou propágulos, e a parte inferior as raízes que é a parte comercializável.

A colonização da região andina pelos espanhóis praticamente em nada alterou a situação evolutiva e agrônômica da mandioquinha-salsa até os dias de hoje (Santos & Silva, 1998).

Em razão de ter como centro de origem os vales situados na parte norte da Cordilheira dos Andes, onde a altitude varia de 1.700 a 2.500 m e as temperaturas oscilam entre 15 e 18 °C, a cultura se estabeleceu em regiões cujo clima se assemelha àquele de seu habitat, mas várias tentativas de aclimação em países de clima temperado fracassaram, porque a planta não chegou a formar raízes comestíveis (Casali & Sedyama, 1997). O seu cultivo difundiu-se no século passado pela América Central e Antilhas.

A introdução da mandioquinha-salsa no Brasil é imprecisa quanto à data e circunstâncias. Há quem mencione, que sua introdução foi feita pelo Barão de Friburgo, no início do século passado, a partir de mudas provenientes das Antilhas; daí o nome popular

pelo qual é conhecida no estado do Rio de Janeiro, "baroa" ou "batata-baroa" (Zanin & Casali, 1984). Porém, há relatos que foi introduzida por ocasião de uma reunião da Sociedade de Agricultura, em julho de 1907, por oferta do general colombiano Rafael Uribe Uribe, quando de sua estadia no Brasil (Jaramillo, 1952; Zanin & Casali, 1984).

A mandioquinha-salsa disseminou-se pelos estados de Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Espírito Santo e São Paulo, dentre outros, em regiões de clima ameno com altitudes entre 800 e 1.500 m, onde ocorrem condições climáticas similares às do seu local de origem (Santos, 1993). Mais recentemente, a cultura expandiu-se pelos estados de Goiás, Tocantins e Distrito Federal (Santos & Silva, 1998).

De acordo com a região de cultivo, essa hortaliça recebe várias denominações: baroa ou batata-baroa (Rio de Janeiro, Espírito Santo, Zona da Mata mineira), mandioquinha ou mandioquinha-salsa (São Paulo), fiuza ou batata-fiuza (Lavras e região), batata-salsa (Paraná e Santa Catarina), cenoura-amarela (Barbacena e região), dentre outras. No meio científico, tenta-se uniformizar a denominação para mandioquinha-salsa. Nos países de língua espanhola, o nome mais comum é *arracacha*, sendo bastante usados também as denominações de *virraca*, *zanahoria blanca* e *apio*. Em inglês, nas publicações aparece *arracacha* e *peruvian carrot* (Santos *et al.*, 1991; Carmo *et al.*, 1996).

Segundo Pereira (1997), a mandioquinha-salsa é um alimento essencialmente energético, pois em relação aos demais nutrientes, os teores de carboidratos (amido e açúcares totais) se destacam. Destes, cerca de 80 % correspondem a amido e 6 % a açúcares totais. As proteínas são incompletas, como ocorre em outras raízes e tubérculos, devido à deficiência da maioria dos aminoácidos essenciais. Das vitaminas presentes, a niacina e a vitamina A são as mais importantes, mas também suas raízes são ricas em vitaminas do complexo B (riboflavina e piridoxina) (Monteiro *et al.*, 1993). Dos carotenóides, o beta-caroteno corresponde à maior fração. É excelente fonte de cálcio, fósforo e ferro. Comparando-se os teores desses minerais com as necessidades diárias de consumo de crianças, adultos, gestantes e nutrízes, Pereira (1997) conclui que o consumo diário de 100 g de mandioquinha-salsa seria o suficiente para suprir as necessidades desses minerais. Devido a estes fatores, a sua alta digestibilidade (baixo teores de amilopectina e ausência total de fatores antinutricionais) e propriedades diuréticas, é especialmente recomendada na alimentação de crianças, pessoas idosas e convalescentes (Avelar Filho, 1989).

A mandioquinha-salsa é muito apreciada pelas características organolépticas que confere às sopas que com ela se faz, sendo assim muito utilizada no inverno, na forma de sopas e cremes (Monteiro *et al.*, 1993), mas é utilizada em outras inúmeras formas, como fritas fatiadas, com frango caipira, purê, pães doces e salgados.

O mercado é amplo nas regiões onde é comum o consumo de mandioquinha-salsa, devido ao pequeno volume comercializado, com a produção abaixo da demanda. É o caso das regiões Sudeste e Sul, onde a cultura é extremamente compensatória. Já nas regiões Norte e Nordeste, além de parte do Centro-Oeste a mandioquinha-salsa é, para a maioria da população, desconhecida. Recentemente, porém, tem-se observado tendência de expansão da cultura para o Planalto Central. É crescente, ainda, a demanda de mandioquinha-salsa como matéria-prima para indústrias alimentícias na forma de sopas, cremes, pré-cozidos, papinhas, chips, purês. Com a industrialização do produto, abre-se mais uma possibilidade, a exportação, complicada para o produto *in-natura*, em função da sua reduzida conservação pós-colheita (Madeira & Souza, 2004).

Com relação à parte aérea, existem registros de sua utilização na alimentação animal. Entretanto, nada é dito a respeito do valor que esse material poderia ter sob o aspecto nutricional; sabe-se somente que, pela aceitação por parte do gado, seria um alimento altamente palatável.

A mandioquinha-salsa é considerada uma cultura rústica, com baixos requerimentos em termos de fertilizantes e agrotóxicos, possui ciclo longo (6 a 16 meses) e alcança geralmente altos preços no mercado, tendo grande importância social e econômica nas regiões onde seu cultivo é intenso. Devido ao seu ciclo longo, demanda considerável mão-de-obra, sendo importante em pequenas áreas, especialmente para o sistema de agricultura familiar. As raízes atingem elevadas cotações, sendo que o preço do quilo para a classe Extra AAA, a mais comercializada (70% ou mais) foi cotada em R\$ 2,63 (CEAGESP, 2007), e a oscilação de preços é pequena durante o ano, com preço médio (setembro de 2006 a agosto de 2007) de R\$ 23,87 (caixa K, com 22kg), quando comparada a outras hortaliças. O que minimiza o risco de insucesso, sendo portanto ótima opção para o pequeno e médio produtor (Madeira & Souza, 2004).

A produção atualmente, concentra-se na América do Sul, especialmente no Brasil, Colômbia, Venezuela e Equador, e em menor escala, no Peru e Bolívia, sendo também

esporadicamente cultivada na América Central (Hermann, 1997). Atualmente, o Brasil é o maior produtor de mandioquinha-salsa no mundo, concentrando na região centro-sul do país (Reghin *et al.*, 2000).

O maior mercado atacadista de mandioquinha-salsa no Brasil é o CEAGESP. Neste, o movimento comercial de mandioquinha-salsa, atingiu em 2005 o total de 16,3 mil toneladas, procedentes de Minas Gerais (30 %), Paraná (27,8 %), São Paulo (21,4 %) e outras localidades (20,8 %) (Vilela & Madeira, 2006).

Santos *et al.* (2000) apresentaram dados detalhados de que, só no Paraná, a produção foi superior a 72 mil toneladas produzidas, em cerca de 7.600 ha com produtividade média de 9.500 kg.ha<sup>-1</sup>, envolvendo diretamente quase 3400 famílias. Profissionais que trabalham com a cultura estimam, no Brasil, área de cultivo anual superior a 20 mil hectares, com produtividade média de 8 a 9 t.ha<sup>-1</sup>.

De acordo com a Hortibrasil (2007), no Brasil cultiva-se aproximadamente 23.000 ha, com uma produção média de 250.000 t. ano de mandioquinha-salsa. Estima-se que cerca de 95 % deste volume seja consumido *in natura* e que o restante seja absorvido pelas indústrias. A falta de padronização do produto na comercialização é um grande obstáculo à adoção dos conhecimentos técnicos gerados pela pesquisa e ao aperfeiçoamento da qualidade do produto.

Uma planta individual pode produzir até 3 kg de raízes, e sua produtividade média situa-se entre 5 e 15 t. ha<sup>-1</sup>, mas em parcelas experimentais pode alcançar até 40 t. ha<sup>-1</sup> (Henz, 2001). Tendo-se o custo de produção total de R\$ 8.600 e produção estimada em 22 t. ha<sup>-1</sup> ou 1000 caixas por ha, chega-se a um custo de R\$ 8,60 por caixa de mandioquinha-salsa (Madeira & Souza, 2004).

No Brasil, os principais produtores de mandioquinha-salsa são os estados do Paraná, Minas Gerais e São Paulo. Em 2006, a produção de mandioquinha-salsa no Paraná foi de 56.000 t. ano colhida em uma área de 4.500 ha com produtividade de 12 t. ha<sup>-1</sup>. Em Minas Gerais a produção foi de 16.000 t. ano colhida em uma área de 750 ha com produtividade de 21 t. ha<sup>-1</sup> (Emater – MG), e em São Paulo a safra foi de 6.000 t.ano, em uma área de 414 ha com produtividade de 14 t. ha<sup>-1</sup> (CATI/IEA-SP).

Esses dados podem não representar a realidade de produção de mandioquinha-salsa no Brasil, devido à boa parte da produção ser comercializada diretamente do produtor ao

varejista, não passando pelas centrais de abastecimento e, conseqüentemente, não sendo computada em dados oficiais.

Santos *et al.* (2000) relata que no estado do Paraná observou-se um grande aumento na área de cultivo, passando de cerca de 3.000 ha para aproximadamente 8.000 ha com produtividade média de 9.500 kg.ha<sup>-1</sup>. Minas Gerais é o segundo maior produtor, com produção em cerca de 6.000 ha (Santos, 1997).

Segundo Henz (2002), esta cultura apresenta mercado cativo e crescente, gozando da reputação de ser produto saudável, condição que deve ser preservada e melhor explorada, adequando facilmente a sistemas orgânicos de produção em função de sua rusticidade.

No Brasil, apesar das diferentes denominações, observa-se no campo que a mandioquinha-salsa restringe-se a poucas cultivares, com características semelhantes e grande uniformidade genética decorrente do cultivo de reduzido número de clones introduzidos no país e do fato da propagação ser vegetativa (Giordano *et al.*, 1995). A mandioquinha-salsa cultivada no Brasil apresenta raízes com tonalidade de coloração amarela e, em menor escala, branca. É propagada assexuadamente há séculos, podendo ser, na verdade, um único clone (Soares, 1991).

A uniformidade genética traz riscos com relação a pragas e limita a expansão do cultivo em regiões que apresentam condições climáticas diferentes das tradicionais (Santos, 1997). Existem observações de que a mandioquinha-salsa proveniente do Paraná apresenta coloração creme à amarela mais clara, porém esta variação decorre, provavelmente, de influências ambientais (Santos *et al.*, 1991).

A cultivar Amarela de Carandaí ou Amarela Comum é o material tradicionalmente cultivado e consumido no Brasil, caracterizando-se pelo alto nível produtivo, raízes de formato cônico-cilíndrico, coloração amarela intensa, sabor e odor característico. Na verdade, não se trata de cultivar oficial, não tendo seus descritores reconhecidos e registrados.

A única cultivar lançada oficialmente no Brasil é a Amarela de Senador Amaral, oriunda de um programa de melhoramento genético conduzido na Embrapa Hortaliças, com seus descritores morfológicos reconhecidos. Esta cultivar foi obtida por meio de seleção de clones originários de sementes botânicas do material tradicionalmente cultivado, coletadas

no município de Senador Amaral, sul de Minas Gerais, com produtores locais (Madeira & Souza, 2004). Outros materiais também são cultivados em menor escala comercial no Brasil.

A mandioquinha-salsa é exclusivamente propagada de forma vegetativa, por meio de filhotes, também ditos rebentos ou propágulos, o que pode propiciar a ocorrência de uma carga considerável de patógenos degenerativos, principalmente vírus.

Após alguns anos de cultivo em regiões tradicionais, o incremento produtivo da cultivar Amarela de Senador Amaral, observado nos primeiros anos após seu lançamento, vem decaindo (Nuno Rodrigo Madeira, informação pessoal). Possivelmente, por ter sido a cultivar Amarela de Senador Amaral originada a partir de sementes botânica, o material deveria estar isento de infecção por vírus. Com o passar do tempo, é provável que houve infestações sucessivas por vírus distintos, degenerando a qualidade sanitária do material de propagação.

## **Pragas**

Mesmo sendo a mandioquinha-salsa considerada uma planta bastante rústica, com baixa utilização de insumos e reduzido custo de produção, os insetos, as bactérias e os fungos podem causar danos significativos. Por possuir um ciclo relativamente longo, dificilmente um cultivo de mandioquinha-salsa atingirá o ponto de colheita sem apresentar problema com algum tipo de praga (Henz, 2002).

Em algumas regiões brasileiras, a cultura da mandioquinha-salsa tem aumentado de importância, devido ao incremento da área plantada e do consumo. Mesmo assim o número de trabalhos de pesquisa publicados sobre pragas nos últimos anos é relativamente pequeno, mesmo nos países andinos, onde também é cultivada. Perdas economicamente significativas devidas às doenças podem ocorrer, quando cuidados básicos de manejo da cultura não são tomados (Lopes & Henz, 1997).

De acordo com observações de campo de Hermann (1997) o ácaro (*Tetranychus urticae*) é freqüentemente encontrado e causa um dos mais sérios problemas na cultura, juntamente com os pulgões, sendo estes também possíveis transmissores de vírus. Recentemente produtores vêm reclamando do decréscimo da produção, o que

provavelmente deve estar relacionado a viroses, já que é uma cultura de propagação vegetativa. Atualmente, os vírus nesta cultura podem estar levando a grande perda de produção, evidenciando uma demanda urgente em pesquisa com este tema.

Não existem agrotóxicos registrados no Ministério da Agricultura e do Abastecimento para o controle de insetos e ácaros associados à mandioquinha-salsa no Brasil. As empresas produtoras de agroquímicos desconhecem a importância econômica da mandioquinha-salsa, faltando informações sobre produtos com potencial de mercado para combate aos principais problemas na cultura e a dimensão do mercado potencial.

Os principais artrópodes associados à cultura da mandioquinha-salsa são:

**Broca** – *Conotrachelus cristatus*. Trata-se de um coleóptero da família dos Curculionídeos, com cerca de 5 a 7 mm de comprimentos e de coloração marrom escura, com larva de coloração branca-creme a parda que podem atingir 10 mm de comprimento. Suas larvas penetram pelo pecíolo das folhas e se dirigem para a base da planta, construindo inúmeras galerias, inviabilizando a utilização dos filhotes para plantio de novas lavouras. A ocorrência de podridões torna-se generalizada. Iniciam seu ataque pelas bordas da lavoura, de onde se disseminam para todo o campo. Podem atacar plantas novas ou já desenvolvidas (Fornazier, 1995). Em São Paulo, foi constatado um ataque severo dessa broca em 100% das mudas, em 1984, o que foi considerado um dos fatores responsáveis pela redução de área cultivada no Estado (Zanin, 1984).

**Ácaro-rajado** – *Tetranychus urticae*. Os ácaros são pequenos aracnídeos, com cerca de 0,3 a 0,5 mm de comprimento, causadores de danos a diversas culturas, pela sucção de seiva e transmissão de viroses. O ácaro-rajado forma colônias na face inferior das folhas, construindo pequenas teias. Os sintomas de ataque são observados devido ao prateamento da face inferior das folhas associado à presença de teias, e na face superior, formam-se pequenas pontuações amareladas que aumentam em quantidade com o aumento da população da praga. As folhas podem se tornar inteiramente amareladas, causando o definhamento generalizado da planta e conseqüente redução da produtividade (Fornazier & Santos, 1998). Essa praga ocorre em reboleiras (Balbino *et al.*, 1990) e quando se trata de infestação do material de propagação, as reboleiras ocorrem dispersas na lavoura. Quando essas se iniciam nas extremidades da lavoura, provavelmente se trata de fonte externa de infestação, pela migração de ácaros alojados em outras plantas hospedeiras nos arredores.

Temperaturas elevadas, baixas precipitações e excesso de adubação nitrogenada favorecem o aumento populacional de ácaros. Portanto, adubações nitrogenadas cuidadosas e o uso de irrigação por aspersão são fatores que minimizam a população da praga. O controle da expansão das reboleiras, pela retirada de plantas muito atacadas, também é medida que pode reduzir a disseminação do ácaro.

**Pulgões** - Destacam-se os gêneros *Anuraphis* e *Aphis*. Insetos de pequeno porte, sugadores de seiva, de alta capacidade reprodutiva e que vivem em colônias na região logo acima da superfície do solo, no colo da planta, ou em touceiras graúdas, entre os propágulos, protegidos pelos pecíolos desses. Estão associados às formigas com as quais vivem em simbiose. Sua reprodução ocorre por partenogênese telítoca, ou seja, por divisão, sendo que todos os indivíduos gerados são fêmeas. Devido à sucção contínua de seiva e à injeção de toxinas, os pulgões levam a planta ao definhamento (Fornazier & Santos, 1998). Além disso, podem atuar como transmissores de vírus, o que provoca um decréscimo da produtividade pelo aumento da carga viral. Recomenda-se a desinfestação dos filhotes com cloro ativo para controlar a população dessa praga no momento do plantio e evitar o excesso de nitrogênio. Outro pulgão que também ataca a cultura é o *Hyadaphis foeniculi* (Pass.), que infesta as folhagens, podendo causar danos significativos, como em 2002 no Paraná e em Santa Catarina, quando dizimou diversas lavouras (Madeira & Souza, 2004). Os danos ocorrem, quando normalmente se verificam desbalanços hídricos e desequilíbrios nutricionais. O controle é baseado no uso de mudas tratadas com cloro ativo, manejo adequado da irrigação e boa nutrição das plantas.

Quanto aos patógenos, de acordo com Henz (2002), 47 foram registrados ocorrendo em mandioquinha-salsa, sendo que desses, 28 foram relatados no Brasil. A maioria dos registros estão na forma de resumos, capítulos de livros ou publicações genéricas, desprovidos de uma série de dados relevantes, como provas de patogenicidade, importância da doença, perdas, identificação mais acurada, entre outras. Dos poucos artigos publicados, alguns se encontram em revistas de circulação regional, de difícil acesso, ou em forma de listas de doenças, sem informações de epidemiologia ou controle.

As doenças que se destacam nas condições brasileiras são a murcha (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary), as manchas foliares (*Septoria* sp. e *Cercospora* sp.), o crestamento-bacteriano (*Xanthomonas campestris* pv. *arracaciae*), as podridões-de-raízes

(*Pectobacterium* spp.) e os nematóides das galhas (*Meloidogyne* spp.). Os dois últimos grupos de patógenos são os principais problemas da cultura e causam perdas significativas.

A **murcha**, ocasionada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, é uma das principais doenças da mandiocinha-salsa na região serrana do Espírito Santo (Ventura & Costa, 1998). Os principais sintomas da doença são clorose nas folhas e posterior murcha da planta. O patógeno é um fungo altamente danoso, por causar do apodrecimento completo da planta quando as condições são favoráveis à doença. As plantas doentes apresentam um apodrecimento da coroa e raízes onde é visível a presença de micélio branco e, posteriormente, a presença de escleródios de cor negra (Ventura, 1995). A dispersão dos escleródios é a principal forma de disseminação da doença. A escolha do local de plantio, a irrigação adequada, o uso de material propagativo sadio, a eliminação de plantas atacadas nos canteiros de pré-enraizamento e a vistoria do campo são medidas de controle. Um outro fungo de solo também muito importante é *Sclerotium Rolfsii* Sacc. que, juntamente com *S. sclerotiorum*, são os patógenos de solo mais importantes para a cultura, ocorrendo nas regiões produtoras do Espírito Santo, Minas Gerais e Paraná (Henz, 2002).

As **manchas foliares**, causadas pelos fungos *Septoria apii* (Briosi et Car.) Chest. e *Cercospora arracacina* Chupp. (Viégas, 1961), e o crestamento-bacteriano, causado pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *arracaciae* (Pereira et al., 1971), são as principais doenças que afetam as folhas de mandiocinha-salsa e são comuns em praticamente todas as áreas produtoras. Entretanto, raramente causam prejuízos aos produtores (Siqueira, 1988; Oliveira & Moura, 1995; Stradiotto, 1995). Os sintomas causados por *S. apii* e *C. arracacina* são pequenas manchas marrons nas folhas mais velhas, tendo no centro os corpos de frutificação dos fungos, sendo picnídios para *S. apii* e conidióforos livres para *C. arracacina*. A disseminação desses patógenos ocorre pela ação do vento ou, principalmente, pela ação da água da chuva ou da irrigação. A bactéria causa manchas angulares de coloração escurecida, com aspecto encharcado, com posterior formação de um halo amarelado e o secamento das folhas. Deve-se selecionar sempre material propagativo sadio, evitar plantios em locais com excesso de umidade do solo e controlar a irrigação, para evitar a disseminação da bactéria (Ventura, 1995).

A **podridão das raízes** pode ser ocasionada por *S. sclerociorum* ou por bactérias do gênero *Pectobacterium* (antigo *Erwinia*), que são as principais responsáveis pelo

apodrecimento de raízes, principalmente em pós-colheita. A podridão de raiz é responsável por grandes perdas durante o transporte, armazenamento e comercialização de mandioquinha-salsa (Lopes & Henz, 1997). Os sintomas iniciais da doença são depressões de aspecto encharcado nas raízes, causando posterior decomposição dos tecidos (Santos *et al.*, 2000). São ditas podridão-mole, apresentando odor característico extremamente desagradável, não exatamente pelo ataque dos seus agentes etiológicos, mas pela ação de microorganismos decompositores associados ao seu ataque. Quando ocorre a infestação no campo, geralmente associada a ferimentos causados por brocas ou por implementos agrícolas, a planta apresenta amarelecimento e encurvamento das folhas, normalmente levando à morte das plantas. No campo, as plantas atacadas devem ser eliminadas. Na colheita e em pós-colheita, as raízes devem ser manuseadas com cuidado, com o mínimo de impacto e atrito, de modo a minimizar a ocorrência de microferimentos.

Até o momento, quanto aos conhecimentos sobre problemas fitopatológicos na cultura de mandioquinha-salsa, os **nematóides** causadores das galhas continuam sendo um dos principais patógenos da cultura, limitando a produção em algumas áreas, com redução da produtividade e da qualidade das raízes. Esses afetam a produção de raízes no campo, tornando-se afiladas e sem valor comercial, quando são descartadas no beneficiamento por causa das galhas. Nestas duas situações as perdas são muito elevadas e podem atingir até 100% (Henz, 2002).

Os nematóides causadores de galha, pertencentes ao gênero *Meloidogyne*, foram o primeiro problema fitopatológico detectado na cultura no Brasil. Dentre os nematóides do gênero *Meloidogyne*, verifica-se a ocorrência de *M. incognita* e *M. javanica* com maior frequência, além de *M. arenaria* e, em regiões mais frias, *M. hapla*. Os danos se caracterizam pela formação de galhas nas raízes, depreciando-as qualitativa e quantitativamente. As plantas intensamente atacadas ficam amarelecidas e subdesenvolvidas, podendo ainda haver seu apodrecimento pelo ataque de agentes secundários como bactérias. Monteiro (1980), citado por Charchar e Santos (1997), relata a ocorrência do nematóide-das-lesões, *Pratylenchus penetrans*, causando necrose em mandioquinha-salsa no Brasil. Para evitar o problema com nematóides, o efetivo uso de práticas culturais adequadas são muito importantes, como: conhecer o histórico do local de plantio, pousio, alqueive, revolvimento do solo, plantio de mudas saudáveis, tratamento de

mudas e o pré-enraizamento em substratos desinfestados. É conhecido que as cultivares de raízes brancas apresentam altos níveis de tolerância, porém, sua aceitação comercial é muito restrita. A cultivar Amarela de Senador Amaral, apresenta ligeira tolerância a nematóides (Charchar & Santos, 1997).

### **Vírus em mandioquinha-salsa**

Na região andina, há relatos de pelo menos sete vírus infectando a cultura da mandioquinha-salsa. O *International Committee on Taxonomy of Viruses* (Fauquet *et al.*, 2005) cita cinco: duas pertencentes ao gênero *Nepovirus*, família *Comoviridae*: *Arracacha virus A* (AVA), descrito por Jones & Kenten (1978), e *Potato black ringspot virus - arracacha* (PBRSV-A), descrito por Lizárraga *et al.* (1994); uma espécie tentativa do gênero *Cheravirus*: *Arracacha virus B* (AVB), descrito por Kenten & Jones (1979); uma espécie tentativa do gênero *Potyvirus*: *Arracacha virus Y* (AVY); e uma espécie tentativa do gênero *Carlavirus*: *Arracacha latent virus* (ALV). Lizárraga (2000) e Hermann (1997), mencionam outros dois vírus em mandioquinha-salsa: *Arracacha potyvirus 1* (AP-1) (*Potyvirus*) e *Arracacha carlavirus 3* (AV-3) (*Carlavirus*) que podem estar relacionados com AVY e ALV, respectivamente.

O AVA é constituído de um RNA de fita simples que está dividido em três partículas isométricas com diâmetro em torno de 26 nm. Trata-se de um vírus facilmente transmitido por inoculação mecânica para um grande número de hospedeiros, mas estudos de inoculação mecânica para plantas sadias de mandioquinha-salsa não foram bem sucedidos (Jones & Kenten, 1978). Naturalmente, só tem sido encontrado infectando mandioquinha-salsa, as quais apresentam sintomas de mosaico amarelo nas folhas jovens. Em tentativas de transmissão do vírus pelo afídeo *Myzus persicae*, não se obteve sucesso. Suspeita-se que, provavelmente, algum nematóide possa ser o transmissor desse vírus, à semelhança do que ocorre com os membros do gênero *Nepovirus*. É transmitido por sementes de *Nicotiana clevelandii*. Está distribuído pela América do Sul e Central, com relatos especialmente no Peru. Apesar de ser comumente encontrado nos campos de

mandioquinha-salsa na região Andina (Jones & Kenten, 1978), sua importância não tem sido comentada.

Um outro vírus isométrico isolado de mandioquinha-salsa na região andina é um variante do PBRSV. Plantas de mandioquinha-salsa infectadas com este vírus apresentam sintomas de mosaico e deformação foliar. Este vírus também pertence ao gênero *Nepovirus*.

O AVB é um vírus de RNA fita simples, com uma única partícula isométrica de 26 nm. É encontrado naturalmente infectando mandioquinha-salsa, oca (*Oxalis tuberosa*; Oxalidaceae) e batata (*Solanum tuberosum*; Solanaceae). Plantas infectadas naturalmente somente com este vírus não apresentam sintomas. Se uma planta de mandioquinha-salsa com o AVB apresentar algum sintoma em campo, normalmente é porque algum outro vírus está presente (Jones & Kenten, 1981). Possui uma ampla gama de hospedeiros, é transmitido por sementes, mas seu vetor ainda não é conhecido. Possui duas distintas estirpes: AVB-T e AVB-O. Já foi encontrado no Peru e Bolívia (Jones & Kenten, 1983).

O AVY é um vírus de partícula flexuosa, com 750 nm de comprimento e 12 nm de diâmetro. Plantas de mandioquinha-salsa infectadas com este vírus apresentam sintoma de clorose nas folhas. Apresenta uma ampla gama de hospedeiros. É transmitido por inoculação mecânica e por vetor, afídeo *Myzus persicae* e *Aphis gossypii*, de maneira não persistente. Está distribuído no Peru (ICTVdB Management, 2006a).

O ALV foi isolado de mandioquinha-salsa, seu hospedeiro natural, porém sem presença de sintomas, ou seja, em infecção latente. É um vírus não envelopado, com simetria helicoidal, partícula viral com 650 nm de comprimento, genoma monopartido com uma molécula de RNA fita simples. Este vírus é transmitido por inoculação mecânica a várias espécies de plantas e ocorrem na Bolívia e Peru (ICTVdB Management, 2006b).

Em uma amostra de 40 plantas de 10 acessos equatorianos, Lizárraga (1997) encontrou infecções virais simples e múltiplas em 77% das plantas, sendo os vírus AP-1 e AV-3 foram os mais frequentes, com incidência de 53 e 38%, respectivamente. De acordo com Hermann (1997), mesmo conhecendo algumas das características deste vírus, não está bem claro como estes afetam as plantas e a produção de mandioquinha-salsa. Entretanto, é quase certo que, a exemplo do que ocorre com outras hortaliças propagadas vegetativamente como batata, morango, alho e batata-doce, plantas de mandioquinha-salsa

infectadas por vírus podem apresentar menor desenvolvimento e produção em relação a plantas saudáveis, livres de vírus.

No Brasil, não há registro oficial de ocorrência de nenhum vírus em mandioquinha-salsa, embora seja comum encontrar plantas apresentando sintomas típicos de viroses, como mosaico, nanismo e deformação foliar. Henz (2002), cita relatos do Dr. Elliot Watanabe Kitajima, dizendo que já foram constatadas, via microscopia eletrônica, inclusões do tipo "catavento", típicas de *Potyvirus*, em tecido foliar de mandioquinha-salsa com sintomas de mosaico cultivada em Brasília, DF. Acredita-se que a incidência de vírus é alta e cause algum grau de degenerescência e reduzindo o potencial produtivo da planta (Madeira, 2000a; Santos *et al.*, 2000; Henz, 2002), sendo que a falta de registros oficiais é um simples reflexo da carência de estudos com a cultura nesta área no país.

Madeira (2004) observou 95 % de infecção em plantas da cv. Amarela de Carandaí e 78,6 % em plantas da cv. Amarela de Senador Amaral por intermédio de inoculação em plantas indicadoras, sem contudo identificar quais vírus estavam presentes. Foram observadas partículas flexuosas típicas de *Potyvirus*, por microscopia eletrônica (Dr. Guy de Capdeville e Dr. André Nepomuceno Dusi, informação pessoal). O cultivo deste material, após cultura de ápice caulinar meristemático e eliminação de vírus, resultou em superioridade produtiva de 51% em comparação ao material tradicionalmente utilizado (Madeira, 2004).

Devido às evidências de que plantas de mandioquinha-salsa cultivadas no Brasil estão infectadas com vírus e a observação por microscopia eletrônica de partículas virais típicas de *Potyvirus* em extrato foliar destas plantas, é que se obteve o isolado utilizado neste estudo, originário da mesma planta em que a partícula viral foi visualizada.

### ***Potyviridae***

A maior das famílias de vírus de plantas reconhecidas, e do ponto de vista econômico, a mais importante, causando doenças em diversas culturas, é a família *Potyviridae*. Essa denominação de família é recente, a qual englobou o anteriormente chamado grupo *Potyvirus*. Este era formado pelo grupo taxonômico que contém o *Potato*

*virus Y* (PVY), primeiramente proposto por Brandes & Wetter (1959). Em 1971, o Comitê Internacional de Nomenclatura de Vírus, renomeado em 1973 de *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), reconheceu formalmente a formação do grupo *Potyvirus* e mais 15 outros grupos (Harrison *et al.*, 1971). Atualmente, de acordo com último relatório do ICTV (Fauquet *et al.*, 2005) a família *Potyviridae* é constituída por aproximadamente 220 espécies, divididas em seis gêneros.

Esta família é formada por vírus que têm partículas alongadas e flexuosas, não envelopadas, medindo de 11 a 15 nm de largura. Os comprimentos das partículas virais variam entre os gêneros. Espécies com genoma monopartido variam de 650 a 900 nm de comprimento e espécies com genoma bipartido, possuem partículas de tamanhos 250 a 300 nm e 500 a 600 nm de comprimento. O material genético é composto por uma ou duas moléculas de RNA linear de fita simples sentido positivo variando de 8.500 a 12.000 nucleotídeos (Shukla *et al.*, 1994; Fauquet *et al.*, 2005). O RNA genômico é protegido pela proteína da capa (CP) com aproximadamente 2.200 cópias de um polipeptídeo de cerca de 34 kDa, arranjadas como uma hélice envolvendo o genoma (Hollings & Brunt, 1981a).

A patologia dos membros da família *Potyviridae* pode ser observada por uma série de sintomas, que incluem desde mosqueado, mosaico, clorose, necrose, deformações foliares e de frutos, até mesmo infecção latente (Shukla *et al.*, 1994).

A classificação dos seis gêneros (*Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*, *Bymovirus* e *Potyvirus*) da família *Potyviridae* é baseada no vetor de transmissão, gama de hospedeiros e organização genômica (Fauquet *et al.*, 2005).

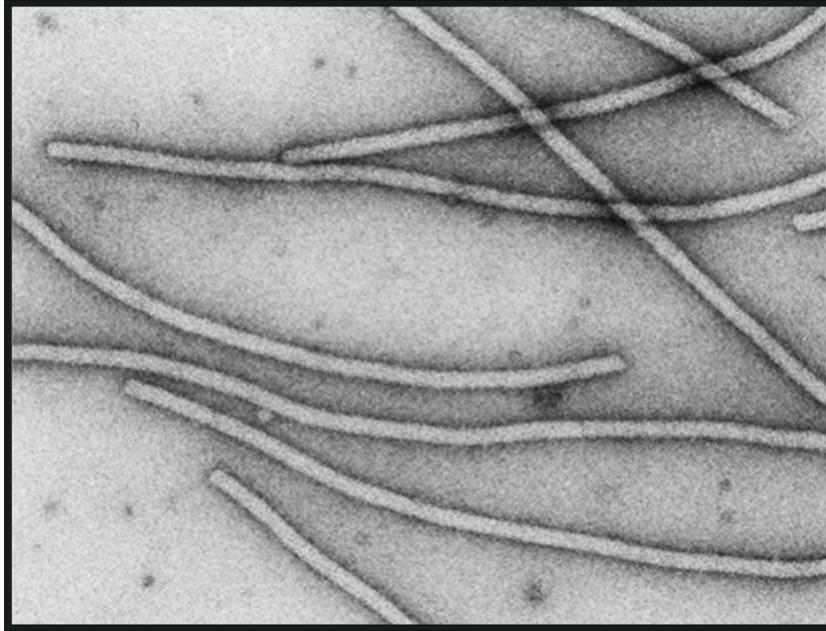
Os vírus do gênero *Ipomovirus*, tendo como espécie-tipo *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV), são formados por um componente genômico e são transmitidos por mosca-branca. O gênero *Macluravirus*, espécie-tipo *Maclura mosaic virus* (MacMV), é caracterizado por ser transmitido por afídeos, possuir apenas um componente genômico e com partícula menores que 700 nm de comprimento. O gênero *Rymovirus*, espécie-tipo *Ryegrass mosaic virus* (RGMV), caracteriza-se pela presença de um único componente genômico, com todas as espécies restritas a família Gramineae e a sua transmissão feita por ácaros do gênero *Abacarus*. O gênero *Tritimovirus*, espécie-tipo *Wheat streak mosaic virus* (WSMV), também com um único componente genômico, inclui espécies restritas a família Gramineae, porém sua transmissão feita por ácaros do gênero *Aceria*. O gênero *Bymovirus*,

espécie-tipo *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV), caracteriza-se pela presença de duas moléculas de RNA, com transmissão feita por fungos a gramíneas (Fauquet *et al.*, 2005; Adams *et al.*, 2005a).

O gênero *Potyvirus* forma o maior e o mais importante gênero dentro da família, infectando uma ampla variedade de plantas tanto monocotiledôneas como dicotiledôneas. É caracterizado por possuir partículas filamentosas flexuosas, com 680 a 900 nm de comprimento e 11 a 13 nm de diâmetro (Figura 1.2). O genoma é constituído de uma única molécula de RNA, linear, senso positivo, com aproximadamente 9.700 nucleotídeos, possuindo uma única fase de leitura (*open reading frame*, ORF), que se traduz em uma poliproteína de 340 a 370 kDa (Figura 1.3). A poliproteína é processada por três proteases virais, NIa, P1 e HC-Pro, em 10 proteínas: a proteína N-terminal (P1), a protease componente auxiliar (HC-Pro), a proteína P3, a proteína inclusão citoplasmática (CI), duas proteínas de inclusão nuclear (NIa [VPg, Pro] e NIb), duas proteínas pequenas (6K1 e 6K2) e a proteína da capa (CP) (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001; Adams *et al.*, 2005b) (Figura 1.3).

A organização genômica e a estratégia de expressão aparentam ser uniformes por todo o gênero. O RNA genômico carrega uma proteína de origem viral, VPg (*viral protein genome-linked*), ligada covalentemente à sua extremidade 5' e uma cauda poli-(A) no final da extremidade 3'. A VPg e a capa protéica (CP) são os únicos produtos gênicos que fazem parte da partícula viral, e aproximadamente 5% do seu peso é composto de RNA e 95 % de proteína (Hollings & Brunt, 1981a).

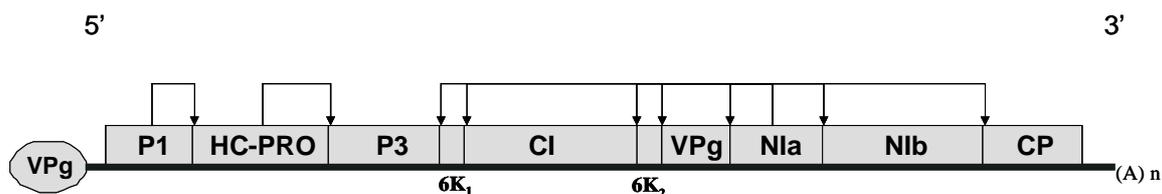
A obtenção dos primeiros clones infecciosos de potyvírus (Riechmann *et al.*, 1989) permitiu o início de estudos moleculares que revelaram a função de praticamente todas as proteínas virais (Tabela 1.1). Conseqüentemente, o aprimoramento e o uso disseminado de técnicas moleculares possibilitaram o amplo conhecimento de estruturas moleculares, sua organização genômica e seqüência nucleotídica, o seu modo de replicação, o processamento da poliproteína, bem como suas variações (Shukla *et al.*, 1994).



**Figura 1.2:** Visualização das partículas flexuosas e alongadas típicas de potyvirus por microscopia eletrônica (Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/>).

Um aspecto fundamental das proteínas sintetizadas pelos potyvirus é que elas parecem ter um caráter multifuncional, pois praticamente todas as proteínas cujas funções já foram determinadas atuam em mais de um processo do ciclo de infecção. Sabe-se que todas as proteínas virais estão envolvidas na amplificação genômica e todas elas, com exceção da P3, 6K1 e 6K2, se ligam ao RNA (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

A CP dos potyvirus, pode ser dividida em três regiões: a N-terminal variável, que está exposta na superfície da molécula, e duas regiões conservadas – a região central com quatro prováveis  $\alpha$ -hélices e com 215 a 227 aminoácidos e a região C-terminal, que contém duas  $\alpha$ -hélices e três  $\beta$ -strands, que contém de 18 a 20 aminoácidos (Baratova *et al.*, 2001; Shukla *et al.*, 1988b).



**Figura 1.3:** Esquema da organização genômica do gênero *Potyvirus*. O retângulo corresponde ao genoma viral que é traduzido em uma poliproteína, com a VPg na extremidade 5' e a poli(A) na extremidade 3'. Cada proteína é representada por sua abreviação dentro do retângulo ou abaixo da ORF. As setas indicam os sítios de clivagem de cada protease. As proteínas estão exemplificadas na tabela 1.1.

**Tabela 1.1:** Funções das diferentes proteínas codificadas por *Potyvirus*

Proteínas	Peso molecular	Propriedades
<b>P1</b>	32-64 kDa	Protease, responsável pela autoclivagem Expressão dos sintomas
<b>HC-Pro</b> Helper component	56-58 kDa	Transmissão por afídeos Protease, responsável pela autoclivagem Movimento sistêmico Desenvolvimento sintomas Supressora de silenciamento gênico
<b>P3</b>	37 kDa	Patogenicidade
<b>6K1</b>	6 kDa	Função não conhecida
<b>CI</b> Cylindrical inclusion protein	70 kDa	Replicação do genoma ATPse / RNA helicase Ligação a membrana e movimento célula a célula
<b>6K2</b>	6 kDa	Ligação ao complexo viral de replicação do genoma
<b>VPg</b>	21-24 kDa	Funciona como primer para a replicação do genoma
<b>NIa-Pro</b> Nuclear inclusion protein a	49 kDa	Protease: principal enzima responsável pela clivagem da poliproteína Interação proteína-proteína
<b>NIb</b> Nuclear inclusion protein b	58 kDa	Replicação do genoma RNA polimerase dependente de RNA Envolvida na replicação do genoma
<b>CP</b> Coat protein	28-40 kDa	Transmissão por afídeos Movimento sistêmico e célula-a-célula Montagem da partícula viral

(Adaptado de: Shukla *et al.*, 1994; Anandalakshmi *et al.*, 1998; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

Atualmente, o gênero é formado por 206 espécies, sendo 110 espécies definitivas e 96 prováveis espécies (Fauquet *et al.*, 2005). Possui como espécie-tipo o *Potato virus Y* (PVY), do qual originou o nome *Potyvirus*.

As partículas dos potyvírus são comumente encontradas dispersas ou formando pequenos agregados soltos por todo o citoplasma das células infectadas. Na fase inicial de infecção, no entanto, essas partículas são encontradas presas às paredes celulares, nas

proximidades dos plasmodesmata ou nos feixes citoplasmáticos que atravessam os vacúolos das células (Harrison & Roberts, 1971; Lawson *et al.*, 1971).

Os *Potyvirus* induzem a formação de inclusões citoplasmáticas cilíndricas (CI) ou amorfas durante a infecção (Edwardson, 1966). As CI são agregados da proteína viral de 70 kDA que se acumulam dentro de diferentes compartimentos celulares, formando estruturas estáveis denominadas corpos de inclusões do tipo cata-vento. Outro tipo de inclusão proeminente encontrado em muitas, mas não em todas as plantas infectadas por potyvírus, são as inclusões nucleares cristalinas (NI). Esse tipo de inclusão é composta por duas proteínas não estruturais distintas, denominadas *inclusão nuclear a* (NIa) e *inclusão nuclear b* (NIb). Provavelmente essa inclusão é um resultado da produção excessiva das proteínas NIa e NIb (Knuhtsen *et al.*, 1974).

Muitos fatores afetam o padrão de disseminação e a severidade da doença nas culturas. Dentre esses fatores, a proximidade de fontes contendo vírus, o número, a atividade e a ocorrência de vetores de forma alada são os mais importantes. Os *Potyvirus* não sobrevivem em folhas mortas ou em hospedeiros debilitados, nem por longos períodos no vetor (Hollings & Brunt, 1981a).

As espécies de vírus pertencentes ao gênero *Potyvirus* são transmitidas naturalmente em uma relação de transmissão do tipo maneira não-persistente (não-circulativa) com os afídeos vetores. Isto implica em período de aquisição curto de alguns segundos a poucos minutos, ausência de um período de latência e também um curto período de retenção, inferior a uma hora. Nesse tipo de transmissão, um período de jejum para pré-aquisição aumenta a eficiência de transmissão. Um período de aquisição superior a cinco minutos diminui esta eficiência (Delgado-Sanchez & Grogan, 1970; Hollings & Brunt, 1981b).

Quanto aos mecanismos moleculares envolvidos na transmissão por afídeos, pouco se sabe. É conhecido que a transmissão é dependente da presença, dentro das células das plantas infectadas, de uma proteína não estrutural codificada pelo vírus, denominada componente auxiliar (*Helper component*, HC-Pro), de peso molecular em torno de 53 a 58 kDa (Murphy *et al.*, 195). Além da HC-Pro a composição da proteína da capa protéica, também está envolvida neste tipo de transmissão, principalmente no que se refere ao motivo DAG (Allison *et al.*, 1985; Pirone, 1991; Gal-on *et al.*, 1992).

Segundo Shukla *et al.* (1994), os critérios mais importantes para a classificação das espécies no gênero são a citopatologia; a morfologia da partícula; o mecanismo de transmissão; a estrutura e organização do genoma; a propriedade, a seqüência e a reação sorológica da capa protéica. De acordo com o último relatório do ICTV (Fauquet *et al.*, 2005), os critérios adotados para demarcação de espécies dentro do gênero *Potyvirus* são: a seqüência do genoma (< 80% identidade na seqüência de aminoácido da CP; < 85% identidade na seqüência de nucleotídeo do genoma completo e os diferentes sítios de clivagem da poliproteína); o círculo de hospedeiros; a patogenicidade e a citopatologia; o modo de transmissão; as diferenças sorológicas .

Muitos *Potyvirus* têm círculo de hospedeiros restrito, podendo ser identificados com base em sintomas característicos em certos hospedeiros. Porém, a confiança deste critério tem causado muita confusão na identificação de *Potyvirus* infectando algumas famílias de plantas (Bos, 1970; Shukla *et al.*, 1989). Diferentes *Potyvirus* têm sido observados mostrando sintomas similares no mesmo hospedeiro, também, diferentes condições climáticas, diferentes cultivares ou diferentes linhas genéticas da mesma espécie de planta podem apresentar respostas diferentes à infecção viral (Hollings & Brunt, 1981 a). De modo geral, os métodos biológicos são capazes de diferenciar estirpes de um mesmo vírus, entretanto, os resultados estão sujeitos a variações do ambiente e do genótipo das plantas (Matthews, 1991), sugerindo que a sintomatologia não deve ser um marcador confiável do relacionamento genético (Shukla *et al.*, 1994).

A sorologia é uma das técnicas utilizadas na identificação e classificação de diversos gêneros de vírus (Fauquet *et al.*, 2005). Os testes sorológicos podem permitir uma diagnose de amplo espectro, detectando estirpes de um determinado vírus e até mesmo espécies distintas mas taxonomicamente próximas, ou podem levar a uma alta especificidade (Zerbini & Zambolim, 2000).

Apesar de sua praticidade, a sorologia tem provado não ser satisfatória quando aplicada à taxonomia da família *Potyviridae* (Shukla & Ward, 1989). Esta dificuldade relacionada com os membros desta família não se deve a problemas associados com as técnicas sorológicas, mas sim, à complexa herança associada com a proteína da capa de *Potyvirus* (Shukla & Ward, 1989).

Tem sido observado que não há um padrão de relacionamento entre membros do

grupo, e que o relacionamento sorológico não se correlaciona com as propriedades biológicas (Hollings & Brunt, 1981 a; 1981 b). O relacionamento sorológico ocorre entre estirpes de uma mesma espécie, como também, entre espécies diferentes de um mesmo gênero. Este último, não permite a separação de determinadas espécies, as quais podem ser distintas (Shukla & Ward, 1989). São três os principais problemas relacionados com a sorologia de *Potyvirus*: (i) a presença de reação cruzada variável entre anti-soros produzidos em diferentes laboratórios para um mesmo vírus; (ii) relacionamento sorológico não esperado entre distintas espécies, ou seja, anti-soro produzido contra uma espécie apresenta reação positiva com outras espécies diferentes; e (iii) falta de reação cruzada entre estirpes de um mesmo vírus (Shukla *et al.*, 1992).

Inicialmente, espécies e estirpes eram caracterizadas e distinguíveis por diferenças nas propriedades biológicas como os sintomas causados em diferentes hospedeiros, a gama de hospedeiros ou a propriedade de transmissão de vetores. Posteriormente, com a sorologia, muitos aspectos taxonômicos foram resolvidos, mas também deixaram falhas. O desenvolvimento de técnicas que possibilitam a caracterização de espécies de vírus, além do uso de propriedades biológicas, resultou em mudanças e novas perspectivas para a classificação taxonômica dos vírus. Principalmente com o advento da biologia molecular (dados de seqüência), que cada vez mais se torna importante na distinção de espécies e estirpes, até mesmo gêneros, de vírus de plantas.

A disponibilidade da seqüência da capa protéica (CP) e do genoma completo, ajudou a esclarecer a taxonomia e conduziu ao estabelecimento dos critérios que podem ser usados, em particular, para distinguir seqüências próximas e relacionadas de espécies de vírus daquelas que são estirpes de uma mesma espécie.

Estudos mais recentes do grupo de estudos de *Potyvirus* do ICTV (Adams *et al.*, 2005a) sugerem que apenas 76 a 77 % de identidade dos nucleotídeos da capa protéica sejam suficientes para demarcação das espécies e que o gene CI deveria ser a melhor região para diagnóstico e estudos taxonômicos, se somente uma porção do genoma for seqüenciada.

Segundo Shukla & Ward (1988), três seriam as principais razões para se utilizar critérios baseados na seqüência da capa protéica: (i) das proteínas virais, exceto a capa protéica, todas tem certa homologia com proteínas de outros grupos de vírus de plantas e

vírus animal; (ii) a capa protéica corresponde a aproximadamente 95 % do peso da partícula viral; e (iii) a sorologia reflete a estrutura da proteína da capa.

Atualmente, um dos maiores desafios da taxonomia viral é determinar a importância de cada critério de classificação utilizado para espécie, a fim de se obter uma maior precisão na determinação filogenética de vírus.

## CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA ESPÉCIE DE *Potyvirus* ISOLADA DE MANDIOQUINHA-SALSA NO BRASIL

### 2.1. Introdução

A mandioquinha-salsa pertence à família Apiaceae, espécie *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. Esta família inclui cenoura, salsa, funcho (erva-doce) e aipo (salsão). A planta é supostamente originária da região andina da América do Sul e trata-se de uma das mais antigas plantas andinas cultivadas (Bukasov, 1981). Atualmente a produção concentra-se na América do Sul, especialmente no Brasil, Colômbia, Venezuela e Equador. A mandioquinha-salsa é uma hortaliça de raízes, de elevado valor energético, rica em vitaminas e sais minerais, de fácil digestibilidade e possui propriedades diuréticas. Por se tratar de uma espécie com propagação vegetativa, a mandioquinha-salsa muito provavelmente acumula patógenos degenerativos, como vírus, e assim as plantas infectadas podem apresentar menor desenvolvimento e produção em relação a plantas saudáveis. Cinco vírus foram registrados para mandioquinha-salsa na região andina: (i) *Arracacha virus A* (AVA) (Jones & Kenten, 1978) e (ii) *Potato black ringspot virus - arracacha* (PBRSV-A) (Lizárraga *et al.*, 1994), pertencentes ao gênero *Nepovirus*, (iii) *Arracacha virus B* (AVB) (Kenten & Jones, 1979), espécie tentativa do gênero *Cheravirus*, (iv) *Arracacha virus Y* (AVY), espécie tentativa do gênero *Potyvirus*, e (v) *Arracacha latent virus* (ALV), espécie tentativa do gênero *Carlavirus*. Lizárraga (2000) e Hermann (1997), mencionam ainda outros dois vírus em mandioquinha-salsa: *Arracacha potyvirus 1* (AP-1) (*Potyvirus*) e *Arracacha carlavirus 3* (AV-3) (*Carlavirus*) que podem estar relacionados com AVY e ALV, respectivamente. Até o momento, nenhum destes vírus foi oficialmente registrado em mandioquinha-salsa no Brasil.

A família *Potyviridae* é a mais importante das famílias de vírus de plantas reconhecidas, possui seis gêneros, sendo que o gênero *Potyvirus* se destaca pela sua maior importância econômica mundial. Atualmente, o gênero possui 110 espécies definitivas e 96 prováveis espécies (Fauquet *et al.*, 2005). Os vírus pertencentes a esse gênero são transmitidos de maneira não-persistente, não-circulativa por afídeos. A morfologia da

partícula é filamentosa flexuosa, maior que 700 nm de comprimento e 11 a 13 nm de diâmetro. O genoma é constituído de uma única molécula de RNA, linear, sentido positivo, com aproximadamente 10.000 nucleotídeos. Possui uma cauda poli(A) na extremidade 3' terminal e uma proteína viral genome-linked (VPg) na extremidade 5' terminal. Durante o processo de infecção, o RNA é traduzido em uma única poliproteína que é subsequentemente processada por proteases codificadas pelo vírus em proteínas estruturais e não-estruturais. De acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), o critério molecular para demarcação de espécies dentro do gênero *Potyvirus* baseia-se em 80 % de identidade dos aminoácidos da capa protéica ou 85 % de identidade da seqüência de nucleotídeos do genoma completo (Fauquet *et al.*, 2005). Entretanto, estudos recentes do grupo de estudos de potyvírus do ICTV (Adams *et al.*, 2005a) sugerem que apenas 76 - 77 % de identidade dos nucleotídeos da capa protéica sejam suficientes para diferenciação das espécies.

Plantas de mandioquinha-salsa foram coletadas em Brasília, Brasil, para realização de trabalho de micropropagação. Estudos preliminares de indexação em plantas indicadoras destas plantas coletadas e observação em microscopia eletrônica evidenciaram a presença de vírus com partículas semelhantes a de *Potyvirus* (Madeira, 2004). Neste capítulo, um isolado viral selecionado destas plantas foi identificado e caracterizado biológica, sorológica e molecularmente.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar um potyvírus isolado de mandioquinha-salsa no Brasil, determinar sua relação filogenética com outros potyvírus e desenvolver técnicas para a sua detecção.

## **2.2. Material e métodos**

### **2.2.1. Local de realização do trabalho, origem do isolado e manutenção**

Os trabalhos foram conduzidos na Embrapa Hortaliças. Plantas de mandioquinha-salsa foram coletadas para a realização do trabalho de micropropagação e indexação realizado por Madeira (2004), que obteve evidências que as plantas estavam infectadas com vírus. Extrato foliar da planta matriz Amarela de Carandaí número 17, inoculado em diversas plantas indicadoras induziu sintomas típicos de viroses em *Chenopodium quinoa* Willd., *C. amaranticolor* Coste & Reyn. e *Nicotiana benthamiana* Domin. Assim, extrato foliar desta *Nicotiana benthamiana* infectada foi avaliado por microscopia eletrônica e revelou partículas flexuosas e alongadas, características do gênero *Potyvirus*. Esta planta portanto foi escolhida para isolar um vírus que infecta mandioquinha-salsa no Brasil e realizar os trabalhos de caracterização.

O extrato foliar da planta matriz Amarela de Carandaí número 17 foi novamente inoculado mecanicamente em *Chenopodium quinoa*, pois é hospedeira de infecção local, para a purificação biológica. Assim, uma lesão local foi retirada e inoculada em uma única folha de uma nova planta de *C. quinoa*, repetindo este procedimento por cinco vezes, a fim de reduzir a possibilidade da presença de mais de um vírus na lesão local. Depois uma única lesão foi inoculada em *Nicotiana benthamiana* para infecção sistêmica com um isolado biologicamente puro de vírus de planta, sendo denominado como isolado C17, utilizado para a caracterização.

O isolado C17 foi mantido individualmente via inoculação mecânica em plantas de *N. benthamiana* em casa-de-vegetação para a realização dos trabalhos.

### **2.2.2. Círculo de hospedeiros**

Para determinação do círculo de hospedeiros do vírus, extrato das folhas de *N. benthamiana* infectada com o isolado C17 em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), adicionado de sulfito de sódio a 0,01 M ( $\text{NaSO}_3$ ) foi inoculado

mecanicamente em 16 espécies de plantas de quatro famílias botânicas distintas (Tabela 2.1).

**Tabela 2.1:** Plantas utilizadas na determinação do círculo de hospedeiros.

Família	Espécie
Solanaceae	<i>Datura metel</i>
	<i>D. stramonium</i>
	<i>Nicandra physaloides</i>
	<i>Nicotiana benthamiana</i>
	<i>N. tabacum</i> ‘Samsun’
	<i>N. tabacum</i> ‘TNN’
	<i>N. rustica</i>
	<i>Capsicum chinense</i> PI159236
	<i>C. annuum</i> ‘Ikeda’
	<i>Physalis pubescens</i>
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium Quinoa</i>
	<i>C. amaranticolor</i>
	<i>C. murale</i>
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i>
Apiaceae	<i>Daucus carota</i>
	<i>Petroselinum crispum</i>
	<i>Apium graveolens</i>

As plantas foram polvilhadas com carborundum 600 mesh antes da inoculação mecânica e lavadas com água corrente imediatamente após a inoculação. As plantas indicadoras foram mantidas em casa-de-vegetação para observação do desenvolvimento de sintomas durante 30 dias. A infecção do vírus foi verificada 20 dias após a inoculação por DAS-ELISA (item 2.2.8) ou Dot-ELISA (item 2.2.9). Esse teste foi repetido três vezes.

### 2.2.3. Transmissão por inseto-vetor

Afídeos ápteros (*Hyadaphis foeniculi* Pass.) foram coletados em folhas de plantas de mandioquinha-salsa no campo e mantidos no criatório de insetos da Embrapa Hortaliças. Para o teste de transmissão, os afídeos foram transferidos para uma placa de Petri, com um pincel de pêlo de camelo, e mantidos em jejum por 30 min. Após este período, alguns espécimes foram transferidos para plantas sadias, mantidas como controle, sem acesso a

nenhuma planta infectada. Aos demais foi dado acesso de aquisição do vírus, de 30 minutos, em plantas de *N. benthamiana* infectadas com o isolado C17, seguindo-se da transferência para plantas sadias de *N. benthamiana*, com acesso de inoculação, também de 30 min. Utilizou-se 10 espécimes por planta.

#### **2.2.4. Purificação da partícula viral**

O vírus foi purificado a partir de 60 g de folhas de *N. benthamiana* infectadas com o isolado C17, por inoculação mecânica, usando o método descrito por Dusi & Zambolim (1984). Folhas primárias com sintomas foram colhidas 15 dias após a inoculação. O material foi triturado em liquidificador 1:3 (p/v) em tampão borato gelado (0,2 M Borato, pH 8,4 + 10 mM EDTA + 0,15 % 2 mercaptoetanol). O extrato foi coado em gaze pré-tratada em água fervente e centrifugado a 29.000 g por 10 minutos. Coletou-se o sobrenadante e acrescentou Triton X-100 a 20 %, gota a gota, na proporção de 9:1 (v:v), e a mistura foi mantida sob agitação lenta por 90 minutos. Adicionou-se 6 % (p/v) de polietilenoglicol 6000 e 0,5 % (p/v) de NaCl. A solução foi submetida à agitação lenta por mais 90 minutos. Após, centrifugou-se a 29.000 g por 15 min. O sedimento foi ressuspensionado em tampão borato a 50 mM, pH 8,3, acrescido de uréia a 0,5 M, 6 mM EDTA e 0,1 % de 2 mercaptoetanol, em volume equivalente a 20 % do volume centrifugado. A solução foi centrifugada a 13.000 g por 10 min. O sobrenadante foi centrifugado a 260.000 g por 60 min. O sedimento foi ressuspensionado em tampão borato 50 mM, pH 8,3, durante toda a noite sob agitação lenta. A solução foi centrifugada a 9.400 g por 10 min e o sobrenadante (partículas semi-purificadas) foi centrifugado a 215.000 g, por 6 h, em coluna de gradiente de fases de CsCl (isopícnica). A banda formada foi recolhida com auxílio de seringa e agulha. Adicionou-se tampão borato 50 mM, pH 8,3 e submeteu a centrifugação a 215.000 g por 60 min. O sedimento foi ressuspensionado em 2 mL de tampão borato 50 mM, pH 8,3. Por último, centrifugou-se a 9.400 g por 10 min, e coletou-se todo o sobrenadante. Foi feita a leitura de absorbância da solução resultante (partículas purificadas) em espectrofotômetro a 260 nm e a concentração viral calculada utilizando o

coeficiente de extinção de potyvírus de 2,4 (Huttinga & Mosch, 1974). Obteve-se 1,2 mg de partículas de vírus purificadas que foram armazenadas a - 80 °C.

### **2.2.5. Microscopia eletrônica**

A preparação purificada foi observada ao microscópio eletrônico, no laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília. Para o exame, utilizou-se 10 µl do preparado viral com 50 µl de ácido fosfotungístico 2 %, formando uma gota. Em seguida, duas telas de cobre recobertas com Formvar/carbono foram colocadas em cima desta gota e deixadas por um minuto, posteriormente as telas foram removidas e secas com auxílio de papel de filtro.

### **2.2.6. Produção de anti-soro policlonal**

As partículas purificadas (item 2.2.4) foram utilizadas para a preparação do anti-soro policlonal. Anti-soro foi obtido por imunização em coelho, através da aplicação de injeções subcutâneas do vírus (640 µg) emulsificado com o adjuvante incompleto de Freund no dorso do coelho. As injeções foram repetidas duas vezes, com intervalo de dez dias entre aplicações.

A coleta de sangue foi realizada a cada 07 dias através de pequenos cortes nas bordas da orelha, por cinco vezes, retirando-se aproximadamente 15 mL de sangue por coleta, e deixados coagular a 37 °C por 1 h. Após este período, deixou-se resfriar por 5 a 10 min a 4 °C e descartou-se a fração coagulada. O soro foi centrifugado a 9.400 g por 10 min, para eliminar toda a fração coagulada e obter o anti-soro bruto. O anti-soro bruto resultante da centrifugação foi armazenado a - 20 °C até a realização do teste ELISA-indireto (item 2.2.7), para verificar a eficiência deste anti-soro bruto obtido.

Para a purificação da fração imunoglobulina G (IgG) do anti-soro, adicionou-se 1 mL de anti-soro bruto a 9 mL de água destilada, e a esta mistura foi adicionado gota-a-gota uma solução saturada de sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>) num total de 10 mL. Essa solução

foi incubada por 1 h a temperatura ambiente, protegida da luz. Após este período, a solução foi centrifugada a 9.400 g por 10 min, a uma temperatura de 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e manteve-se o sedimento em gelo. Este foi dissolvido em 1 mL de  $\frac{1}{2}$  PBS (PBS 10 X = 1,4 M NaCl + 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 8 mM NaHPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O + 2 mM KCl, pH 7,4). A solução resultante foi dialisada (Dialysis Tubing, Sigma) em  $\frac{1}{2}$  PBS, por 14 a 16 h. Após a diálise, a imunoglobulina foi purificada com a resina (DEAE Sephacel™ Amersham). Uma coluna foi formada com a resina DEAE Sephacel™ e lavada com  $\frac{1}{2}$  PBS até obter pH 7,0. O anti-soro foi adicionado nesta coluna e em seguida foi adicionando  $\frac{1}{2}$  PBS, posteriormente a IgG foi coletada e a absorbância foi medida. Após a leitura da absorbância, a IgG foi diluída para a concentração de 1 mg/mL e armazenada a - 20 °C.

Para a conjugação da IgG com a fosfatase alcalina (IgG-conjugada), 400 µL da IgG foi adicionado à cerca de 2.000 U da enzima e colocados em tubo de diálise (Dialysis Tubing, Sigma). O material foi dialisado em solução de glutaraldeído 0,05 % e incubados a temperatura ambiente, protegido de luz, por 4 h com rotação constante de 30 rpm, seguido de diálise com  $\frac{1}{2}$  PBS.

Após o preparo, o anti-soro conjugado foi testado em DAS-ELISA para avaliação da eficiência e determinação da concentração ótima da IgG e da IgG-conjugada, a serem utilizados nos testes sorológicos de detecção .

### **2.2.7. Teste eficiência anti-soro bruto**

Para avaliar a eficiência do anti-soro bruto produzido, realizou-se o ELISA ("Enzyme Linked Immunosorbent Assay") do tipo indireto (Voller & Bidwell, 1977).

**ELISA-indireto** - Os orifícios da placa de ELISA de poliestireno (Nunclon™ Surface), foram cobertos com 100 µL do extrato de folhas de plantas de *N. benthamiana* infectadas com isolado C17 e extrato de folhas de *N. benthamiana* sadia, diluídas na concentração de 1:50 em tampão carbonato, pH 9,6 (0,014 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 0,035 M NaHCO<sub>3</sub>). A placa foi incubada por 3 h a 37 °C. Após esse período, esta foi lavada 3 vezes com tampão PBS-Tween (0,05 % de Tween 20 em PBS 1 X). Em seguida, 100 µL do anti-soro bruto, nas diluições: 1:500; 1:1000; 1:2000 e 1:4000 (v:v) em tampão PBS-Tween, foi

adicionado nos orifícios da placa. A placa foi incubada a 4 °C, por 18 h, e em seguida lavada 3 vezes com tampão PBS-Tween. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de anti-IgG conjugado com fosfatase alcalina (1 mg/mL, Sigma) para coelho, na diluição 1:1000 (v:v) em tampão PBS-Tween, e incubado por 4 h a 37 °C. Após esta etapa, a placa foi lavada 3 vezes com PBS-Tween, e adicionou-se 100 µL de substrato p-nitrofenil fosfato (Sigma) 0,7 mg/mL diluídos em tampão dietanolamina (96 mL de dietanolamina + 0,2 g NaN<sub>3</sub>, para 1 L de água, pH 9,6). A reação foi incubada no escuro, à temperatura ambiente, sendo os valores de absorbância lidos a 405 nm em leitora de placas ELISA (Labsystems Multiskan® Biochromatic).

### 2.2.8. Teste eficiência IgG e IgG-conjugada

Para avaliar a eficiência da IgG produzida e a concentração a ser utilizada nos testes de detecção, realizou-se o teste 'Double Antibody Sandwich' (DAS-ELISA) (Clark & Adams, 1977).

**DAS-ELISA** - As cavidades de placas de poliestireno foram cobertas com 200 µL de IgG (1 mg/mL), nas diluições 1:500; 1:1000; 1:2000 e 1:4000, diluídas em tampão carbonato, pH 9,6. As placas foram incubadas por 4 h a 37 °C. Após esse período, estas foram lavadas 3 vezes com tampão PBS-Tween. Em seguida, 200 µL do extrato de folhas de plantas de *N. benthamiana* infectadas com isolado C17, diluídas nas concentrações de 1:10; 1:100 e 1:1000 em tampão de extração (PBS-Tween + 2 % PVP-40 + 0,2 % albumina bovina), foram aplicadas nas cavidades das placas, como também 200 µL do extrato de folhas de plantas de *N. benthamiana* sadias, diluídas nas concentrações 1:10 e 1:100 em tampão de extração. As placas foram incubadas a 4 °C, por 16 h, e em seguida lavadas 3 vezes com tampão PBS-Tween. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de IgG-conjugada à fosfatase alcalina, nas diluições 1:500; 1:1000; 1:2000 e 1:4000, diluídas em tampão PBS-Tween, e incubado por 4 h a 37 °C. Após esta etapa, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-Tween, e adicionaram-se 200 µL de substrato p-nitrofenil fosfato (Sigma) 0,7 mg/mL diluídos em tampão dietanolamina. A reação foi incubada no escuro, à

temperatura ambiente, sendo os valores de absorvância lidos a 405 nm em leitora de placas ELISA.

### **2.2.9. Dot-ELISA**

As amostras foliares (plantas círculo hospedeiros) foram diluídas 1:10, 1:100 e 1:1000 em tampão  $1/2$  PBS e aplicadas na membrana de nitrocelulose (Millipore). A membrana foi seca por 30 min e logo incubada em solução bloqueadora (tampão  $1/2$  PBS + 2 % de leite em pó desnatado) por 3 h a temperatura ambiente sob agitação constante de 50 rpm. Após este período, foi adicionado o anti-soro policlonal produzido (item 2.2.6) na concentração de 1 mg/mL, contra a CP do C17, diluído 1:1000 (v:v) e foi incubado por uma noite sob agitação constante a temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes com  $1/2$  PBS, sob agitação constante de 100 rpm. Terminadas as lavagens, a membrana foi incubada com o anti-IgG conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) para coelho, diluído 1:1000 (v:v) em tampão  $1/2$  PBS, por 3 hs, sob agitação constante de 50 rpm, a temperatura ambiente. Em seguida, lavada 3 vezes com tampão  $1/2$  PBS. O complexo antígeno-anticorpo foi detectado adicionando-se a 10mL do tampão de revelação (100 mM NaCl + 100 mM Tris-base + 5 mM  $MgCl_2(6H_2O)$ , pH 9,5), 0,165 mg/mL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil, Sigma) e 0,33 mg/mL de NBT (Nitro Blue Tetrazolium Chloride, Sigma) (Bollag & Edelstein, 1991). A membrana foi incubada nesta solução no escuro, sob agitação constante de 50 rpm, até a observação da reação.

### **2.2.10. Análise proteína**

A determinação do peso molecular da proteína do capsídeo foi feita através da eletroforese em gel de poliacrilamida descontínuo (Laemmli, 1970), utilizando o sistema de eletroforese vertical (item 2.2.10.1). A identidade da proteína foi feita através da reação sorológica, em teste de *Western blotting* (item 2.2.10.2).

### **2.2.10.1. SDS-PAGE**

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando o aparelho 'Mini - V8.1 0 Vertical Gel Electrophoresis System, Gibco BRL'. O gel de separação foi preparado com acrilamida a 12 % e o gel de concentração com acrilamida a 5 % segundo Sambrook *et al.* (1989). As amostras foram fervidas em tampão de amostra 1 X (50 mM Tris, pH 6,8 + 100 mM DTT + 2 % SDS + 0,1 % BPB + 10 % glicerol) por 5 min, deixadas esfriar e submetidas a centrifugação resfriada a 3.400 g por 5 min. Cada poço do gel recebeu 15 µL da amostra a ser analisada, exceto o poço que continha amostra do vírus semi-purificado, que recebeu 3 µL. Foi utilizado como marcador de peso molecular o Low Molecular Weight Marker (Pharmacia). Foi efetuada a eletroforese, numa condição de 150 V, com tampão de corrida 1 X (25 mM Tris + 250 mM glicina, pH 8,3 + 0,1 % SDS). A corrida foi interrompida quando o corante azul de bromofenol alcançou o final do gel. Foi feita uma duplicata deste gel para posterior análise por *Western blotting* (2.2.10.2).

Um gel foi retirado do aparato e incubado por 30 min em solução corante Coomassie Brilliant Blue (40 % metanol + 10 % ácido acético + 0,15 % (p/v) coomassie brilliant blue). Após este período o gel foi colocado em água destilada e fervido para decorar e permitir a visualização da banda da proteína do capsídeo.

### **2.2.10.2. Western blotting**

Após a eletroforese, o segundo gel da etapa anterior foi submetido à técnica de imunodeteção (Hampton *et al.*,1990). As proteínas separadas no gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose PVDF (Millipore), utilizando o tampão de transferência (39 mM glicina + 48 mM Tris base + 0,037 % SDS + 20 % metanol) e o aparelho Mini - V8.10 Vertical Gel Electrophoresis System - Electrophoretic transfer blotting, Gibco BRL. A transferência foi feita por 60 min a 100 V. A membrana contendo as proteínas das amostras foi submetida a uma reação sorológica, com anti-soro contra a proteína da capa protéica do isolado C17. De acordo com o procedimento descrito para Dot-ELISA (item 2.2.9).

### 2.2.11. Extração do RNA total

O RNA viral foi extraído de amostras de folhas da planta indicadora *Nicotiana benthamiana* infectada com o isolado C17, mantidas em casa de vegetação na Embrapa Hortaliças, utilizando-se *Plant RNA Reagent* (Invitrogen). As amostras foliares foram maceradas em nitrogênio líquido e a extração feita seguindo o protocolo do reagente comercial.

Cem (100) mg de tecido de folhas de *N. benthamiana* infectada com o isolado C17, foram pulverizados em microtubos de 1,5 mL mergulhados em nitrogênio líquido. Ao material triturado, foi adicionado 500 µL de *Plant RNA Reagent*. Inverteu-se os tubos por 30 s; com posterior repouso na horizontal à temperatura ambiente por 5 min; centrifugou-se por 3 min a 15.800 g a temperatura ambiente, coletou-se o sobrenadante e adicionou-se a este 100 µL de NaCl 5 M, inverteu-se o microtubo, e adicionou-se 300 µL de clorofórmio, misturando-se vigorosamente por 60 s. Após este período, centrifugou-se a 15.800 g, por 10 min, a temperatura ambiente. O sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para outro microtubo adicionado de 500 µL de isopropanol, e deixado a temperatura ambiente por 1 min. Para precipitação do RNA total, o material foi centrifugado por 10 min, 15.800 g a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e lavado duas vezes com etanol 70 % gelado. Após a secagem do sedimento à temperatura ambiente, este foi ressuscitado em 30 µL de água tratada com 0,1 % dietil pirocarbonato de sódio (DEPC) e autoclavada.

### 2.2.12. Síntese da primeira fita do cDNA da região 3' terminal

A partir do RNA total, foi sintetizado um DNA complementar (cDNA) ao RNA genômico viral por transcrição reversa (RT), utilizando o primer oligo dT M4T (Chen *et al.*, 2001), capaz de anelar na extremidade 3' final (cauda poli(A)) do RNA viral, e a transcriptase reversa *Moloney murine leukemia virus*, MMuLV (Invitrogen).

A reação foi composta por 2 µL do RNA total, 1 µL (100 ng/µL) do primer complementar a fita viral (M4T), 4 µL de dNTPs 2,5 mM (GE) e 5 µL de água autoclavada, que foi aquecida a 90 °C por 2 min. Após esse período, manteve-se em gelo por 3 min,

onde foi adicionado 4  $\mu\text{L}$  do tampão da enzima MMuLV RT 5 X, 1  $\mu\text{L}$  da enzima MMuLV-RT (200 U/ $\mu\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  DTT 0,1 M, 1  $\mu\text{L}$  RNaseOUT (40 U/ $\mu\text{L}$ , invitrogen) em um volume final de 20  $\mu\text{L}$ . A seguir, a amostra foi incubada a 37 °C em banho-maria por 1 h, sendo utilizada posteriormente em reações de PCR.

### **2.2.13. Amplificação via PCR e confirmação por eletroforese em gel de agarose**

Para as reações de PCR foram utilizados 2  $\mu\text{L}$  do cDNA (item 2.2.12) para cada 50  $\mu\text{L}$  da reação total. Sendo, 5  $\mu\text{L}$  de tampão *Taq* DNA polymerase 10 X (para concentração final de 1 X), 2  $\mu\text{L}$  de dNTPs 2,5 mM (GE), 4  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM, 1  $\mu\text{L}$  da enzima *Taq* DNA polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ , invitrogen), 1  $\mu\text{L}$  (100 ng/ $\mu\text{L}$ ) do primer senso, Sprimer (Chen *et al.*, 2001), e 1  $\mu\text{L}$  (100 ng/ $\mu\text{L}$ ) do primer reverso, M4 (Chen *et al.*, 2001), completando com água autoclavada para um volume final de 50  $\mu\text{L}$ . As amostras foram submetidas a amplificação no termociclador.

Inicialmente as amostras foram aquecidas a 94 °C por 5 min, sendo posteriormente submetidas a 30 ciclos de 94 °C por 30 s para desnaturação, 1 min a 50 °C para anelamento dos oligonucleotídeos e 2 min a 72 °C para extensão. Para o término da extensão pela *Taq* DNA polymerase, após os 30 ciclos, a temperatura foi mantida a 72 °C por 5 min, sendo finalmente armazenadas a 4 °C .

Os resultados da amplificação foram visualizados em gel de agarose a 1 %, preparado em tampão 1 X TAE (0,04 M Tris-base + 57,1mL de ácido acético glacial + 0,001 M EDTA, pH 8,0), onde 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram misturados em 3  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra (0,25 % de azul de bromofenol + 30 % de glicerol) e aplicados no gel. A eletroforese foi realizada a 90 V. Como marcador foi utilizado o 1 *Kb Plus* DNA Ladder (Invitrogen). Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e visualizado sobre luz ultravioleta utilizando o aparato (Eagle EYE<sup>TM</sup>-II, Stratagene®).

#### 2.2.14. Clonagem

O fragmento de DNA específico, obtida via PCR de aproximadamente 1,7 kb, indicativo de infecção por *Potyvirus*, foi eluído da agarose através da utilização do Kit 'Pure Link™ Qick Gel Extraction' (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Foram adicionados 600 µL de *Gel Solubilization Buffer* (GS1) em 200 mg da banda do gel e foi incubado a 50 °C por 15 min, inverteu-se o microtubo e incubou-se por mais 5 mins a 50 °C. Após, a amostra foi passada para a coluna e centrifugada a 13.500 g por 1 min. Em seguida, foram adicionados 500 µL de GS1 na coluna, incubou-se à temperatura ambiente por 1 min e centrifugou-se a 13.500 g por 1 min. Foram adicionados na coluna 700 µL de Wash buffer com etanol, incubado à temperatura ambiente por 5 min e centrifugado a 13.500 g por 1 min. A solução que passou pela coluna foi descartada e outra centrifugação a 13.500 g por mais 1 min foi realizada, para eliminar todo o tampão de lavagem. A coluna foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, adicionaram-se 50 µL de água autoclavada aquecida à 65 °C e centrifugou-se a 13.500 g por 2 min. O cDNA eluído obtido foi estocado posteriormente à -20 °C. Após a eluição do gel, o fragmento de DNA amplificado foi ligado no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Vector (Promega). A reação de ligação do fragmento amplificado foi realizada de acordo com a recomendação do fabricante do vetor. Utilizaram-se 1 µL de pGEM<sup>®</sup>-T Vector (50 ng/µL), 5 µL de tampão de ligação 2 X, 1 µL da enzima T4 DNA ligase (3 U/µL) e 3 µL do fragmento amplificado (200 ng) em um volume final de 10 µL. Em seguida, a reação foi incubada por uma noite a 4 °C.

Células competentes de *E. coli* cepa XL1-Blue foram transformadas com a ligação por choque térmico: 2 µL da reação de ligação foram adicionados em 50 µL de células competentes 'XL1-Blue' e a mistura foi incubada no gelo por 30 min. Em seguida, incubou-se a 42 °C, por 2 min e, posteriormente, no gelo por mais 3 min. A seguir, adicionaram-se 500 µL de meio LB líquido (solução autoclavada de 5 g NaCl + 5 g Triptona + 2,5 g Extrato de levedura, em 500 mL de água destilada, o pH 7,5 ) (Sambrook *et al.*, 1989) e incubou-se por 1 h a 37 °C, em rotação constante de 220 rpm. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido (LB líquido adicionado 1,6 % (p:v) de ágar bacteriológico) com ampicilina (50 µg/mL) 40 µL de solução contendo 20 mg/mL de X-

GAL e 4  $\mu$ L de solução contendo 250 mg/mL de isopropil tio- $\beta$ -galactosideo (IPTG) por placa. As placas foram incubadas por uma noite a 37 °C.

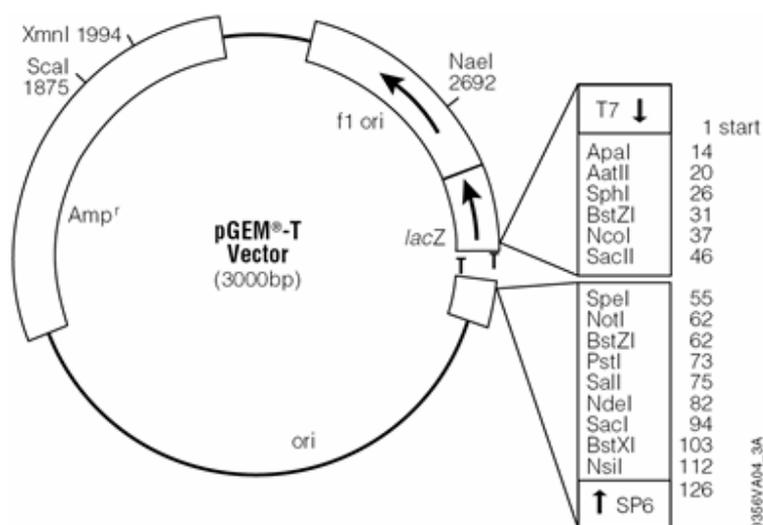
### **2.2.15. Seleção dos clones recombinantes**

Visando selecionar os clones recombinantes, as colônias brancas foram repicadas individualmente para tubos contendo 6 mL de meio LB líquido, adicionados de 50  $\mu$ g/mL de ampicilina. Estes tubos foram incubados por 16 h a 37 °C sob agitação constante. A seguir, a solução bacteriana de cada tubo originado de uma única colônia foi transferida para microtubo de 1,5 mL e procedida a precipitação das células bacterianas a 13.500 g em centrífuga por 1 min. Este procedimento foi repetido por mais uma vez. Após o descarte do sobrenadante foram adicionados 200  $\mu$ L de TEG (50 mM glucose + 25 mM Tris, pH 8,0 + 10 mM EDTA, pH 8,0). O 'pellet' foi ressuscitado completamente por agitação em vortex, acrescidos 400  $\mu$ L de solução desnaturante (NaOH 0,2 N, acrescido de SDS 1 %), incubando-se por 5 min em gelo. Após, foram adicionados 300  $\mu$ L de acetato de potássio 5 M (60 mL de acetato de potássio 5 M + 11,5 mL de ácido acético glacial + 28,5 mL de água) e incubou-se novamente no gelo por 3 min. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 13.500 g, transferindo o sobrenadante para um novo tubo e foram adicionados 100  $\mu$ L de clorofórmio, que após serem invertidos por 1 min, foram centrifugados por 5 min a 13.500 g. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, à qual foram adicionados 600  $\mu$ L de isopropanol e incubou-se a mistura por 5 min à temperatura ambiente. Uma última centrifugação para precipitação do DNA plasmidial, foi realizada por 5 min a 13.500 g. Concluída a precipitação, o sedimento foi lavado com etanol 70 % gelado, e secado a temperatura ambiente. O sedimento foi ressuscitado com 50  $\mu$ L de água autoclavada.

O vetor pGEM<sup>®</sup>-T Vector apresenta sítios de restrição que flanqueiam a região do fragmento clonado (Figura 2.1). Assim, para confirmar a clonagem dos fragmentos amplificados, 3  $\mu$ L do DNA plasmidial foram digeridos com as enzimas de restrição SacI (8 U/ $\mu$ L) e SacII (15 U/ $\mu$ L) (Amersham-Pharmacia), acrescidos de 1  $\mu$ L do tampão de

digestão 'One-Phor-All Buffer PLUS 10 X' (Amersham-Pharmacia) e 5 µL de água, por fim incubando durante uma noite a 37 °C.

Os produtos da digestão foram diluídos em 2 µL de tampão amostra (0,25 % de azul de bromofenol + 30 % de glicerol) em aplicados no gel de agarose a 1 % e acorrida com 90 V. Como marcador foi utilizado 1 *Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen). Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizado sobre luz ultravioleta. Os plasmídeos contendo o inserto de tamanho esperado foram o purificados utilizando-se o Kit 'QIAprep™ Spin Miniprep Kit Protocol' (QIAGEN), de acordo com as especificações do fabricante.



**Figura 2.1:** Esquema vetor pGEM<sup>®</sup>-T Vector (Promega) utilizado para realizar a clonagem do fragmento de cerca. 1.7 kb.

### 2.2.16. Sequenciamento e análise das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos.

Quatro clones foram selecionados para a determinação da seqüência de nucleotídeos dos fragmentos de DNA clonados (item 2.2.14). Utilizou-se o equipamento de sequenciamento automático, usando primers do vetor (T7 e SP6) e um primer interno, C17F (5' - AGC AGT TCA CTG ACT CCA CC - 3'), que foi desenhado após a obtenção das seqüências utilizando os primers do vetor.

As seqüências foram analisadas através do programa Staden Package (Staden *et al.*, 2003) e, posteriormente, utilizou-se o BLAST (Altschul *et al.*, 1997), que serviu como ferramenta para comparar a seqüência obtida com aquelas disponíveis no banco de dados. O programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) também foi utilizado para realizar o alinhamento múltiplo entre as seqüências completas de potyvírus depositadas no banco de dados juntamente com a obtida no estudo. A análise filogenética foi realizada com o método Neighbour-joining no programa Mega 3.1 (Kumar *et al.*, 2004). As comparações dois-a-dois foram realizadas no programa DNAMAN (Lynnon BioSoft).

#### **2.2.17. Desenvolvimento de ferramenta de detecção por RT-PCR**

Após obter a seqüência 3` terminal do isolado C17 e realizar sua análise, primers específicos foram desenhados, através da comparação do alinhamento da seqüência obtida com as seqüências mais próximas de outros potyvírus depositados no banco de dados. O programa OligoAnalyzer (<http://www.idtdna.com/analyzerApplications/ligoAnalyzer/>) foi utilizado para desenhar os primers.

Todas as combinações possíveis de primers foram testadas em RT-PCR, utilizando RNA total de folhas de *N. benthamiana* infectadas com o isolado C17. O procedimento para sintetizar a primeira fita complementar e o PCR foi similar ao descrito nos itens 2.2.12 e 2.2.13, respectivamente, sendo a única mudança os primers utilizados na reação.

#### **2.2.18. Avaliação do banco de germoplasma de mandioquinha-salsa da Embrapa Hortaliças por ELISA.**

Amostras de campo do banco de germoplasma de mandioquinha-salsa da Embrapa Hortaliças foram avaliadas por DAS-ELISA (Clark & Adams, 1977). No total foram avaliadas 96 amostras de 23 acessos distintos (BRA 817a; BRA 817b; BRA 809; URIN ♀; 90134 ♀; AC 90134; 94243; 96410; 96003; 4797; 94628; 94018; 92553; BGH 6513; ECU 23-19; ECU 2361; ECU 1216 1; ECU 1216 2; ECU 12 16 ♀ 1; ECU 1216 ♀ 2; ENC 4-12; ENC 4-3; ENC 4-4; ENC 4-9; ENC 4-23; ENC 4-19; e C3).

Foram avaliadas quatro amostras por acesso que dispunham replicações e, para alguns acessos que continham apenas um exemplar, não houve replicação. Portanto, pelo menos uma amostra de todos os acessos foi testada.

#### **2.2.19. Obtenção plantas livres de vírus**

Plantas de mandioquinha-salsa foram coletadas no campo da Embrapa Hortaliças para a realização de cultura de ápices caulinares.

Os filhotes foram desinfetados conforme o procedimento realizado por Madeira (2004). À partir deste procedimento, obtiveram-se os explantes, que foram cultivados individualmente em tubos de ensaio, contendo cerca de 15 mL de meio B5 (Gamborg *et al.*, 1968) acrescido de 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de ácido naftaleno acético (ANA-auxina), 0,3 mg.L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminoprina (BAP-citocinina) e 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), autoclavado. Estes foram mantidos em sala de crescimento por 4 meses e depois aclimatizados. Todos os tubos que apresentaram alguma contaminação com microorganismos ou cujos explantes não regeneraram foram eliminados.

As plantas obtidas foram indexadas para o isolado C17, através de ELISA-indireto, DAS-ELISA ou RT-PCR. Todas as plantas matrizes também foram avaliadas por ELISA-indireto ou DAS-ELISA.

### 2.3. Resultados

**Origem do isolado** – Durante um trabalho de micropropagação de mandioquinha-salsa, observou-se a presença de vírus em plantas cultivadas em Brasília-DF, Brasil. Uma planta de *Nicotiana benthamiana* inoculada com extrato foliar da planta matriz Amarelo de Carandaí número 17 (C17), apresentou sintomas típicos de viroses, como: deformação foliar, bolhosidades e mosaico (Figura 2.2). A purificação biológica foi realizada em *Chenopodium quinoa*, e após esta etapa, o isolado foi recuperado em plantas de *N. benthamiana* mostrando sintomas sistêmicos. Assim o isolado obtido foi denominado C17, nome originado da planta o qual foi isolado.



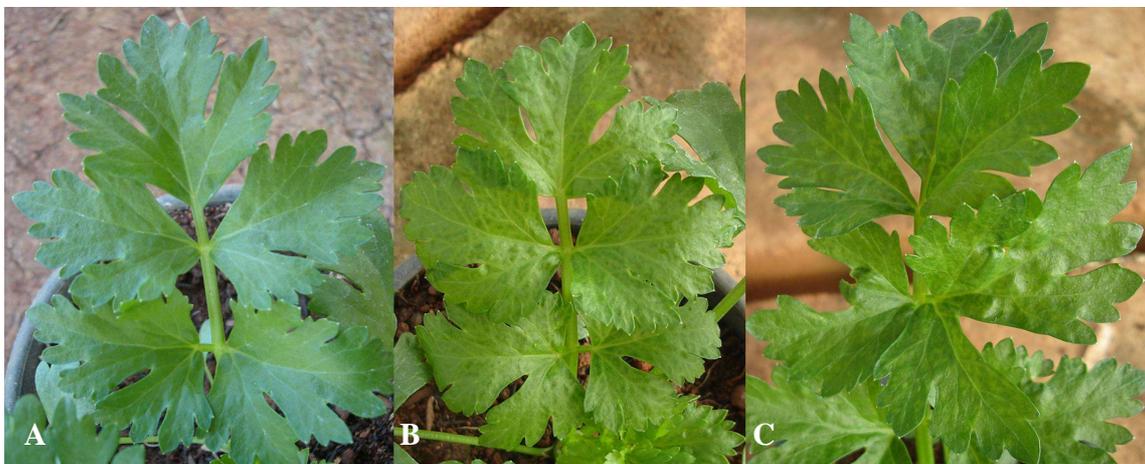
**Figura 2.2:** Sintomas de mosaico, deformação foliar e bolhosidade em *N. benthamiana* infectada com o isolado C17.

**Círculo de hospedeiros** – Dentre as 17 espécies de plantas testadas através de inoculação mecânica, apenas quatro foram suscetíveis ao isolado C17 (Tabela 2.2, Figuras 2.3 e 2.4). O resultado foi confirmado por Dot-ELISA ou DAS-ELISA. Neste último, as plantas com sintoma apresentaram absorvância variando de 0,959 - 2,059, enquanto o controle negativo apresentou absorvância média de 0,047. Nenhuma planta sem sintoma apresentou resultado positivo. Aparentemente, este vírus tem sua gama de hospedeiros restrita.

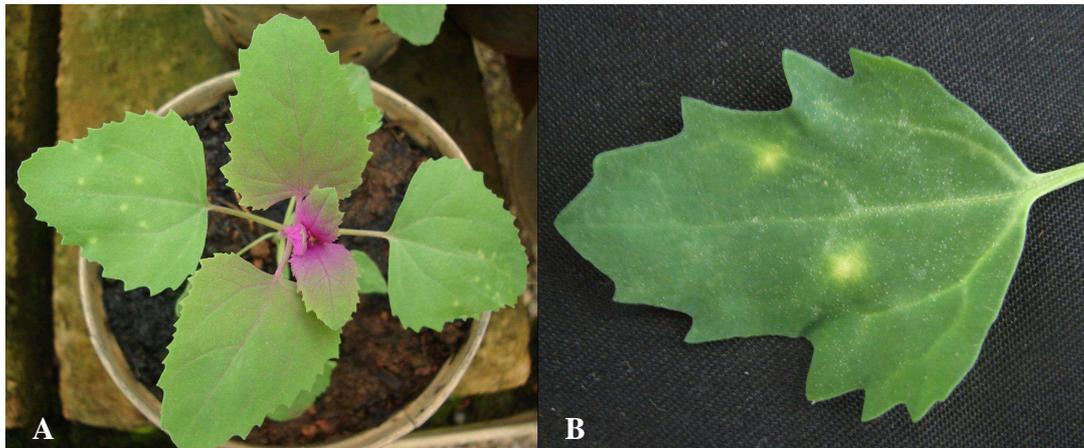
**Tabela 2.2:** Plantas utilizadas no teste de círculo de hospedeiros e resultado obtido.

Família	Espécie	Sintoma
Solanaceae	<i>Datura metel</i>	-
	<i>D. stramonium</i>	-
	<i>Nicandra physaloides</i>	-
	<i>Nicotiana bethamiana</i>	M/DF/B
	<i>N. tabacum</i> 'Samsun'	-
	<i>N. tabacum</i> 'TNN'	-
	<i>N. rustica</i>	-
	<i>Capsicum chinense</i> PI159236	-
	<i>C. annuum</i> 'Ikeda'	-
	<i>Physalis pubescens</i>	-
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium Quinoa</i>	LL
	<i>C. amaranticolor</i>	LL
	<i>C. murale</i>	-
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i>	-
Apiaceae	<i>Daucus carota</i>	-
	<i>Petroselinum crispum</i>	-
	<i>Apium graveolens</i>	Mo/CN

M = mosaico, DF = deformação foliar, B = bolhosidade, LL = lesão local clorótica, Mo = mosqueado, CN = clareamento de nervuras, (-) = sem sintoma.



**Figura 2.3:** Planta de aipo sadia (A) e infectada com o isolado C17 (B), (C).

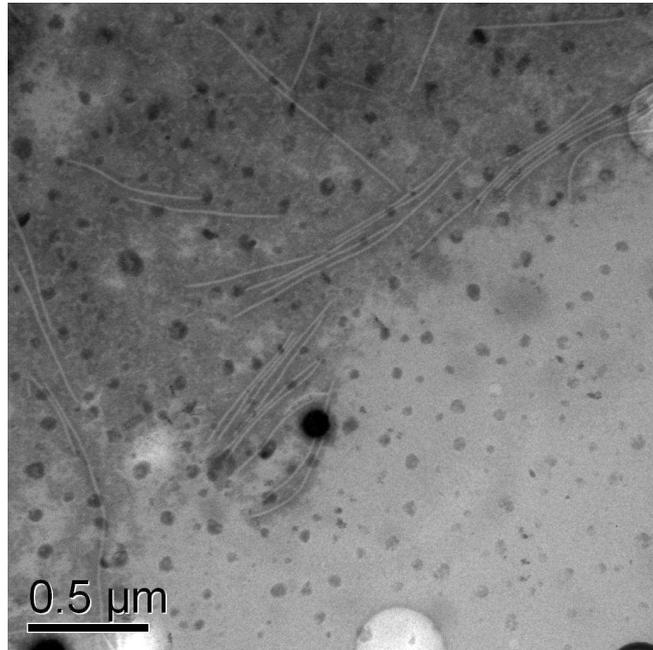


**Figura 2.4:** *C. amaranticolor* (A) e *C. quinoa* (B) infectadas mecanicamente com o isolado C17.

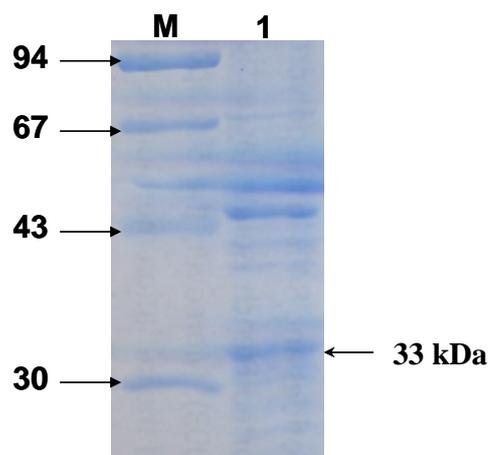
**Transmissão por inseto-vetor** – O isolado C17 foi transmitido pelo afídeo *Hyadaphis foeniculi* (Pass.) a *N. benthamiana*, em uma relação de transmissão do tipo não-persistente. As plantas utilizadas como controle (com a colocação de afídeos que não entraram em contato com plantas infectadas) não apresentaram sintoma e infecção, confirmando serem negativas e que o afídeo não possuía o vírus. De 14 plantas de *N. benthamiana* testadas, 10 foram infectadas com isolado C17. A infecção foi confirmada por DAS-ELISA.

**Morfologia e propriedades da partícula viral** - Foram observadas partículas alongadas e flexuosas ao microscópio eletrônico de transmissão, típicas de um potyvírus (Figura 2.5). Na análise da preparação semi-purificada em SDS-PAGE foi observada uma banda correspondente à proteína capsidial, com aproximadamente 33 kDa, além de outras proteínas maiores contaminantes (Figura 2.6). No *Western blotting* esta proteína de 33 kDa foi reconhecida especificamente pelo anti-soro policlonal produzido em coelho contra o isolado C17 (Figura 2.7), comprovando ser a proteína capsidial. Pode-se observar que a reação do anti-soro foi específica, sem reação heteróloga com proteínas do hospedeiro a

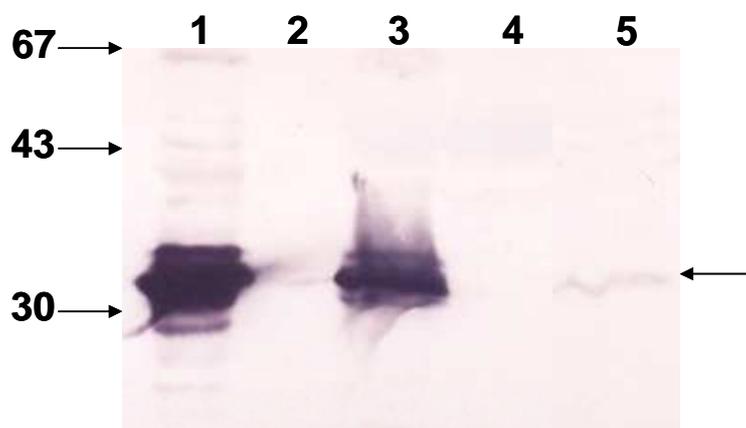
partir do qual o vírus foi purificado. As amostras de *N. benthamiana* e de aipo infectados com o isolado C17 também foram detectadas (Figura 2.7).



**Figura 2.5:** Micrografia eletrônica de transmissão da preparação purificada do isolado C17 contrastada com ácido fosfotungístico 2 %. (Foto: Bergmann Morais Ribeiro)



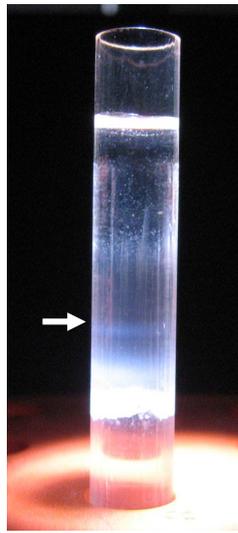
**Figura 2.6:** Análise da proteína capsial através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % da semi-purificação do isolado C17. M = marcador, 1 = preparação semi-purificada do isolado C17.



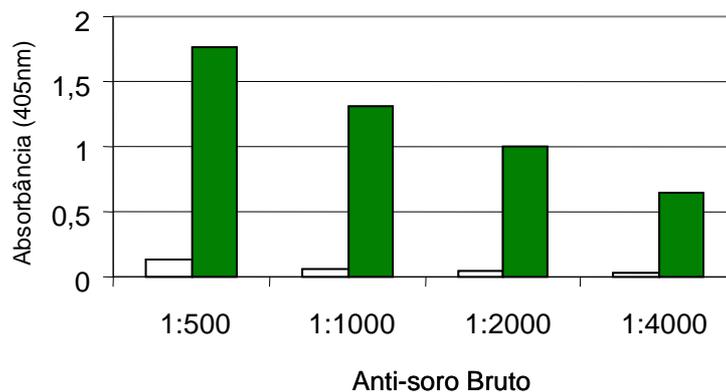
**Figura 2.7:** Análise de *Western blotting* da proteína da capa protéica usando o anti-soro policlonal produzido contra o isolado C17. A proteína de cerca de 33 kDa reagiu especificamente (seta) com o anti-soro contra o isolado C17. 1 = preparação semi-purificada do isolado C17, 2 = vazio, 3 = extrato foliar de *N. benthamiana* infectada com o isolado C17, 4 = extrato foliar de *N. benthamiana* sadia, 5 = extrato foliar de aipo infectado com o isolado C17.

**Anti-soro produzido** - após a centrifugação da preparação semi-purificada de partículas em gradiente de cloreto de céσιο, foi observada uma banda opalescente na metade inferior do gradiente (Figura 2.8). Esta região foi coletada e as partículas virais foram concentradas em nova ultracentrifugação. As partículas foram injetadas em coelho para a produção de anti-soro policlonal. Avaliou-se a especificidade e sensibilidade do anti-soro produzido em Elisa do tipo indireto, com diferentes diluições do anti-soro bruto (1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:4000; Figura 2.9). O anti-soro mostrou especificidade na detecção do isolado C17 em extratos de plantas de *N. benthamiana* infectadas e não foi observada reação com plantas saudias de *N. benthamiana* ou outras reações inespecíficas. Pode-se observar que nas quatro diluições utilizadas, o anti-soro reagiu com extrato de plantas infectadas, sendo que se utilizou como critério de separação o valor de duas vezes a média do controle negativo (Figura 2.9). Após avaliar a qualidade do anti-soro bruto obtido, foi realizada a purificação da IgG e a conjugação com a enzima fosfatase alcalina. Os testes de avaliação da IgG e da IgG-conjugada foram realizados por DAS-ELISA, com a avaliação das diluições 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:4000 para ambos. Não foi observada nenhuma reação com o extrato de planta sadia. Foi possível detectar o vírus em uma diluição até

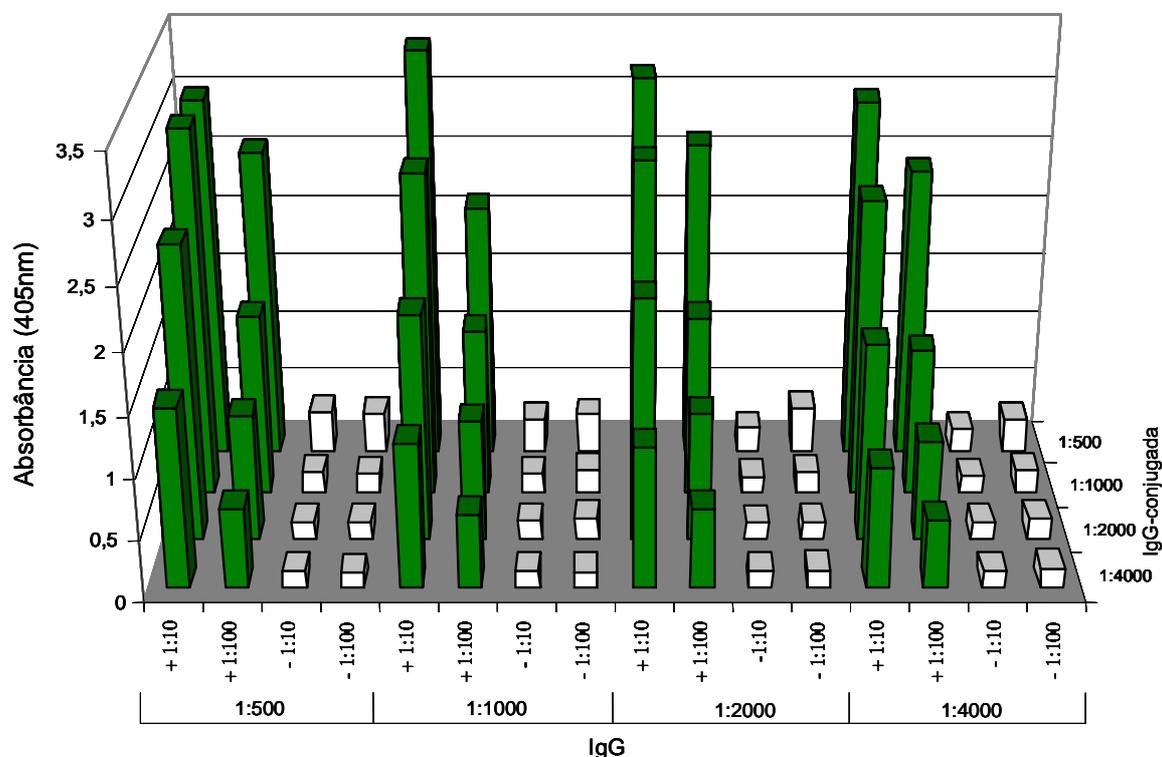
1:4000 da IgG e da IgG-conjugada (Figura 2.10), sem diferenças dentre diluições do antígeno. A diluição da IgG-conjugada influenciou a detecção. Quanto maior a concentração da IgG-conjugada, mais eficaz foi a detecção. A diluição selecionada para uso em detecção foi de 1:1000 tanto para a IgG quanto para a IgG-conjugada, pois foi a diluição em que a leitura de absorvância após 1 h da adição do substrato apresentou melhor contraste entre as amostras positivas.



**Figura 2.8:** Purificação da partícula completa do isolado C17 a partir de extrato foliar infectado de *N. benthamiana*. Seta indica a banda viral do isolado C17 após centrifugação em gradiente de fase de cloreto de cézio (isopícnic).



**Figura 2.9:** Resultado do ELISA-indireto para avaliação do anti-soro bruto produzido contra a proteína capsidial do isolado C17. O anti-soro bruto foi testado nas diluições 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:4000. O antígeno foi avaliado na diluição 1:50. As barras verdes representam os antígenos de extrato de *N. benthamiana* infectada com o isolado C17 e as brancas representam o controle negativo, *N. benthamiana* sadia.



**Figura 2.10:** Resultado de DAS-ELISA para avaliação da imunoglobulina G (IgG) e da imunoglobulina G conjugada à fosfatase alcalina (IgG-conjugada) contra a capa protéica do isolado C17, 4 h após a adição do substrato da enzima fosfatase alcalina. A IgG e a IgG-conjugada foram testadas nas diluições 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:4000. O antígeno foi testado nas diluições 1:10 e 1:100. As barras verdes representam os antígenos de extrato de *N. benthamiana* infectada com o isolado C17 e as brancas representam o controle negativo, *N. benthamiana* sadia.

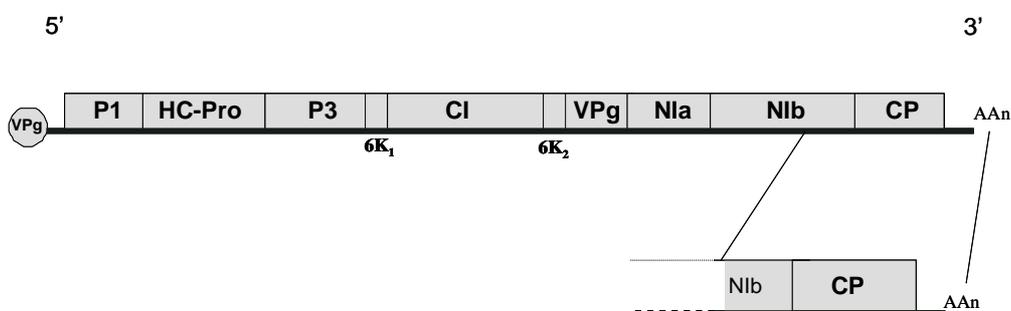
**Avaliação do banco de germoplasma de mandioquinha-salsa da Embrapa Hortaliças** - Um total de 96 amostras do campo do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças foram avaliadas por DAS-ELISA utilizando o anti-soro produzido contra o isolado C17. Dessas, 93 % apresentaram reação positiva (Tabela 2.3). Os valores da absorbância das amostras positivas variaram de 0.108 a 2.832. Todas amostras acima do valor de absorbância 0,096 (acima 2 vezes da média do controle negativo) foram consideradas positivas. Foi detectada uma alta incidência de vírus sorologicamente relacionado ao isolado C17 nos materiais do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças.

**Tabela 2.3:** Origem dos acessos das amostras do banco de germoplasma de mandioquinha-salsa da Embrapa Hortaliças e incidência de vírus (isolado C17).

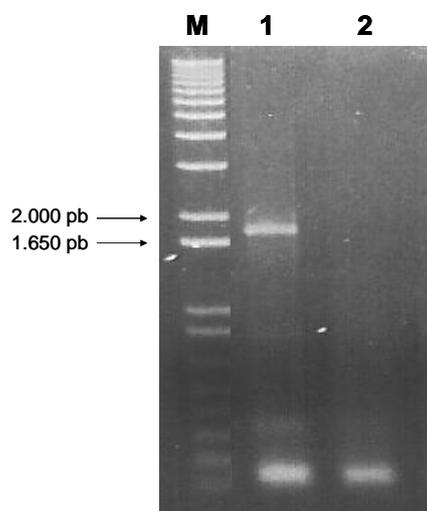
Origem acesso	Total	DAS-ELISA +
Sementes botânicas Equador	12	12
Sementes botânicas Brasil	30	27
INIAP – Equador	24	21
SNT – Canoinhas	18	18
Amarela de Carandaí	8	7
Viçosa – BGH6513	4	4

INIAP: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias – Equador, SNT: Escritório de Negócios Tecnológicos da Embrapa Transferência de Tecnologia – Canoinhas (SC); (+): amostras positivas.

**Seqüência 3' terminal do genoma** – Para completar a caracterização do isolado e determinar se o isolado é uma nova espécie de potyvírus, realizou-se a clonagem da região 3' terminal do genoma de C17. Utilizando-se os primers universais para potyvírus, M4T e Sprimer, foi possível amplificar um fragmento de DNA de aproximadamente 1,7 kb, correspondente à região 3' terminal de um potyvírus (Figura 2.11), a partir de RNA total extraído de *N. benthamiana* infectada com o isolado C17. No gel de agarose 1 % (Figura 2.12) foi visualizado um DNA de tamanho correspondente ao esperado (cerca de 1,7 kb).

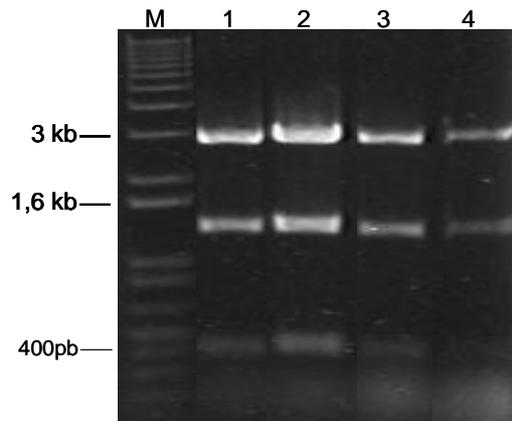


**Figura 2.11:** Representação esquemática da organização genômica de potyvírus indicando a região amplificada pelos primers M4T e Sprimer.



**Figura 2.12:** Análise do produto da PCR em gel de agarose 1 %, mostrando o produto específico de potyvírus amplificado. M = marcador 1 *Kb Plus DNA Ladder*, 1= *N. benthamiana* infectada com o isolado C17, 2 = *N. benthamiana* sadia.

O fragmento de 1,7 kb amplificado por RT-PCR foi clonado no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Vector. Várias colônias brancas foram obtidas, resultantes do plaqueamento das células transformadas por choque térmico, com o fragmento amplificado por RT-PCR, ligados ao vetor. As maiores e mais definidas foram selecionadas, repicadas individualmente, das quais o DNA plasmidial foi isolado e digerido com as enzimas de restrição SacI e SacII. Após a digestão enzimática, pode-se observar que houve a liberação de dois fragmentos que somados são correspondentes ao inserto de DNA clonado de aproximadamente 1,7 kb (Figura 2.13). Dois clones foram selecionados correspondentes à transformação das bactérias com o fragmento amplificado. Estes foram seqüenciados em sequenciador automático, utilizando os primers do vetor, T7 e SP6, e o primer interno C17F.



**Figura 2.13:** Análise de digestão das mini preparações dos clones positivos com as enzimas SacI e SacII. M = marcador 1 Kb Plus DNA Ladder, 1, 2, 3 e 4 = clones com liberação de dois fragmentos correspondentes ao inserto de DNA clonado de 1,7 kb e o vetor de 3,0 kb.

As seqüências dos dois clones foram obtidas (Clones C17-9 e C17-15) e analisadas, diferindo em dois nucleotídeos. Foi escolhida a seqüência do clone C17-15 para realização das análises subsequentes. A seqüência do inserto continha 1676 nucleotídeos apresentando uma única ORF a partir da posição 1 até 1480, e seguido pela região 3' não traduzida (3' UTR) de 199 nucleotídeos e uma cauda poliadenilada. A seqüência nucleotídica foi depositada no banco de dados GenBank com o número de acesso DQ925486.

A seqüência de nucleotídeos foi utilizada para a dedução da seqüência de aminoácidos, que resultou em uma poliproteína sem o códon de iniciação com 492 aminoácidos, incluindo 215 aa da C-terminal da proteína de inclusão nuclear b (Nlb) e toda a capa protéica (CP) com 277 aa. O provável sítio de clivagem da Nlb/CP é VYHQ<sub>278</sub>/G<sub>277</sub>, baseado na descrição dos sítios de clivagens mais freqüentes nos potyvírus (Adams *et al*, 2005b).

A seqüência do motivo conservado da polimerase potyviral, o GDD (Shukla *et al*, 1994), foi encontrado na Nlb na posição 38-40, a partir do início da seqüência obtida da Nlb. O motivo GDD tem sido relatado como o sítio da atividade da RNA-dependente RNA polimerase (Domier *et al*, 1987). Outro motivo encontrado, que é conservado entre os *Potyvirus* e está relacionado com a transmissão pelo vetor, é o DAG, na posição 7-9, a partir do sítio de clivagem Q/G dentro da capa protéica (CP).

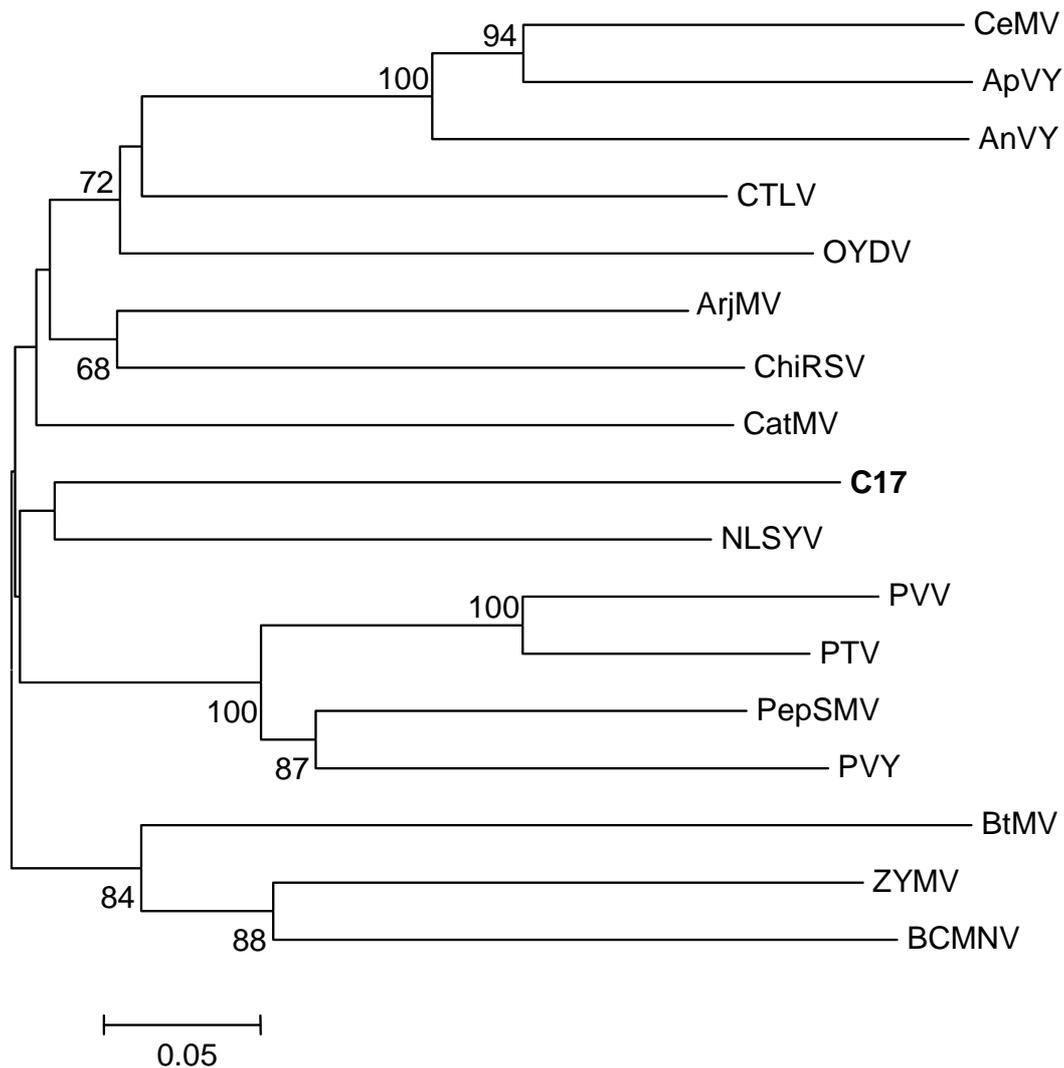
A seqüência de aminoácidos da CP apresentou 60 % de identidade com o *Narcissus late season yellows virus* (AJ493579) e 60 % com o *Peru tomato mosaic virus* (NC\_004573), os mais próximos potyvírus ao C17. A seqüência nucleotídica da CP também apresentou identidade de 63 % com *Catharanthus mosaic virus* (DQ365928) e de 62 % com *Araujia mosaic virus* (EF710625). A seqüência da região 3'UTR do C17 é de 199 nucleotídeos e apresentou identidade mais alta com *Beet mosaic virus* (NC\_005304) de 46 % (Tabela 2.4).

**Tabela 2.4:** Comparação da seqüência da capa protéica e 3' UTR do isolado de potyvírus C17, proveniente de mandioquinha-salsa, com potyvírus que apresentaram identidade da seqüência de aminoácido e de nucleotídeo mais próximos.

Vírus	CP		3' UTR	
	%aa	%nt	% nt	n°. nt
NLSYV	60.4	61.9	28.3	210
PTV	60.1	59.8	22.2	471
OYDV	60.0	60.3	26.5	216
ArjMV	59.8	62.4	30,8	289
PepSMV	59.3	61.5	24.2	468
BtMV	59.2	58.8	45.5	171
CatMV	58.8	63.3	27.7	286
PVY	58.6	59.7	28.3	331
ChiRSV	58.3	58.7	29.6	180
PVV	56.7	60.8	26.2	446
ZYMV	55.1	57.7	29.8	213

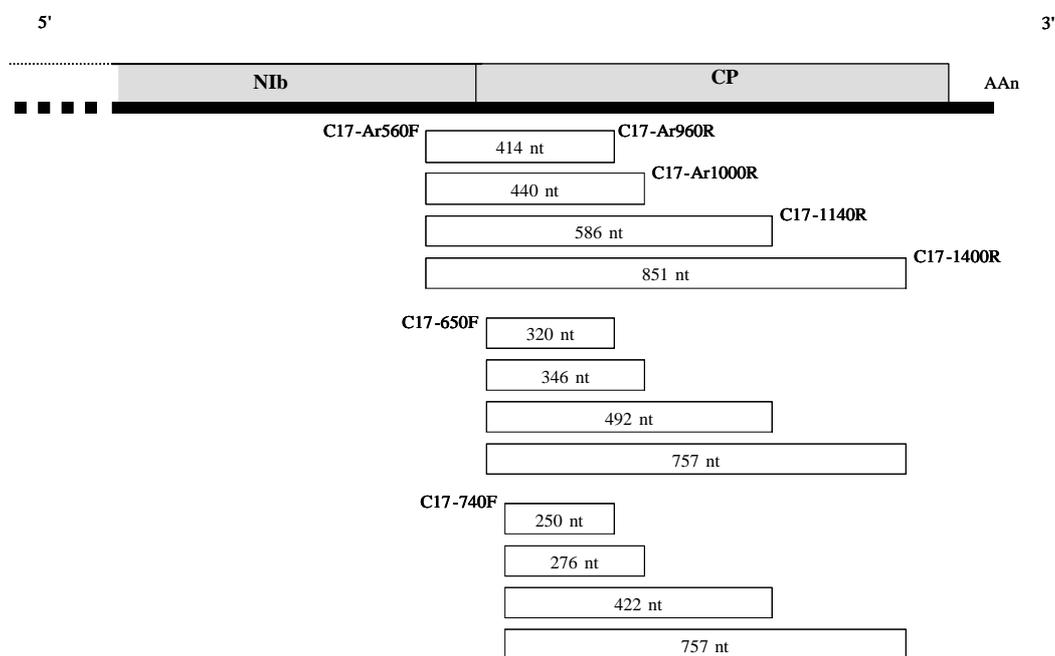
NLSYV = *Narcissus late season yellows virus* (AJ493579); PTV = *Peru tomato mosaic virus* (NC\_004573); OYDV = *Onion yellow dwarf virus* (NC\_005029); ArjMV = *Araujia mosaic virus* (EF710625); PepSMV = *Pepper severe mosaic virus* (NC\_008393); BtMV = *Beet mosaic virus* (NC\_005304); CatMV = *Catharanthus mosaic virus* (DQ365928); PVY = *Potato virus Y* (NC\_001616); ChiRSV = *Chilli ringspot virus* (DQ925438); PVV = *Potato virus V* (NC\_004010); ZYMV = *Zucchini yellow mosaic virus* (NC\_003224).

Pela análise filogenética de bootstrap realizada com as seqüências nucleotídicas da capa protéica utilizando o método Neighbour-joining com 1000 repetições (Figura 2.14), o isolado C17 foi relacionado com o *Narcissus late season yellows virus* (AJ493579) e está distante de outro potyvírus que infectam apiaceae, como o *Angelica virus Y - AnVY* (EF488741), o *Celery mosaic virus - CeMV* (AJ271087), o *Carrot thin leaf virus - CTLV* (AF203530) e o *Apium virus Y - ApVY* (AF207594).



**Figura 2.14:** Árvore filogenética obtida com a seqüência de nucleotídeos da capa protéica do isolado C17, de potyvírus mais próximos e também dos potyvírus que infectam hospedeiros na família apiaceae, utilizando o programa MEGA 3.1 e método Neighbour-joining, com 1000 repetições. Os valores de bootstrap iguais ou superiores a 60 % estão indicados na base da cada ramificação. NLSYV = *Narcissus late season yellow virus* (AJ493579); PTV = *Peru tomato mosaic virus* (NC\_004573); OYDV = *Onion yellow dwarf virus* (NC\_005029); ArjMV = *Araujia mosaic virus* (EF710625); PepSMV = *Pepper severe mosaic virus* (NC\_008393); BtMV = *Beet mosaic virus* (NC\_005304); CatMV = *Catharanthus mosaic virus* (DQ365928); PVY = *Potato virus Y* (NC\_001616); ChiRSV = *Chilli ringspot virus* (DQ925438); PVV = *Potato virus V* (NC\_004010); ZYMV = *Zucchini yellow mosaic virus* (NC\_003224); AnVY = *Angelica virus Y* (EF488741), CeMV = *Celery mosaic virus* (AJ271087), CTLV = *Carrot thin leaf virus* (AF203530); ApVY = *Apium virus Y* (AF207594); BCMNV = *Bean common mosaic necrosis virus* (NC\_004047).

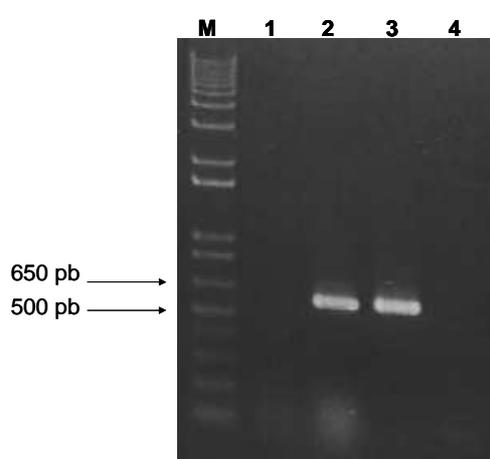
**Desenvolvimento de ferramenta de detecção por RT-PCR** – Quatro primers foram desenhados a partir do alinhamento da seqüência 3' terminal do C17 com outros potyvírus relacionados (Figura 2.14; Tabela 2.5). Estes foram testados com plantas de *N. benthamiana* sadia e infectada com o isolado C17. As combinações destes primers não foram eficientes: não amplificaram um produto específico ou amplificaram fragmentos de *N. benthamiana* sadia. Posteriormente, mais três primers foram desenhados (Figura 2.14; Tabela 2.5) e todas as combinações foram testadas com plantas de *N. benthamiana* sadia e infectada com o isolado C17. O par de primers C17-Ar560F (5'-GCT TTC AGC GAA ATT GAT G-3') e C17-1140R (5'- GTC TTA GAG TTG GCT GAG C-3') foi o mais eficiente com amplificação específica de um fragmento de DNA de aproximadamente 580bp (Figura 2.15). As outras combinações testadas não foram eficientes, pois não amplificaram um único fragmento ou não amplificaram o fragmento de tamanho esperado. Os primers C17-Ar560F e C17-1140R também foram testados com amostras de mandioquinha-salsa infectadas, na qual se confirmou a eficiência e especificidade dos primers, sendo selecionados para uso em diagnose por RT-PCR.



**Figura 2.14:** Esquema da região 3' terminal do C17 mostrando os primers avaliados para amplificação específica do vírus. O nome de cada primer encontra-se fora dos retângulos na posição correspondente ao genoma (em cinza, acima). O tamanho do fragmento a ser amplificado por cada combinação de dois primers encontra-se dentro dos retângulos.

**Tabela 2.5:** Seqüência dos oligonucleotídeos específicos desenhados.

Oligonucleotídeos	Seqüência	Senso/Reverso
C17-650F	5' AAA CAG TGG ATG CTG GGA AG 3'	Senso
C17-740F	5' AGA CCA AGA AGA GGG AAA GC 3'	Senso
C17-1140R	5' GTC TTA GAG TTG GCT GAG C 3'	Reverso
C17-1400R	5' GTA CTC TCC TCA CTG TTC CC 3'	Reverso
C17-Ar560F	5' GCT TTC AGC GAA ATT GAT G 3'	Senso
C17-Ar960R	5' CTC TCG CTT TAT GGC TTC 3'	Reverso
C17-Ar1000R	5' CCC AAA CCA TCA TCT CCC 3'	Reverso



**Figura 2.15:** Análise em gel de agarose 1 % do produto de PCR amplificado utilizando a combinação de primers C17-Ar560F e C17-1140R. M = marcador 1 Kb DNA Plus Ladder, 1 = *N. benthamiana* sadia, 2 = *N. benthamiana* infectada com o isolado C17, 3 = mandioquinha-salsa infectada, 4 = mandioquinha-salsa sadia.

**Avaliação da eficiência das técnicas de detecção** - Trinta e cinco amostras de mandioquinha-salsa foram coletadas no campo da Embrapa Hortaliças para a validação do método biológico, sorológico e molecular de detecção. O extrato foliar dessas amostras foi inoculado mecanicamente em *N. benthamiana*, avaliadas por DAS-ELISA e por RT-PCR. Após 25 dias da inoculação os sintomas típicos do isolado C17 foram observados em 21 plantas de *N. benthamiana* (Tabela 2.6). Este resultado foi confirmado por DAS-ELISA para comprovar a infecção. Nenhuma planta sem sintoma reagiu positivamente. As trinta e cinco amostras do campo também foram avaliadas por DAS-ELISA e 31 apresentaram positivas (acima 2 vezes da média do controle negativo) (Tabela 2.6). Todas as amostras

também foram avaliadas por RT-PCR, utilizando os primers específicos determinados para uso em detecção. Neste teste, 33 amostras apresentaram amplificação do fragmento esperado (Tabela 2.6).

**Tabela 2.6:** Avaliação da eficiência das técnicas de detecção, por planta indicadora: utilizando inoculação mecânica em *N. benthamiana*, por DAS-ELISA: utilizando a IgG e IgG-conjugada produzida para a CP do isolado C17, e por RT-PCR: utilizando os primers C17-Ar560F e C17-1140R.

Amostra	Planta indicadora	DAS-ELISA	RT-PCR
ENC 01-23 A	-	+	+
ENC 4-3 27/07	+	+	+
ENC 4-4 27/07	+	+	+
ENC 4-4	-	+	+
ENC 4-5	+	+	+
ENC 4-9	+	+	+
ENC 4-10 27/07	+	+	+
ENC 4-12	+	+	+
ENC 4-17	+	+	+
ECU 1216 ♀ 1	-	+	+
ECU 1216 ♀ 2	-	+	+
ECU 1216 1	-	+	+
ECU 1216 2	-	-	-
ECU 1216 27/07	-	+	+
ECU 2361	-	+	+
ECU 2319	+	+	+
BRA 817a	+	+	+
BRA 817b	+	-	+
BRA 817b 27/07	+	+	+
BRA 809	+	+	+
4797	-	+	+
96003	+	+	+
94628	-	+	+
94018	+	+	+
96405	+	+	+
94243	+	+	+
96410	+	+	+
AC 90134 1	+	+	+
AC 90134 2	-	-	-
90134 ♀	+	+	+
ASA 1	-	+	+
ASA 2	-	+	+
ASA 3	+	+	+
URIN ♀	-	+	+
BGH 6513	+	-	+

( - : plantas negativas; + : plantas positivas)

**Obtenção de plantas livres de vírus** – Devido à provável alta infecção de vírus em plantas de mandioquinha-salsa, à dificuldade em mantê-las em casa-de-vegetação e produção de sementes botânicas, foi necessário obter plantas saudáveis de mandioquinha-salsa por cultura de ápice caulinar. Foram inoculados 152 explantes oriundos da cultivar Amarela de Senador Amaral, 81 explantes de Amarela de Carandaí e 55 explantes oriundas do acesso 94243 do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças. Foi observada uma baixa taxa de contaminação (6,6%), porém muitos explantes não regeneraram. Os explantes regenerados foram aclimatizados em casa-de-vegetação à temperatura ambiente. A mandioquinha-salsa necessita de uma temperatura amena (15 a 18 °C) para o seu bom desenvolvimento, o que não se obtém nas casas-de-vegetação da Embrapa Hortaliças. Portanto, mesmo com todos os cuidados adotados, foram obtidas apenas 4 plantas oriundas de cultura de tecido. Essas foram indexadas por DAS-Elisa e RT-PCR sendo que duas apresentaram-se positivas para o isolado C17. Ao final foram recuperadas apenas duas plantas de mandioquinha-salsa livres de vírus relacionados ao isolado C17. Estas plantas foram mantidas em casa-de-vegetação para obtenção de seus filhotes, e assim poder realizar teste de transmissão do isolado C17 a plantas de mandioquinha-salsa saudáveis e observar seus sintomas, para cumprimento dos postulados de Koch. Os testes de infectividade em mandioquinha-salsa ainda não foram realizados.

## 2.4. Discussão

A morfologia da partícula observada por microscopia eletrônica e a massa molecular da proteína capsidial são compatíveis com as características da família *Potyviridae* (Shukla *et al.*, 1994; Fauquet *et al.*, 2005; Hiebert & McDonald, 1973; Huttinga, 1975). Outra característica de potyvírus que o isolado C17 de mandioquinha-salsa apresenta é a sua relação de transmissão do tipo não-persistente por afídeos. Finalmente, a partir da análise da seqüência 3' terminal do isolado C17 foi possível concluir que o vírus apresenta uma estratégia genômica típica de potyvírus (Shukla *et al.*, 1994; Fauquet *et al.*, 2005) e um sítio de clivagem entre as proteínas Nib e CP semelhante aos mais frequentes descritos para os potyvírus (Adams *et al.*, 2005b). A presença do tripeptídeo DAG, na posição 7-9 na região N-terminal da CP é típico em potyvírus (Gal-On *et al.*, 1992; Atreya *et al.*, 1991; Blanc *et al.*, 1997), estando relacionado com a transmissão por afídeos. A seqüência de aminoácidos da CP apresentou maior identidade com o Narcissus late season yellows virus, enquanto a seqüência nucleotídica apresentou maior identidade com Catharanthus mosaic virus (Tabela 2.4). A seqüência da região 3'UTR do C17 apresentou identidade mais alta, embora baixa (46 %), com *Beet mosaic virus* (BtMV).

Adams *et al.* (2005a) analisaram várias seqüências de potyvírus e sugeriram o valor de 82 % e 76 % de identidade da seqüência de aminoácidos e nucleotídeos da CP, respectivamente, como critério para demarcação de espécies. Eles também propuseram que a identidade de nucleotídeos da 3' UTR de diferentes espécies não exceda a 76 %. Com base nestes critérios, o isolado C17 de mandioquinha-salsa pode ser considerado como uma nova espécie de vírus pertencente ao gênero *Potyvirus*.

Pela análise filogenética o isolado C17 tem um relacionamento mais próximo com Narcissus late season yellows virus (AJ493579), um vírus que tem *Narcissus* sp. (família Amaryllidaceae) como único hospedeiro conhecido (Mowat *et al.*, 1988) e de ocorrência no Reino Unido e Holanda. Entretanto, é possível que tenha uma distribuição mundial, uma vez que as flores de narciso são altamente apreciadas pela sua beleza e há um comércio internacional de cultivares de narciso ativo. É possível que o isolado C17 e o NSYLV apresentem um ancestral remoto em comum. Por outro lado, este isolado apresentou baixo relacionamento filogenético com outros potyvírus que infectam apiaceae, sugerindo que sua

evolução ocorreu de forma independente de outras espécies capazes de infectar as plantas dessa família.

O círculo de hospedeiros de um vírus é tradicionalmente utilizado como importante ferramenta de diagnose. A gama de hospedeiros do isolado C17 foi determinada e demonstrou ser bem restrita, infectando quatro hospedeiros experimentais, além de seu hospedeiro natural, *Arracacia xanthorrhiza*. A determinação do círculo de hospedeiros era a única técnica disponível aos virologistas nos anos 1920 a 1930 e ainda se constitui no primeiro passo para a identificação de novos isolados de vírus em muitos laboratórios em todo o mundo. Apesar de ser uma técnica que já permitiu a distinção de muitos vírus, incluindo vários potyvírus (Bos, 1992), atualmente não é o critério mais adequado para distinguir espécies de vírus. Os critérios descritos pelo ICTV (Fauquet *et al.*, 2005) para demarcar espécies dentro do gênero *Potyvirus* é a identidade da seqüência genômica, as propriedades antigênicas, o modo de transmissão, a patogenicidade e citopatologia, e também o círculo de hospedeiros. Este pode ser usado para relacionar espécies, sendo mais útil para delinear estirpes. É comum diversos vírus causarem sintomas semelhantes ou mesmo indistinguíveis em determinado hospedeiro, como também, o mesmo vírus pode ocasionar sintomas diferentes ao infectar espécies distintas. Porém, de acordo com a experiência do virologista, a observação de sintomas pode se constituir em uma ferramenta poderosa e essencial na diagnose.

O círculo de hospedeiro do isolado C17 pode ser um primeiro passo para distinguí-lo de outros vírus que infectam mandioquinha-salsa. O AVA e o AVB infectam *Chenopodium murale*, espécie a qual o isolado C17 não foi infectivo. O AVY infecta *Nicotiana tabacum* TNN e Samsun (ICTVdB Management, 2006a), espécie a qual o isolado C17 também não foi infectivo. O ALV infecta *Gomphrena globosa* (ICTVdB Management, 2006b), a qual o isolado C17 também não infecta. Esse é um passo importante, já que destes vírus, somente o AVB (AJ616713) apresenta seqüência genômica disponível em banco de dados públicos. Apesar dessas diferenças no círculo de hospedeiros, não se pode descartar que uma dessas espécies descritas acima seja da mesma espécie que o isolado C17. Estudos sorológicos e moleculares podem elucidar esta questão.

Utilizando o anti-soro policlonal produzido neste trabalho em DAS-ELISA, foi possível avaliar o banco de germoplasma de mandioquinha-salsa da Embrapa Hortaliças. A

incidência do isolado C17 na coleção de germoplasma foi de quase 100%. Isto pode representar a situação real da cultura de mandioquinha no Brasil, ou demonstra que o vírus tem uma dispersão em uma taxa de infecção alta, considerando que o banco de germoplasma, cuja manutenção se dá em cultivo em campo, foi formado no ano de 1990 na Embrapa Hortaliças.

Embora a sorologia seja uma técnica amplamente utilizada para a detecção e diagnose de viroses vegetais, a utilização de técnicas moleculares vem se tornando cada vez mais comum e rotineira. O uso de técnicas moleculares na detecção e identificação de vírus não é restrito a capa protéica, como na sorologia, podendo detectar qualquer porção do genoma viral, ocorrendo menor chance de reações cruzadas, fenômeno comum entre os potyvírus

A utilização da RT-PCR como método para detecção de vírus pode permitir, além da detecção precisa, a classificação e estudos taxonômicos de vírus, através de subseqüentes análises moleculares (Langeveld *et al.*, 1991). A utilização de PCR com primers degenerados consiste em um método bastante útil para a detecção de infecção mista por potyvírus distintos (Colinet *et al.*, 1994) e também de novos membros do gênero *Potyvirus*. Vários primers degenerados já foram descritos e utilizados para detecção de *Potyvirus* (Langeveld *et al.*, 1991, Colinet *et al.*, 1994, Bateson & Dale, 1995, Gibbs & Mackenzie, 1997, Chen *et al.*, 2001 e Hsu *et al.*, 2005). Neste trabalho um fragmento de 1,7 kb, correspondente a região 3' terminal do vírus pôde ser perfeitamente amplificado por RT-PCR usando primers degenerados (Chen *et al.*, 2001), confirmando que o primer degenerado detecta uma região bem conservada dos potyvírus e demonstra a importância do uso deste tipo de primer na caracterização de novas espécies.

A seleção do método de detecção mais adequado para um patossistema é variável de acordo com a especificidade e sensibilidade do método. O anti-soro policlonal produzido contra a proteína da capa foi específico, não reagindo com proteínas normais da planta hospedeira. Assim, pode ser utilizado para detecção do isolado C17 a partir de amostras coletadas no campo. A técnica de detecção baseada em RT-PCR, usando primers específicos, demonstrou a sua alta sensibilidade e precisão, tanto para amostras de *N. benthamiana* como para mandioquinha-salsa oriunda do campo e de cultura de meristema. Comparando a técnica molecular baseada em RT-PCR e a sorologia (DAS-ELISA) pode-se

verificar a maior sensibilidade da RT-PCR, detectando duas amostras que foram consideradas negativas por DAS-ELISA (Tabela 2.6). Duas destas amostras também foram detectadas por inoculação mecânica em *N. benthamiana*, sendo que provavelmente não foram detectadas por DAS-ELISA, devido à baixa concentração viral. Dois problemas principais são frequentemente observados no uso de RT-PCR em detecção: (i) a qualidade do RNA extraído, podendo ocorrer inibição da reação de transcrição reversa ou amplificação; e (ii) a alta especificidade dos primers, não permitindo a detecção de variantes da mesma espécie. A partir da análise do resultado dos três métodos de detecção testados (inoculação mecânica, DAS-ELISA e RT-PCR) com as 35 amostras, verificou-se que não houveram problemas na extração do RNA de mandioquinha-salsa usado como molde em RT-PCR e que o par de primers selecionado permitiu a detecção do vírus em todas as amostras que foram positivas na detecção biológica e sorológica. Porém, na avaliação biológica, algum fator ambiental pode ter interferido na infecção, devido a baixa taxa de detecção por inoculação mecânica, já que Madeira (2004) obteve sucesso com este tipo de detecção. Conseqüentemente, as três técnicas podem ser usadas com alto grau de confiabilidade na detecção do isolado C17.

O material tradicionalmente cultivado de mandioquinha-salsa no Brasil foi originário de semente botânica, e muito provavelmente estaria livre de vírus. Porém, com a propagação vegetativa, certamente diversas infestações vêm ocorrendo e levando ao acúmulo de vírus na cultura e resultando na degenerescência da cultura, como ocorre em outras hortaliças de propagação vegetativa como alho (Fajardo, 1998) e batata-doce (Pozzer *et al.*, 1992). Muitos produtores reclamam do decréscimo da produção ao passar dos anos.

Uma das principais medidas para se recuperar a produtividade em campo é a utilização de mudas originárias de matrizes livres de vírus, o que também contribuiria para a redução da pressão de inóculo ao longo do tempo. Esta medida diminuiria a fonte de inóculo; o produtor passaria a ter maior incremento produtivo, provavelmente com aumento da produtividade o ganho compensaria o custo da produção; e haveria melhoria da qualidade das raízes comerciais. Com o uso de material oriundo de ápice caulinar, Madeira (2004) obteve uma produtividade 51 % mais alta que o material tradicionalmente utilizado. No entanto, esses materiais, oriundos de cultura de tecidos, não foram indexados. Porém, já é um indicativo de que o cultivo de ápices caulinares pode originar matrizes com uma

qualidade fisiológica e, possivelmente, sanitária melhor que plantas multiplicadas em campo.

O plantio de mudas de mandioquinha-salsa originárias de matrizes livres de vírus poderia ser uma medida primária a ser adotada no Brasil e, para isso, um programa de limpeza clonal deve ser estabelecido. Para obter essas plantas é necessário conhecer os vírus que infectam a cultura e estabelecer a metodologia de indexação. O método de detecção por RT-PCR seria extremamente útil para indexar estas plantas de mandioquinha-salsa obtidas por cultura de ápices caulinares. Neste caso, as plantas poderiam ser indexadas ainda no estágio *in vitro*, antes de serem levadas para aclimatização, já que é uma técnica que não necessita de grande quantidade de tecido foliar. A indexação é muito importante para confirmar a limpeza do material, porém o termo 'planta livre de vírus' deve ser utilizado de maneira limitada, caso não sejam utilizadas outras técnicas de amplo espectro, como os bioensaios de inoculação mecânica.

Este é o primeiro registro de identificação e caracterização de vírus infectando mandioquinha-salsa no Brasil. O isolado C17 tem características próprias, distintas de outros vírus, inclusive dos já relatados infectando mandioquinha-salsa. Esse isolado recebeu o nome tentativo de Arracacha mottle virus (AMoV) como uma nova espécie no gênero *Potyvirus*.

## CAPÍTULO 3: CLONAGEM DO GENOMA DE Arracacha mottle virus

### 3.1. Introdução

A mandioquinha-salsa é originária da região andina e atualmente sua produção concentra-se na América do Sul, sendo o Brasil o maior produtor. Alguns vírus já foram relatados infectando mandioquinha-salsa (Jones & Kenten, 1978; Lizárraga *et al.*, 1994; Kenten & Jones, 1979; Lizárraga, 2000; Hermann, 1997), mas no Brasil o primeiro vírus relatado é uma nova espécie de *Potyvirus*, o Arracacha mottle virus (AMoV) (Capítulo 2).

A família *Potyviridae* é a mais importante família de vírus de planta reconhecida, causando doenças em diversas culturas. Possui seis gêneros, divididos de acordo com vetor de transmissão, gama de hospedeiros e organização genômica (Fauquet *et al.*, 2005). São estes: *Ipomovirus*, tendo como espécie-tipo o *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV), apresentam um componente genômico e são transmitidos por mosca-branca; *Macluravirus*, a espécie-tipo é o *Maclura mosaic virus* (MacMV), é caracterizado por ser transmitido por afídeos e possuir apenas um componente genômico em partículas menores que 700 nm de comprimento; *Rymovirus*, cuja espécie-tipo é o *Ryegrass mosaic virus* (RGMV), caracteriza-se por apresentar um único componente genômico, todas as espécies estão restritas a infecção de plantas da família Poaceae e a sua transmissão é feita por ácaros do gênero *Abacarus*; *Tritimovirus*, cuja espécie-tipo é o *Wheat streak mosaic virus* (WSMV), também com um único componente genômico e todas as espécies restritas à família Poaceae, porém sua transmissão é feita por ácaros do gênero *Aceria*; *Bymovirus*, tem como espécie-tipo o *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV), caracteriza-se por duas moléculas de RNA e a sua transmissão é feita por fungos gramíneas (Fauquet *et al.*, 2005; Adams *et al.*, 2005a).

O gênero *Potyvirus* forma o maior e o mais importante gênero dentro da família, infectando uma ampla variedade de plantas, tanto monocotiledôneas como dicotiledôneas. Sua espécie-tipo é o *Potato virus Y* (PVY). Espécies deste gênero apresentam partículas filamentosas flexuosas com 680 a 900 nm de comprimento e 11 a 13 nm de diâmetro. O genoma é constituído de uma única molécula de RNA, linear, senso positivo, com

aproximadamente 9.700 nucleotídeos, possuindo uma única fase de leitura (*open reading frame*, ORF), que se traduz em uma poliproteína de 340-370 kDa. Na região 3' terminal tem uma cauda poliadenilada (poli(A)) e na 5' terminal uma VPg estrutural. A poliproteína é processada por três proteinases virais, NIa, P1 e HC-Pro, em 10 proteínas: a proteína N-terminal (P1), a proteinase componente auxiliar (HC-Pro), a proteína P3, a proteína inclusão citoplasmática (CI), duas proteínas de inclusão nuclear (NIa [VPg, Pro] e N1b), duas proteínas pequenas (6K1 e 6K2) e a proteína da capa (CP) (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001; Adams *et al.*, 2005b).

Atualmente, muitos potyvírus tem sua seqüência completa determinada, sendo isto importante na classificação da espécie viral, na elaboração de estratégias anti-virais de controle, para realizar estudo de variabilidade genética, para compreender a interação com o vetor, e para fornecer informações importantes sobre o relacionamento filogenético das espécie de vírus, sendo possível compreender melhor a sua evolução.

O Arracacha mottle virus é uma espécie do gênero *Potyvirus* com morfologia, propriedades biológicas, sorológicas e seqüência 3' terminal de 1676 nucleotídeos determinadas por meio do isolado C17, oriundo de plantas de mandiocinha-salsa com sintoma de virose em Brasília-DF, Brasil (Capítulo 2).

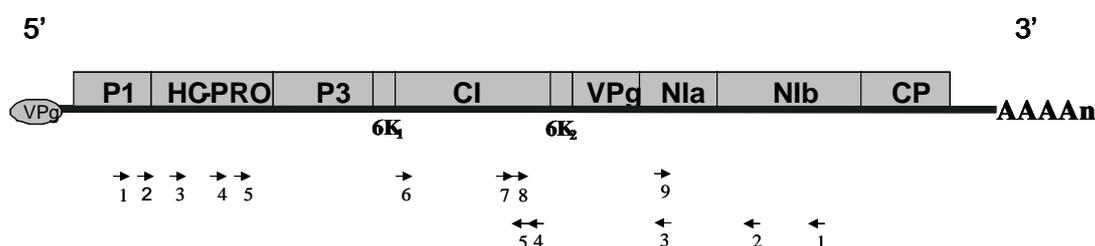
A seqüência completa deste potyvírus está sendo determinada, utilizando o isolado C17, para confirmar sua posição filogenética, deduzir sua evolução, obter informações que poderão colaborar com medidas de controle e comparar sua estrutura genômica com outros potyvírus conhecidos.

Sendo assim, este trabalho tem como objetivo clonar e sequenciar o genoma completo de Arracacha mottle virus.

## 3.2 Material e métodos

### 3.2.1. Desenho dos primers

A partir da seqüência 3' terminal do genoma do Arracacha mottle virus (capítulo 2) um primer reverso específico foi desenhado na extremidade 5' desta seqüência (Figura 3.1). Paralelamente, primers degenerados foram desenhados (Figura 3.1) a partir do alinhamento múltiplo das seqüências de genoma completo dos vírus mais próximos em etapas, de acordo com a determinação da seqüência das várias regiões genômicas. O programa Oligo Analyzer 3.0 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) foi utilizado para desenhar os primers.



**Figura 3.1:** Esquema do genoma de potyvirus, mostrando a localização dos primers desenhados para a clonagem do genoma completo do Arracacha mottle virus. As setas correspondem a posição dos primers e os números o nome dos primers. Primers reversos (←) 1: C17-8100R, 2: C17-7385R, 3: C17-6560R, 4: C17-4940R, 5: AmoV-14F6000R. Primers senso (→) 1: C17-948F, 2: AmoV-1000F, 3: C17-1206F, 4: AmoV-1800F, 5: AmoV-2300F, 6: AmoV-3900F, 7: C17-4026F, 8: C17-4930F, 9: C17-6550F.

### 3.2.2. Extração do RNA viral

A extração do RNA viral foi feita a partir de partículas virais semi-purificadas. Folhas infectadas de *N. benthamiana* (10 g), foram colhidas 20 dias após a inoculação. O material foi triturado em liquidificador 1:3 (p/v) em tampão borato gelado (0,2 M Borato,

pH 8,4, 10 mM EDTA, 0,15 % 2 mercaptoetanol). O extrato foi coado em gaze pré-tratada em água fervente e centrifugado a 29.000 g, por 10 min. Coletou-se o sobrenadante e acrescentou-se Triton X-100 a 20 %, gota a gota, na proporção de 9:1 (v/v), e a mistura foi mantida sob agitação lenta por 90 min. Adicionou-se 6 % (p/v) de polietilenoglicol 6000 e 0,5 % (p/v) de NaCl. A solução foi submetida à agitação lenta por mais 90 min. Após, centrifugou-se a 29.000 g, por 15 min. O sedimento foi ressuscitado em tampão borato a 50 mM, pH 8,3, acrescido de uréia a 0,5 M, 6 mM EDTA e 0,1 % de 2 mercaptoetanol, em volume equivalente a 20 % do volume centrifugado. A solução foi centrifugada a 13.000 g, por 10 min. O sobrenadante foi centrifugado, a 260.000 g, por 60 min e o sedimento foi ressuscitado em tampão borato 50 mM, pH 8,3. Assim obteve-se as partículas virais semi-purificadas.

Após esta purificação, o RNA viral foi isolado utilizando o reagente Trizol (Invitrogen). Adicionou-se 500 µL de Trizol em 50 µL do RNA purificado e submeteu a agitação em vortex por 1 min, seguido de incubação por 5 min a temperatura ambiente. Logo, adicionou-se 100 µL de clorofórmio, submeteu-se a agitação em vortex por 2 min e centrifugou-se a 13.523 g, a 4 °C, por 15 min. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo, adicionado de 420 µL de isopropanol e incubado a - 20 °C, durante toda à noite, para precipitação do RNA viral. Após este período, foi centrifugado a 13.523 g, a 4 °C, por 10 min. O sedimento foi lavado com 600 µL de etanol 70 % gelado. Após sua secagem, foi ressuscitado em 20 µL de água tratada com 0,1 % dietil pirocarbonato de sódio (DEPC) e autoclavada.

### **3.2.3. Síntese da primeira fita do cDNA**

A partir do RNA viral, foi sintetizado um DNA complementar (cDNA) ao RNA genômico por transcrição reversa (RT), utilizando os primers reversos desenhados (Tabela 3.1), e a transcriptase reversa *SuperScript III* (Invitrogen). Uma reação com 2 µL do RNA viral, adicionado em 1 µL de 10 µM do primer reverso, 4 µL de dNTPs 2,5 mM e 6 µL de água, foi submetida a incubação por 65 °C, por 5 min, e resfriado por 1 min. Após, foram adicionados 4 µL do tampão 5 X da enzima *SuperScript III*, 1 µL de DTT 0,1 M, 1 µL

RNAse OUT (40 U/ $\mu$ L, invitrogen) e 1  $\mu$ L da enzima *SuperScript III* (200 U/ $\mu$ L). A reação foi incubada a 55 °C, por 30 a 60 min. Para inativar a enzima, essa foi submetida a 70 °C por 15 min. Posteriormente, o cDNA foi tratado com RNAse H (2 U/ $\mu$ L, Invitrogen) durante 20 min a 37 °C, para permitir a remoção de moléculas de RNA ligadas ao cDNA.

### **3.2.4. Amplificação via PCR e confirmação por eletroforese em gel de agarose**

A amplificação do cDNA foi feita por PCR juntamente com a enzima *Taq* DNA polimerase *High Fidelity* (Invitrogen). Essa enzima possui *Hot Start* automático e tem atividade de auto-correção (*proof reading*).

Para as reações de PCR foram utilizados 5  $\mu$ L do cDNA (item 3.2.3) para reação total de 100  $\mu$ L. Sendo, 10  $\mu$ L de tampão *Taq* DNA polimerase *High Fidelity* 10 X (para concentração final de 1 X), 8  $\mu$ L de dNTPs 2,5 mM (GE), 4  $\mu$ L de MgSO<sub>4</sub> 50 mM, 2  $\mu$ L de 10  $\mu$ M do primer senso, 2  $\mu$ L de 10  $\mu$ M do primer reverso, 0,5  $\mu$ L da enzima *Taq* DNA polimerase *High Fidelity* (5 U/ $\mu$ L, invitrogen), completando com água autoclavada para um volume final de 100  $\mu$ L. As amostras foram submetidas a amplificação no termociclador (MasterCycler, Eppendorf). Inicialmente as amostras foram aquecidas a 94 °C por 30 s, sendo posteriormente submetidas a 30 ciclos de 94 °C por 30 s para desnaturação, 1 min a 48 °C para anelamento dos primers e para extensão foi 1 min para cada 1 kb esperado de amplificação a 68 °C. Para o término da extensão, após os 30 ciclos, a temperatura foi mantida a 68 °C por 7 min, sendo finalmente armazenadas a 4 °C .

Os resultados da amplificação foram visualizados em gel de agarose a 1 %, preparado em tampão 1 X TAE ( Tris-base 0,04 M + 57,1 mL de ácido acético glacial + EDTA 0,001 M, pH 8,0), onde 5  $\mu$ L de cada amostra foram misturados em 2  $\mu$ L de tampão corante (0,25 % de azul de bromofenol + 30 % de glicerol) e aplicados no gel. A eletroforese foi realizada a 90 V. Como marcador foi utilizado o 1 *Kb Plus* DNA *Ladder* (Invitrogen). Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5  $\mu$ g/mL) e visualizado sobre luz ultravioleta utilizando o aparato (Eagle EYE<sup>TM</sup> - II, Stratagene®).

### 3.2.5. Preparo de células competentes para eletroporação

Foram transferidas células de *Escherichia coli* cepa 'XL1-Blue' resistentes a tetraciclina, mantidas em estoque congelado em glicerol, diretamente sobre meio LB (Sambrook *et al.*, 1989), adicionado de 15 µg/mL de tetraciclina, e foram incubadas a 37 °C, por 16 h. Uma colônia bem isolada foi transferida para 25 mL de meio LB líquido, e deixada crescer a 37 °C, por 16 h, sob agitação constante (220 rpm). Após este período, 10 mL (1/100) do meio da cultura foram transferidos para outro frasco contendo 1 L de meio LB líquido, deixados crescer a 37 °C sob vigorosa agitação, até atingir OD 0,6 (cerca de 3 h). Após atingir a leitura, as células foram resfriadas completamente e centrifugadas a 4 °C, a 3.600 g por 15 min. Descartou-se o sobrenadante completamente e o sedimento foi ressuscitado com 100 mL de glicerol 10 % gelado, sobre o gelo com delicadeza. O volume foi completado para 1 L com glicerol 10 % gelado e centrifugado a 4 °C, a 3.600 g por 15 min. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento foi ressuscitado gentilmente com 50 mL de glicerol 10 % gelado, sobre o gelo. O volume foi completado para 500 mL com glicerol 10 % gelado e centrifugado a 4 °C, a 3.600 g por 15 min. O sedimento foi ressuscitado gentilmente com 30 mL de glicerol 10 % gelado sobre o gelo. O volume foi completado para 250 mL com glicerol 10 % gelado e centrifugado a 3.600 g por 15 min. Por fim, o sedimento foi ressuscitado com 3,5 mL de glicerol 10 % gelado, sobre o gelo. Alíquotas de 100 µL foram distribuídas em tubos de microcentrifuga (1,5 mL) gelados, colocados posteriormente em nitrogênio líquido e em seguida estocados a - 80 °C.

### 3.2.6. Clonagem

Após a confirmação da amplificação do fragmento esperado, o produto de PCR foi precipitado, ressuscitado em 10 µL de água e submetido à eletroforese em gel de agarose 1 %, preparado em tampão 1 X TAE. Após a corrida o gel foi corado com violeta cristal. Em 100 mL de água autoclavada foi adicionado 2 mL de violeta cristal (2 mg/mL), no qual foi colocado o gel e submetido a uma agitação constante durante 30 min. A utilização desse

tipo de corante permite a visualização direta dos fragmentos de DNA sem o uso de radiação ultra-violeta, que poderia causar seu rompimento.

A banda esperada formada pela amplificação do cDNA viral por PCR foi excisada do gel com auxílio de uma lâmina descartável e purificada através da utilização do Kit 'Pure Link™ Quick Gel Extractin Kit' (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante (item 2.2.14).

Durante a atividade de autocorreção (*proof reading*), a enzima *Taq* polymerase *High Fidelity* retira as deoxiadenosinas da extremidade 3' dos produtos de PCR. Em virtude disso, foi necessário, antes de se realizar a ligação do cDNA ao vetor, fazer a adenilação (*A-overhanging*), que consiste em acrescentar deoxiadenosina na extremidade 3' do DNA. Portanto o DNA eluído foi secado no Speed Vac (DNA Plus) até obter 8,68 µL, no qual foi adicionado 1 µL tampão *Taq* DNA polimerase 10 X, 0,12 µL dNTPs 2,5 mM, 0,1 µL dATP 2 mM e 0,1 µL *Taq* DNA polymerase (5 U/µL, invitrogen). Essa reação foi submetida a 72 °C durante 10 min.

Após a adenilação do cDNA, este foi ligado ao vetor pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen), mantendo-se a proporção molar de 1:3 (vetor:inserto). Essa ligação utilizou os reagentes fornecidos pelo kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen). A vantagem do uso desse tipo de vetor é permitir a clonagem direta de fragmentos de PCR, sendo necessário apenas a presença de uma dioxiadenosina na extremidade 3' do cDNA e uma dioxitimina nas extremidades coesivas 3' do vetor, o que proporcionará a ligação e a clonagem direcional.

Seguido da ligação, foi realizado a dessalinização da reação, para retirar todo o excesso de sal desta solução. Em uma placa de Petri colocou-se água autoclavada e sobre a água um pequeno pedaço de membrana de nitrocelulose (Millipore), a amostra foi colocada sobre a membrana e deixada por 15 min.

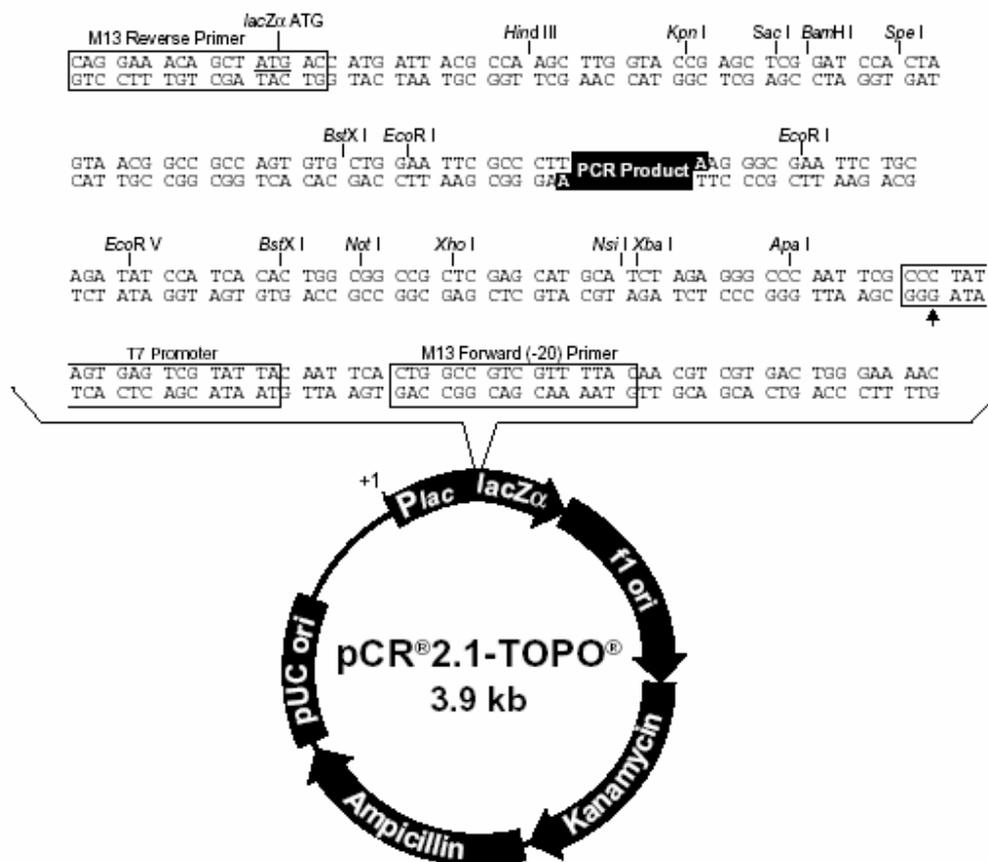
Para a realização da transformação foram utilizadas células de *E. coli* XL1 Blue competentes para eletroporação. A ligação (2 µL) foi adicionada em 100µL de células competentes que foram transferidas para uma cubeta de eletroporação (BioAgency), a transformação foi feita no eletroporador Micro Pulser™ (BIO RAD). Logo em seguida a amostra foi transferida da cubeta para um microtubo e adicionada a 500 mL de meio SOB (Sambrook *et al.*, 1989). Esta foi incubada por 1 h em agitação constante (220 rpm) e

posteriormente as células transformadas foram plaqueadas em placa de Petri contendo LB sólido e o antibiótico ampicilina (50 µg/mL).

### **3.2.7. Seleção dos clones recombinantes**

Colônias com coloração branca foram selecionadas e crescidas em meio de cultura LB líquido na presença de ampicilina (50 µg/mL). Procedimento igual ao item 2.2.15.

Para a verificação da presença do inserto, os plasmídeos foram digeridos com a enzima EcoRI, pois o vetor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (Figura 3.2) apresenta este sítio de restrição em ambas as extremidades das regiões de ligação do inserto. O padrão de digestão dos clones foi analisado em gel de agarose 1 %, corado com brometo de etídeo, utilizando-se o marcador molecular 1 *Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen) como padrão de comparação. Dentre os clones que apresentaram o padrão esperado alguns foram selecionados e sequenciados.



Comments for pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>  
3931 nucleotides

**Figura 3.2:** Esquema vetor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) utilizado para realizar a clonagem do genoma de Arracacha mottle virus.

### 3.2.8. Sequenciamento e análise das seqüências

Para se obter as seqüências nucleotídicas dos fragmentos clonados e de todo o genoma viral, foram utilizados os primers do vetor e primers específicos que foram desenhados a partir da seqüência viral obtida.

As seqüências foram analisadas através do programa Staden Package (Staden *et al.*, 2003) e posteriormente seqüências similares foram buscadas com o auxílio do BLAST (Altschul *et al.*, 1997) em bancos de dados públicos. O programa Clustal W também foi

utilizado para realizar o alinhamento múltiplo entre as seqüências completas de potyvírus depositadas no GenBank juntamente com as obtidas nesse estudo.

### 3.3. Resultados

Para a clonagem do genoma do isolado C17 de Arracacha mottle virus foi utilizada a estratégia de PCR com enzima com atividade *proof reading* e primers degenerados obtidos através de alinhamento dos potyvírus mais semelhantes.

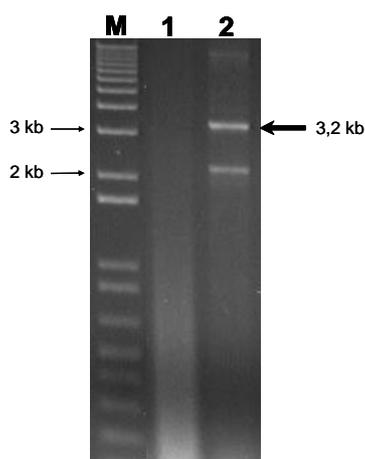
O primer reverso (C17-8100R) foi desenhado a partir da seqüência parcial obtida preliminarmente (Capítulo 2) na posição 154-137 da seqüência depositada no banco de dados GenBank (acesso DQ925486). Um alinhamento múltiplo foi realizado utilizando o programa CLUSTAL W com seqüências do genoma completo dos potyvírus mais próximos (*Watermelon mosaic virus*, *Zucchini yellow mosaic virus*, *Sweet potato feathery mottle virus*, *Leek yellow stripe virus*, *Onion yellow dwarf virus*, *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, *Potato virus Y*, *Soybean mosaic virus*). As regiões mais conservadas foram selecionadas e 5 primers senso e 3 reversos degenerados foram desenhados (Tabela 3.1, Figura 3.1) para a clonagem de todo o genoma e posterior sequenciamento.

**Tabela 3.1:** Primers desenhados a partir da seqüência 3' terminal do isolado C17 para clonagem do genoma de Arracacha mottle virus.

Primer	Seqüência	Senso/Reverso
C17-948F	5' MDG GNB VDA GTG G 3'	Senso
C17-1206F	5' AVT GTG GNR NRB TDG CAG C 3'	Senso
C17-4026F	5' ACD YTB MRN ATG MGA GG 3'	Senso
C17-4930F	5' AYG ATG GND SNA TGC A 3'	Senso
C17-4940R	5' TGC ATN SHN CCA TCR T 3'	Reverso
C17-6550F	5' TGC CAA ARG AYH WHM C 3'	Senso
C17-6560R	5' GGA WDR TCY TTD GGC A 3'	Reverso
C17-7385R	5' CCR AYH GCD GCT TTC 3'	Reverso
C17-8100R	5' GTG TTC GTG ACT AGG CTC 3'	Reverso

Quatro combinações de primers foram avaliadas utilizando o cDNA sintetizado com o primer C17-6560R e cinco combinações utilizando o cDNA sintetizado com o primer M4T (Chen *et al.*, 2001), porém nenhuma amplificação foi observada. Utilizando o cDNA obtido com o primer específico C17-8100R, cinco combinações de primers foram testadas. Apenas uma combinação resultou em amplificação de DNA de tamanho desejado, a combinação C17-8100R/C17-4930F. O fragmento esperado e obtido com a combinação

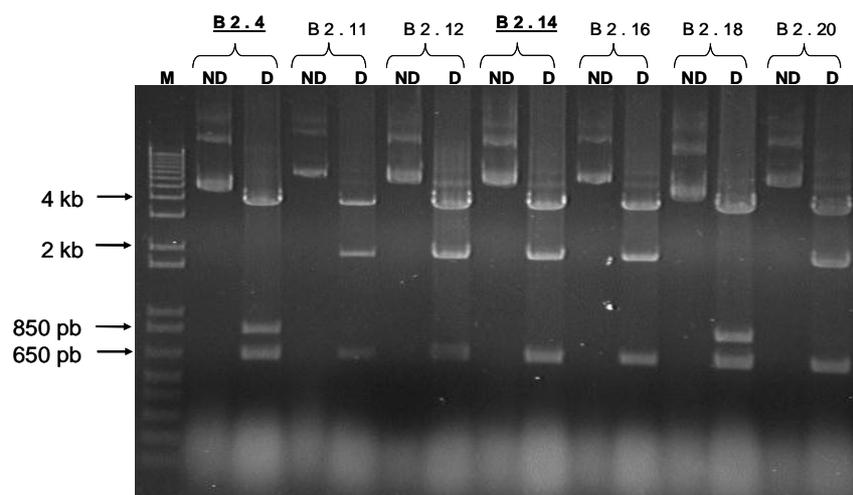
destes primers foi de aproximadamente 3,2 kb (Figura 3.3, seta). O DNA amplificado foi isolado e clonado no vetor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>. Digestão com a enzima de restrição EcoRI foi realizada para a verificação da clonagem (Figura 3.4). Sete clones foram selecionados (B1.2, B1.8, B1.11, B2.4, B2.14, B3.13, B3.16), porém todos apresentavam padrões distintos na liberação do inserto. Cada inserto foi seqüenciado utilizando primers do vetor, M13 forward e M13 reverse. A seqüência resultante foi comparada com seqüências disponíveis em bancos de dados através de BLASTn/BLASTx. Os clones B1.2 e B3.16 não foram específicos. Os demais cinco clones apresentaram seqüência específica, mas baixa identidade com seqüências de vírus presentes no banco de dados. Todos estes clones apresentaram seqüências idênticas na extremidade 3' com 100 % de identidade na sobreposição, correspondente à região 5' da seqüência do Arracacha mottle virus disponível. A seqüência do clone B2.14 confirmou que o inserto correspondia às regiões de aproximadamente 4.900 a 8.100 nucleotídeos no genoma do potyvírus; a dos clones B1.8, B2.4 e B3.13 correspondiam às regiões de aproximadamente 6.300 a 8.100 nucleotídeos; e a do clone B1.11 correspondia às regiões de aproximadamente 7.000 a 8.100 nucleotídeos (Figura 3.5). Novos primers internos foram desenhados (AmoV-14F570F, AmoV-4F530F, AmoV-4R510F e AmoV-4R160R, Tabela 3.2) e utilizados para sequenciamento por “primer walking”.



**Figura 3.3:** Análise em gel de agarose a 1 % do produto da PCR com os primers C17-8100R e C17-4930F, mostrando o produto amplificado de tamanho esperado de 3,2 kb (seta). M = marcador 1 *Kb Plus* DNA *Ladder*, 1= controle negativo, 2 = isolado C17.

**Tabela 3.2:** Primers internos desenhados para sequenciamento por “primer walking”.

Primer	Seqüência	Senso/Reverso
AmoV-14F570F	5' TTT GCG AGA CTC AGT G 3'	Senso
AmoV-4F530F	5' AAT TGG GGC TGC TGT G 3'	Senso
AmoV-4R510F	5' GAT GCC TAA GGA CTT TCC 3'	Senso
AmoV-4R160R	5' GAG AGC TTT TCG AGT GTT CCC3'	Reverso



**Figura 3.4:** Análise em gel de agarose 1 % com DNA plasmidial não-digerido (ND) e digerido (D) com a enzima EcoRI do produto de amplificação com os primers C17-8100R / C17-4930F. M = marcador 1 Kb Plus DNA Ladder. Os clones B2.4 e B2.14 (sublinhados) foram selecionados.

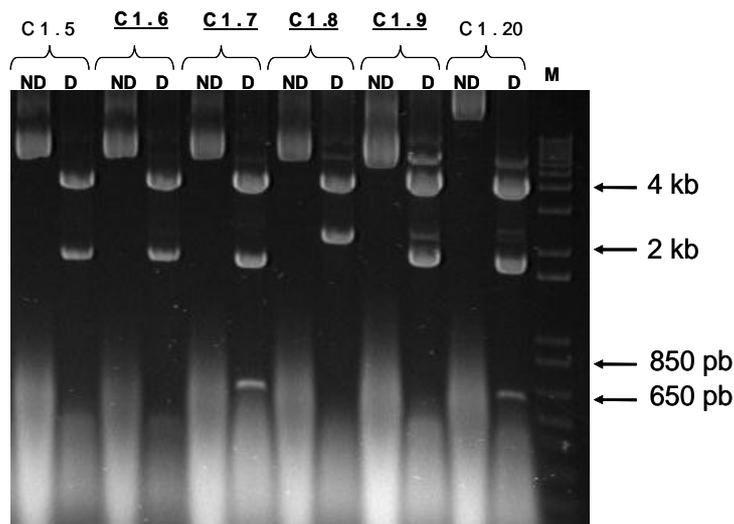
Um novo primer reverso (AmoV-14F6000R, Tabela 3.3) foi desenhado na região 5' da seqüência do clone B2.14, obtida com o primer M13 forward do vetor. Para o desenho de novos primers-senso degenerados, um novo alinhamento múltiplo foi realizado com seqüências do genoma completo dos potyvírus mais próximos ao clone B2.14 (*Papaya ringspot virus*, *Turnip mosaic virus*, *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, *Zucchini yellow mosaic virus*, *Leek yellow stripe virus*, *Pepper mottle virus*, *Potato virus V*, *Potato virus Y*, *Sweet potato feathery mottle virus* e *Onion yellow dwarf virus*). Um total de 4 primers-senso foram desenhados (Tabela 3.3, Figura 3.1) nas regiões mais conservadas na tentativa de clonar o restante do genoma.

**Tabela 3.3:** Primers desenhados para clonar o restante do genoma de Arracacha mottle virus.

Primer	Seqüência	Senso/Reverso
AmoV-14F6000R	5' GAT GCT GTG TAT GGG A 3'	Reverso
AmoV-1000F	5' VRG GNK VKA GTG G 3'	Senso
AmoV-1800F	5' TGS HAR YTT HNT NTG GGG 3'	Senso
AmoV-2300F	5' TTG GNV MNT GGC C 3'	Senso
AmoV-3900F	5' TTT DVN NVN TGG TGG 3'	Senso

Todas as combinações possíveis de primers foram testadas, utilizando cDNA obtido com primer específico AmoV-14F6000R. Apenas a combinação de primer AmoV-14F6000R/AmoV-1000F resultou em amplificação do tamanho do fragmento esperado, que foi de aproximadamente 4 kb.

PCR com o par de primers AmoV-14F6000R e AmoV-1000F resultou na amplificação em teste preliminar de DNA de tamanho esperado (4 kb), porém, após uma nova amplificação foi possível observar somente DNA de aproximadamente 2,2 kb. Como o RNA utilizado é oriundo de partículas purificadas e o cDNA obtido com primer específico, este DNA foi clonado e analisado. A digestão com EcoRI demonstrou quatro liberações distintas do inserto e confirmou que o fragmento havia sido clonado (Figura 3.6). Quatro clones foram selecionados (C1.6, C1.7, C1.8, C1.9) e sequenciados utilizando primers do vetor, M13 forward e M13 reverse.

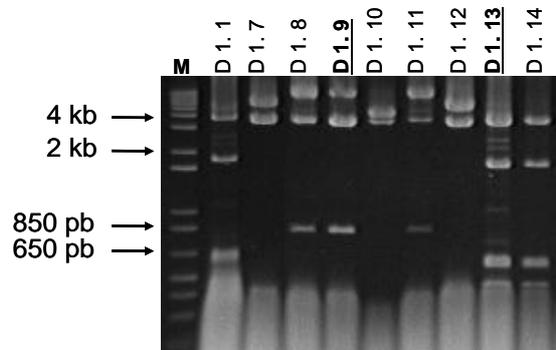


**Figura 3.6:** Análise em gel de agarose 1 % com DNA plasmidial não-digerido (ND) e digerido (D) com a enzima EcoRI do produto de amplificação com os primers AmoV-6000R / AmoV1000F. M = marcador 1 Kb Plus DNA Ladder. Os clones C1.6, C1.7, C1.8 e C1.9 (sublinhados) foram selecionados.

A seqüência obtida do clone C1.7 não foi específica e portanto não utilizada. A seqüência dos outros três clones foi específica e com baixa identidade com outros *Potyvirus*. As seqüências dos três clones obtidas com o primer M13 reverse do vetor, correspondeu à seqüência da região 5' do inserto no clone B2.14, sendo que apenas um nucleotídeo do clone C1.6 foi divergente nesta sobreposição. A seqüência destes três clones confirmou a clonagem da região de aproximadamente 2.700 a 4.900 nucleotídeos no genoma do potyvírus (Figura 3.5).

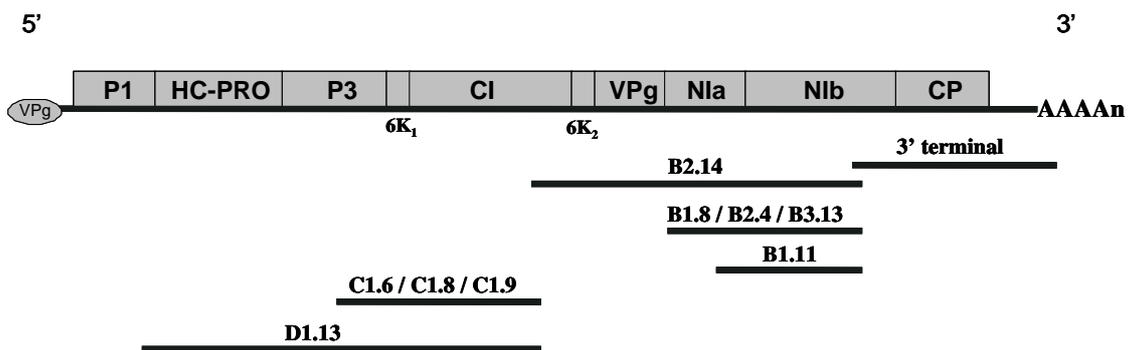
A seqüência da extremidade 5' do fragmento C (2.700 a 4900 nucleotídeos), obtida com os clones C1.6, C1.8 e C1.9, mostrou identidade mais alta, porém muita baixa, de 22 % com *Potato virus V* (NC\_004010).

Outras combinações de primers foram testadas utilizando o cDNA obtido com primer específico AmoV-14F6000R (Tabela 3.3) e o primer reverso degenerado C17-4940R (Tabela 3.1). Apenas a combinação C17-4940R / AmoV-1000F amplificou o fragmento de tamanho esperado (4 kb), que foi eluído e clonado. A análise dos clones demonstrou que o DNA de tamanho esperado havia sido corretamente clonado (Figura 3.7). Dois clones foram selecionados (D1.9, D1.13) e seqüenciados utilizando primers do vetor, M13 forward e M13 reverse.



**Figura 3.7:** Análise em gel de agarose 1 % com DNA plasmidial digerido com a enzima EcoRI do produto de amplificação com os primers C17-4940R / AmoV-1000F. M = marcador 1 Kb Plus DNA Ladder. Os clones D1.9 e D1.13 (sublinhados) foram selecionados.

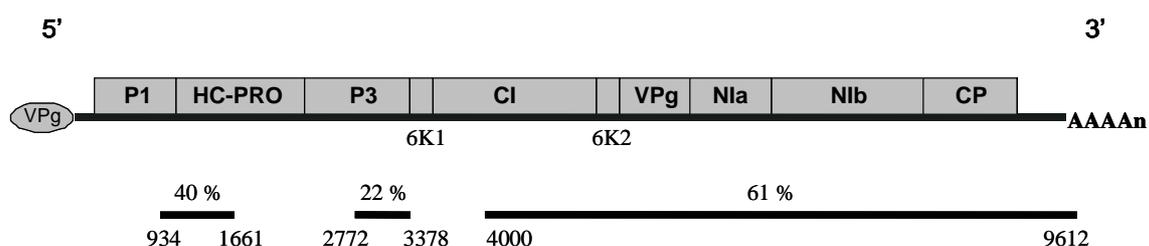
A seqüência da extremidade 3' do fragmento D (C17-4940R / AmoV-1000F), obtida com os clones D1.9 e D1.13, apresentou alta identidade com parte da seqüência dos clones C1.6, C1.8 e C1.9, e apresentou sobreposição de 100 % de identidade com o clone B2.14. A seqüência do clone D1.13 confirmou que o inserto correspondia às regiões de aproximadamente 1.000 a 4.900 nucleotídeos no genoma do potyvírus (Figura 3.7). A seqüência da extremidade 5' deste fragmento mostrou identidade mais alta de 40 % com *Pepper severe mosaic virus* (NC\_008393). Não foi obtida a seqüência da extremidade 5' do clone D1.9, por isso não foi possível confirmar o tamanho do inserto clonado.



**Figura 3.5:** Esquema do genoma de *Potyvirus* mostrando a posição dos clones obtidos.

A partir de *primer walking*, novas seqüências foram obtidas e a seqüência do genoma foi gradativamente determinada. A seqüência de um fragmento de aproximadamente 5.500 nucleotídeos já foi obtida (Figura 3.8) e mostrou identidade mais alta de 61 % com *Peru tomato mosaic virus* (NC\_004573) e *Pepper severe mosaic virus* (NC\_008393).

A seqüência completa do gene da proteína Nib e VPg-NIa foi determinada e os prováveis sítios de clivagem localizados (VGFQ/S e VTHQ/G, respectivamente), baseados na descrição dos sítios de clivagens mais freqüentes nos potyvírus (Adams *et al*, 2005b). A seqüência nucleotídica do gene da Nib apresentou maior identidade (67 %) com *Peru tomato mosaic virus* (NC\_004573) e o da VPg-NIa de 59 % com *Wild potato mosaic virus* (Tabela 3.4).



**Figura 3.8:** Esquema do genoma de *Potyvirus* mostrando a região com seqüência nucleotídica determinada do genoma do Arracacha mottle virus. Abaixo de cada fragmento tem-se a posição do genoma em nucleotídeo de *Peru tomato mosaic virus* (NC\_004573) e acima se tem à porcentagem de identidade com o vírus mais próximo relacionado.

**Tabela 3.4:** Comparação da seqüência do gene Nib e VPg-NIa de Arracacha mottle virus com os potyvírus mais próximos.

Vírus	Nib	VPg-NIa
PTV	67	53
PepSMV	66	55
PVY	66	54
PVV	66	57
WPMV	66	59
PepMoV	65	56
TuMV	62	51

PTV = *Peru tomato mosaic virus* (NC\_004573); PepSMV = *Pepper severe mosaic virus* (NC\_008393); PVY = *Potato virus Y* (NC\_001616); PVV = *Potato virus V* (NC\_004010); WPMV = *Wild potato mosaic virus* (NC\_004426); PepMoV = *Pepper mottle virus* (NC\_001517); TuMV = *Turnip mosaic virus* (NC\_002509).

### 3.4. Discussão

Recentemente a seqüência completa do genoma de vários potyvírus foi disponibilizada, como por exemplo: *Pepper vein banding virus* por Anindya *et al.* (2004); *Konjak mosaic virus* por Nishiguchi *et al.* (2006); *Pepper severe mosaic virus* por Ahn *et al.* (2006); *Papaya ringspot virus* por Parameswari *et al.* (2007); *Beet mosaic virus* por Nemchinov *et al.* (2004); e *Daphne mosaic virus* por Petrzik & Fránová (2006). Estas seqüências contribuíram de forma importante para a realização de estudo de variabilidade genética, fornecer informações relevantes sobre o relacionamento filogenético das espécies de vírus, bem como entre estirpes, e a possibilidade de compreender melhor a mutação, recombinação e evolução destes potyvírus.

O Arracacha mottle virus foi classificado como uma nova espécie no gênero *Potyvirus* com base na seqüência da sua região genômica 3' terminal. Como esta foi bastante distinta dos demais potyvírus, a determinação da seqüência do genoma completo tornou-se importante para complementar a sua caracterização. Para isso, a estratégia de clonagem de produto de amplificação por PCR com enzima com atividade *proof reading* foi escolhida.

Esta estratégia comprovou ser eficiente para fragmentos de até 4.000 bases. Em vista deste vírus ser notavelmente distinto, 75 % dos primers degenerados não foram úteis na amplificação do cDNA específico por PCR. Isso demonstra que as regiões conservadas selecionadas não são igualmente conservadas no genoma do isolado C17. Devido a isso, foi de suma importância obter o RNA viral a partir de partículas purificadas e sintetizar o cDNA utilizando primers específicos. Este procedimento certamente diminuiu as chances de amplificação de produtos não específicos. O genoma foi praticamente todo clonado (90 %), restando apenas a extremidade 5' terminal, que ainda será clonada utilizando a estratégia do resgate da região 5' com o sistema 5' RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*). Um primer reverso específico já foi desenhado, de acordo com a seqüência do clone D1.13, que irá permitir a amplificação do fragmento (cerca de 1 kb) e clonagem. O genoma já está 70 % seqüenciado e novos primers para a realização do *primer walking* também já foram desenhados e a seqüência completa será determinada e analisada para determinar a posição filogenética do Arracacha mottle virus, e permitir comparações detalhadas de todo o

genoma. Esse é o primeiro vírus relatado infectando mandioquinha-salsa no Brasil e será o primeiro vírus que infecta apiáceas a ter a seqüência completa determinada.

A comparação da seqüência de 5.500 nucleotídeos do genoma do Arracacha mottle virus com os vírus mais próximos revela uma identidade mais alta de 61 % com *Peru tomato mosaic virus* e *Pepper severe mosaic virus*. De acordo com Adams *et al.* (2005a), essa porcentagem indica que o Arracacha mottle virus agrupa-se no Cluster C, juntamente com os isolados de PVY, PTV, WPMV, TuMV e outros. Porém, somente após a determinação da seqüência completa isto poderá ser realmente confirmado.

Adams *et al.* (2005a) relatam que o gene da inclusão cilíndrica (CI) é a melhor região para identificação e estudos taxonômicos, quando somente uma porção do genoma for seqüenciada. Além disso, foi demonstrado que a seqüência dos genes da NIB, NIa e HC-Pro são mais representativos do genoma do que a da CP. Porém a maioria das seqüências de potyvírus disponíveis é da CP. Segundo Shukla & Ward (1988), três seriam as principais razões para se utilizar critérios baseados na seqüência da capa protéica: (i) das proteínas virais, exceto a capa protéica, todas tem certa homologia com proteínas de outros grupos de vírus de plantas e vírus animal; (ii) a capa protéica corresponde a aproximadamente 95 % do peso da partícula viral; e (iii) a sorologia reflete a estrutura da proteína da capa. Outra razão para utilizar a seqüência da CP, é que seria muito difícil encontrar um primer tão universal, como o Sprimer e oligo-dT, para o gene CI, que não é altamente conservado entre os potyvírus como o gene da CP. Portanto, seria muito difícil clonar este gene usando primers degenerados.

A comparação da seqüência nucleotídica da NIB revelou uma identidade mais alta com PTV, correspondendo ao observado para seqüência parcial do genoma. A da VPg-NIa apresentou identidade mais alta com WPMV. Já a comparação da seqüência nucleotídica e de aminoácido da CP (Capítulo 2) revelou uma identidade mais alta com ArjMV e NLSYV, respectivamente. Apesar da NIB e VPg-NIa revelarem identidade mais alta com espécies distintas, os isolados de ambas as espécies estão no Cluster C (Adams *et al.*, 2005a), o que indica a proximidade do Arracacha mottle virus aos vírus deste cluster. Os dois vírus que apresentaram identidade mais alta com a seqüência da CP não possuem genoma completo

seqüenciado, não sendo possível afirmar se os resultados obtidos condizem com a análise da seqüência parcial do genoma.

Observa-se com este trabalho, que o Arracacha mottle virus é um potyvírus distinto, porém, provavelmente compartilha de um ancestral comum a PTV, WPMV, PVV e PepSMV. De acordo com os possíveis sítios de clivagem já determinados, este vírus apresenta estratégia genômica idêntica aos potyvírus (Adams *et al.*, 2005b). Um estudo pormenorizado deverá ser realizado com a seqüência completa do AMoV. Os genes deverão ser individualmente comparados com os potyvírus mais próximos que apresentam seqüência completa disponível e será realizado uma análise filogenética completa. Será também interessante responder a questão de qual seria a origem deste vírus que apresenta um círculo de hospedeiros restrito e que provavelmente co-evoluiu com a mandioquinha-salsa durante os últimos anos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mandioquinha-salsa é uma hortaliça essencialmente energética, tendo grande importância social e econômica nas regiões centro-sul do Brasil, principalmente em sistemas de agricultura familiar. Produtores reclamam que houve um decréscimo evidente da produtividade nos últimos anos. Este decréscimo da produtividade pode estar relacionado com a incidência e acúmulo de vírus, já que é uma planta essencialmente propagada vegetativamente. No Brasil, não há registro de estudos referentes a vírus em mandioquinha-salsa. Este trabalho é o pioneiro na identificação e caracterização de um vírus isolado de mandioquinha-salsa no Brasil. Os resultados obtidos confirmaram que este isolado de mandioquinha-salsa (isolado C17) pertence a uma nova espécie de vírus do gênero *Potyvirus* e o nome Arracacha mottle virus (AMoV) foi proposto.

Duas técnicas de detecção de AMoV foram desenvolvidas, a primeira baseada em sorologia e a segunda em RT-PCR. Ambos os métodos são específicos e eficientes, porém a seleção do método mais adequado em cada caso deve ser feita de acordo com o nível de sensibilidade necessário para a detecção. O anti-soro produzido mostrou ser de alta especificidade, não reagindo com plantas sadias. Amostras de campo foram avaliadas por Elisa, revelando que 93 % das amostras estavam infectadas. Isso comprova a aplicabilidade do anti-soro em testes de detecção de amostras do campo. O RT-PCR utilizando primers específicos para o C17 foi bem específico e sensível, detectando vírus em baixa concentração na planta. Esta técnica será essencial em programas de limpeza clonal, uma das prioridades no cultivo de mandioquinha-salsa brasileira. A disponibilização destas ferramentas de detecção permitirá a avaliação da distribuição e importância do AMoV no Brasil e a realização de monitoramento dos prejuízos ocasionados a esta cultura. É possível que em mandioquinha-salsa esteja ocorrendo o mesmo fenômeno de degenerescência observado em outras hortaliças propagadas vegetativamente, como alho e batata-doce.

O Arracacha mottle virus é um vírus com círculo de hospedeiros muito restrito e com características bem distintas dos demais potyvírus. Noventa por cento do seu genoma foi clonado e a sequência completa ainda será determinada. Posteriormente, a extremidade 5' genômica será clonada pela técnica do 5' RACE. Após a obtenção da sequência

completa, os genes serão individualmente comparados com os potyvírus mais próximos e será realizada uma análise filogenética completa.

A implementação de tecnologia de produção de mudas de mandioquinha-salsa livre de vírus certamente contribuirá para um efetivo incremento produtivo de mandioquinha-salsa. Isso colaborará para manter o Brasil como o maior produtor no mundo e para a produção atender a grande demanda atual. Este trabalho contribui decisivamente para a implementação desta tecnologia, com a identificação e caracterização de um vírus e a disponibilização de ferramentas de sua detecção. Será útil também na verificação dos danos que este vírus vem causando a esta cultura, e só assim verificar se realmente o decréscimo de produtividade relatado pelos produtores é oriundo desta virose. O Arracacha mottle virus é o primeiro vírus identificado infectando esta cultura no Brasil, porém futuros trabalhos também devem ser realizados para verificar se outros vírus infectam esta cultura no Brasil.

## RESUMO

A mandioquinha-salsa é uma planta propagada vegetativamente e durante o seu cultivo sucessivo pode ocorrer o acúmulo de patógenos de infecção sistêmica como vírus, resultando em decréscimo da produção. No Brasil, é comum observar plantas de mandioquinha-salsa apresentando sintomas de mosaico, mosqueamento e deformação foliar, semelhantes a infecção por vírus. Evidências de ocorrência de vírus infectando esta cultura já foram relatadas, porém nenhum estudo de identificação e caracterização havia sido realizado. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar biológica, sorológica e molecularmente um vírus isolado de mandioquinha-salsa e desenvolver técnicas para a sua detecção. Um isolado de vírus foi obtido a partir de mandioquinha-salsa coletada para estudo de micropropagação, denominado isolado C17, e que foi selecionado para a caracterização. Este vírus causa em *Nicotiana benthamiana*, hospedeiro usado para manutenção, sintoma de deformação foliar, bolhosidades e mosaico. O isolamento biológico foi realizado a partir do extrato da planta original de mandioquinha-salsa infectada em *Chenopodium quinoa*. Este isolado apresentou círculo de hospedeiros restrito e foi transmitido por afídeos de maneira não persistente. Partículas virais foram purificadas e análise ao microscópio eletrônico revelou partículas alongadas e flexuosas, típicas de espécies de *Potyvirus*. Em gel de poliacrilamida, a capa protéica apresentou uma proteína com peso molecular de aproximadamente 33 kDa, que em teste de *Western blotting* foi reconhecida especificamente pelo anti-soro policlonal produzido contra a proteína da capa do isolado C17. O anti-soro produzido em coelho a partir de partículas purificadas apresentou alta especificidade e sensibilidade. Amostras de campo do banco ativo de germoplasma de mandioquinha-salsa da Embrapa Hortaliças foram avaliadas por ELISA. A detecção foi positiva em 93 % das amostras, demonstrando a grande aplicabilidade do anti-soro em testes diagnósticos de amostras do campo. A porção 3' terminal do genoma do vírus (1,7 kb) foi clonada por RT-PCR e sequenciada em sequenciador automático. A análise da seqüência nucleotídica do fragmento clonado revelou uma fase aberta de leitura incompleta (sem o códon de iniciação) que codifica uma parte da proteína Nib (polimerase viral) e capa protéica (CP), seguida de uma região 3' não traduzida (3' UTR). A seqüência nucleotídica da CP e da 3' UTR apresentou baixa porcentagem de identidade com

seqüências de outros potyvírus depositados em bancos de dados públicos. A maior porcentagem de identidade nucleotídica da CP foi de 63 % para *Araujia mosaic virus* e da seqüência de aminoácidos foi de 60 % para Narcissus late season yellows virus (NLSYV). A análise filogenética confirmou o agrupamento do C17 com o NLSYV e sugeriu que estes podem ter evoluído de um ancestral em comum. De acordo com o critério molecular para demarcação de espécies de *Potyvirus*, 82 % e 76 % de identidade na comparação da seqüência de aminoácidos e nucleotídeos da CP, respectivamente, o isolado C17 de mandioquinha-salsa pode ser considerado como uma nova espécie de vírus pertencente ao gênero *Potyvirus*, e o nome Arracacha mottle virus é proposto.

Com o intuito de desenvolver uma ferramenta de detecção mais sensível que a sorologia, primers específicos foram desenhados e avaliados. Um par de primers mostrou excelentes resultados de especificidade e sensibilidade, sendo recomendados para o uso em testes de detecção em situações de necessidade de alta sensibilidade. A seqüência da região 3' terminal genômica deste vírus foi bastante distinta dos demais potyvírus, portanto a clonagem do genoma para sequenciamento completo foi realizada. Utilizou-se a estratégia de RT-PCR com primers desenhados em regiões conservadas do genoma dos potyvírus mais próximos. Um total de dez clones foram obtidos, o que corresponde a 90% do genoma do vírus. A seqüência nucleotídica destes clones estão sendo determinados por *primer walking*. Até o momento, 70 % da seqüência de nucleotídeos do genoma já foi determinada. Este é o primeiro relato de identificação e caracterização de vírus infectando mandioquinha-salsa no Brasil

## ABSTRACT

Arracacha plant is vegetatively propagated and during its continuous cultivation accumulation of systemic pathogens, such as viruses, can occur resulting in decreased production. In Brazil, it is common to observe arracacha plants with symptoms of mosaic, mottling and leaf deformation, similar to virus infection. Evidences of virus occurrence have been reported, but their identification and characterization were not carried out. The objective of this study was to characterize at the biological, serological and molecular level a virus isolated from arracacha, and to develop detection techniques. The virus isolate was obtained from an arracacha plant collected for micropropagation studies. This isolate was named C17, and selected for characterization. This virus caused in *Nicotiana benthamiana* plants, the maintenance host, symptoms of leaf deformation, blistering and mosaic. Biological isolation was conducted from the extract of the original arracacha plant inoculated in *Chenopodium quinoa* leaves. This isolate had a narrow host range and was transmitted by aphids in a non-persistent manner. Viral particles were purified and EM analysis revealed flexuous and filamentous particles, typical of *Potyvirus* species. A SDS-PAGE revealed a coat protein of ca. 33 kDa, which was specifically recognized by the C17 polyclonal antiserum by Western blotting. This antiserum was produced in rabbits from purified particles, and was shown to be highly specific and sensitive. Samples of the germplasm bank of arracacha of Embrapa Hortaliças were tested by ELISA. A total of 93% were positive for the presence of C17, demonstrating the applicability of this antiserum in diagnostic tests in field collected samples. The 3' genomic portion of the virus genome (1,7 kb) was cloned by RT-PCR and sequenced in an automated sequencer. Nucleotide sequence analysis of the cloned fragment showed a partial ORF (without the start codon) encoding the 3' portion of the NlB protein (viral polymerase), and the coat protein (CP), followed by a 3' untranslated region (3'UTR). The CP and 3' UTR nucleotide sequence shared low identity with other potyvirus sequences in public databases. The highest nucleotide identity was 63 % with *Araujia mosaic virus* (ArjMV), while the highest amino acid identity (60 %) with Narcissus late season yellows virus (NLSYV). The phylogenetic analysis confirmed the clustering of C17 isolate with NLSYV and suggested that they may have evolved from a common ancestral. According to the species demarcation criterion for

*Potyvirus* species (82% and 76% identity of CP amino acid and nucleotide sequence, respectively), C17 isolate can be considered as a novel virus belonging to the *Potyvirus* genus. The name Arracacha mottle virus is proposed.

In order to develop a detection tool more sensitive than serology, specific primers were designed and evaluated for the use in RT-PCR. One primer pair showed excellent specificity and sensitivity results and is recommended for application in detection tests when high sensitivity is needed. The sequence of the 3' terminal end of this virus was quite different from other potyviruses, hence complete genome cloning was attempted. The strategy used was based on RT-PCR with primers designed towards conserved regions of the potyvirus genome. A total of ten partial clones were obtained, which corresponded to 90% of the viral genome. Inserts of these clones are being sequenced by primer walking. To date, 70% of the nucleotide sequence has already been determined. This is the first report of the identification and characterization of a virus infecting arracacha in Brazil

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F. & FAUQUET, C. M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Archives of Virology* 150:459-479. 2005a.

ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F. & BEAUDOIN, F. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae. *Molecular Plant Pathology* 6(4):471-487. 2005b.

AHN, H. I.; YOON, J. Y.; HONG, J. S.; YOON, H. I.; KIM, M. J.; HA, J. H.; RHIE, M. J.; CHOI, J. K.; PARK, W. M. & RYU, K. H. The complete genome sequence of pepper severe mosaic virus and comparison with other potyviruses. *Archives of Virology* 151:2037–2045. 2006.

ALLISON, R. F., JOHNSTON, R. & DOUGHERTY, W. G. The nucleotide sequence of the coding region of tobacco etch virus genomic RNA: evidence for the synthesis of a single polyprotein. *Virology* 154:9-20. 1986.

ALLISON, R. F.; DOUGHERTY, W. G.; PARKS, T. D.; WILLIS, L.; JOHNSTON, R. E.; KELLY, M. & ARMSTRONG, F. B. Biochemical analysis of the capsid protein gene and capsid protein of tobacco etch virus: N-terminal amino acids are located on the virion's surface. *Virology* 147:309-316. 1985.

ALTREYA, P. L.; ALTREYA, C. D. & PIRONE, T. P. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 88:7887-7891. 1991.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. & LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25(17):3389-3402. 1997.

ANANDALAKSHMI R., PRUSS G. J., GE X., MARATHE R., MALLORY A. C., SMITH T. H. & VANCE V. B. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:13079-13084. 1998.

ANINDYA, R.; JOSEPH, R.; GOWRI, T.D.S. & SAVITHRI, H.S. Complete genomic sequence of Pepper vein banding virus (PVBV): a distinct member of the genus *Potyvirus*. *Archives of Virology* 149:625–632. 2004.

AVELAR FILHO, J.A. Estudo da conservação pós-colheita da mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). Universidade Federal de Viçosa: Dissertação mestrado 42 p. 1989.

BALBINO, J. M. S.; PREZOTTI, L. C.; FORNAZIER, M. J.; COSTA, H. & HOLZ FILHO, F. Cultura da batata-baroa. EMCAPA: Manual de Cultura 27 p. 1990.

BARATOVA, L.A.; EFIMOV, A.V.; DOBROV, E.N.; FEDOROVA, N.V.; HUNT, R.; BADUN, G.A.; KSENOFONTOV, A.L.; TORRANCE, L. & JARVEKULG, L. In situ spatial organization of Potato virus A coat protein subunits as assessed by tritium bombardment. *Journal of Virology* 75:9696–9702. 2001.

BATESON, M. F. & DALE, J. L. Banana bract mosaic virus, characterization using potyvirus specific degenerate PCR primers. *Archives of Virology* 140:515–527. 1995.

BEGER, P. H. & PIRONE, T. P. The effect of helper component on uptake and localization of potyvirus in *Myzus persicae*. *Virology* 153:256-261. 1986.

BLANC, S.; LOPEZ-MOYA, J. J.; WANG, R.; GARCIA-LAMPASONA, S.; THORNBURY, D. W. & PIRONE, T. P. A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology* 231:141–147. 1997

BOS, L. Potyviroses, chaos or order? In: Barnett, O. W. *Potyvirus Taxonomy*, Springer, Wien and New York. *Archives of Virology Supplement* 5:31-46. 1992.

BRANDES, J. & WETTER, C. Classification of elongated plant viruses on the basis of particle morphology. *Virology* 8:99-115. 1959.

BUKASOV, S. M. Las plantas cultivadas de México, Guatemala y Colombia. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1981.

BUSTAMANTE, P. G. Melhoramento de batata-baroa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) I. biologia floral; obtenção e caracterização de clones; correlações genotípicas, fenotípicas e de ambiente. Universidade Federal de Viçosa: Dissertação mestrado. 1994.

CARMO, C. A. S.; FORNAZIER, M. J. & SANTOS, F.F.dos. Densidade populacional de plantas de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). *Horticultura Brasileira* 14(1):78. 1996.

CASALI, V. W. D. & SEDIYAMA, M. A. N. Origem e botânica da mandioquinha-salsa. *Informe Agropecuário* 19(190):13-14. 1997.

CHARCHAR, J.M. & SANTOS, F.F. dos. Nematóides em mandioquinha-salsa e seus controles. *Informe Agropecuário* 19(190):51-53. 1997.

CHEN, J.; CHEN, J. & ADAMS, M. J. A universal PCR primer to detect members of the Potyviridae and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Archives of Virology* 146:757–766. 2001.

CLARK, M. F. & ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34:475-483. 1977.

COLINET, D.; KUMMERT, J.; LEPOIVRE, P. & SEMAL, J. Identification of distinct potyviruses in mixedly-infected sweetpotato by polymerase chain reaction with degenerate primers. *Phytopathology* 84(1):65-69. 1994.

COSTA, A. S. & GRANT, T. J. Studies on transmission of the tristeza virus by the vector; *Aphis citricidus*. *Phytopathology* 41(2):105-113. 1951.

DELGADO-SANCHEZ, S. & GROGAN, R. G. Potato Virus Y. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses 37. 1970.

EDWARDSON, J. R. Electron microscopy of cytoplasmic inclusions in cells infected with rod-shaped viruses. *American Journal Botany* 53:359-364. 1966.

FAJARDO, T. V. M. Estudo da degenerescência por viroses e caracterização molecular do complexo viral da cultura do alho (*Allium sativum* L.). Universidade de Brasília: Tese doutorado 121p. 1998.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U. & BALL, L.A. (Eds). *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. New York: Academic Press 1259p. 2005.

FILGUEIRA, F.A.R. Manual de olericultura: cultura e comercialização de hortaliças. São Paulo: Agronômica Ceres 650p. 2000.

FORNAZIER, M. J. & SANTOS, F. F. dos. Pragas da mandioquinha-salsa In: *Mandioquinha-salsa: manejo cultural*. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ 44-49. 1998.

FORNAZIER, M. J. Pragas e doenças da mandioquinha-salsa; pragas. V Encontro Nacional sobre mandioquinha-salsa 29-30.1995.

GAL-ON, A. Zucchini yellow mosaic virus: insect transmission and pathogenicity — the tails of two proteins. *Molecular Plant Pathology* 8(2):139-150. 2007.

GAL-ON, A.; ANTIGNUS, Y.; ROSNER, A. & RACCAH, B. A zucchini yellow mosaic virus coat protein gene mutation restores aphid transmissibility but s o effect on multiplication. *Journal of General Virology* 73:2183-2187. 1992.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158. 1968.

GIBBS, A. & MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 63:9-16. 1997.

GIORDANO, L. B.; SANTOS, F. F.; HENZ, G. P. & MOITA, A. W. Avaliação de clones de mandioquinha-salsa no Distrito Federal provenientes de sementes botânicas. *Horticultura Brasileira* 13(2):188-191. 1995.

HAMPTON, R.; BALL, E. & DE BÔER, S. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens – A laboratory manual. Saint Paul, APS Press. 338p. 1990.

HARRISON, B. D. & ROBERTS, I. M. Pinwheels and crystalline structure induced by *Atropa mild mosaic virus*, a plant virus with particles 925 nm long. *Journal of General Virology* 10:71-78. 1971.

HARRISON, B. D.; FINCH, J. T.; GIBBS, A. J.; HOLLINGS, M.; SHEPHERD, R. J.; VALENTA, V. & WETTER, C. Sixteen groups of plant viruses. *Virology* 45:356-363. 1971.

HENZ, G. P. Doenças da mandioquinha-salsa e sua situação atual no Brasil. *Horticultura Brasileira* 20:135-144. 2002.

HENZ, G. P. Perdas pós-colheita e métodos de manejo da “podridão-mole” causada por *Erwinia chrysanthemi* em mandioquinha-salsa. Universidade de Brasília: Tese de Doutorado 256p. 2001.

HERMANN, M. Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). In: Hermann, M. and J. Heller, editors. *Andean roots and tubers: Ahipa, arracacha, maca and yacon. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*. 21. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 1997.

HIEBERT, E. & McDONALD, J. G. Characterization of some proteins associated with viruses in potato Y group. *Virology* 56:349-361. 1973.

HUTTINGA, H. Properties of viruses of the potyvirus group. 3. A comparison of buoyant density, S value, particle morphology and molecular weight of the coat protein subunit of 10 viruses and virus isolates. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 81:58-63. 1975.

HUTTINGA, H. & MOSH, W. H. M. Properties of viruses of the potyvirus group. 2. Buoyant density, S value, particle morphology, and molecular weight of the coat protein subunit of bean yellow mosaic virus, pea mosaic virus, lettuce mosaic virus and potato virus Y. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 80:19-27. 1974.

HOLLINGS, M. & BRUNT, A. A. Potyvirus group. CMI/AAB Descriptions of plant viruses 15(245). 1981a

HOLLINGS, M. & BRUNT, A. A. Potyviruses. In: Kurstak, E. *Hand-book of plant virus infections: comparative diagnosis*. Elsevier/North-Holland 731-807. 1981b.

HORTIBRASIL. Mandioquinha-salsa. Disponível em: <http://www.hortibrasil.org.br/classificacao/mandioquinha/mandioquinha.html>. Acessado em: 5 de outubro de 2007. 2007.

HSU, Y.-C.; YEH, T.-J. & CHANG, Y.-C. A new combination of RT-PCR and reverse dot blot hybridization for rapid detection and identification of potyviruses. *Journal of Virological Methods* 128:54–60. 2005.

ICTVdB Management, 00.057.0.81.006. Arracacha virus Y. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. 2006a.

ICTVdB Management, 00.056.0.84.002. Arracacha latent virus. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. 2006b.

JARAMILLO, A. R. La Aracacha. *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía. Medellín* 12(15):258-261. 1952.

JONES, R. A. C. & KENTEN, R. H. *Phytopathology Z.* 100:88. 1981.

JONES, R. A. C. & KENTEN, R. H. Arracacha virus A, a newly recognized virus infecting arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*, Umbelliferae) in Peruvian Andes. *Annals of Applied Biology, Wellesbourne*, 90(1):85-91. 1978.

JONES, R. A. C. & KENTEN, R. H. Arracacha virus B. Disponível em: <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=270>. Acessado em: 5 de outubro de 2007. Atualizado em 1983. KENTEN, R. H. & JONES, R. A. C. Arracacha virus B: A second isometric virus infecting arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*, Umbelliferae) in Peruvian Andes. *Annals of Applied Biology, Wellesbourne*, 93(1):31-36. 1979.

KNUHTSEN, H.; HIEBERT, E. & PURCIFULL, D. E. Partial purification and some properties of Tobacco etch virus induce intanuclear inclusions. *Virology* 61:200-209. 1974.

KUMAR, S.; TAMURA, K. & NEI, M. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163. 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685. 1970.

LANGEVELD, S. A.; DORE, J.; MEMELINK, J.; DERKS, A. F. L. M.; VAN DER VLUGT, C. I. M.; ASJES, C. J. & BOL, J. F. Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Journal of General Virology* 72:1531-1541. 1991.

LAWSON, R. H.; HEARON, S. S. & SMITH, F. F. Development of pinwheel inclusions associated with sweet potato russet crack virus. *Virology* 44:454-456. 1971.

LEÓN, J. Plantas alimenticias andinas. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas Lima (Peru) 6:112 p. 1964.

LIZÁRRAGA, C. Progress in the identification of the viruses infecting Andean root and tuber crops. Lima, Peru: CIP, 1997.

LIZARRAGA, C. Virus en raíces andinas. In: SEMINARIO, J., comp. Raíces andinas: manual de capacitación. Lima: CIP, 2000.

LIZÁRRAGA, C.; CHUQUILLANQUI, G. & JAYASINGHE, U. Un variante del virus del anillo necrotico de la papa (Potato black ringspot virus, PBRV) aislado de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). *Fitopatología*, Lima 29(1):144-149. 1994.

LOPES, C. A. & HENZ, G. P. Doenças da mandioquinha-salsa. Informe agropecuário 19(190):49-51. 1997.

MADEIRA, N. R. & SOUSA, R. J.de. Mandioquinha-salsa: Alternativa para a pequena propriedade. UFLA. 77p. 2004.

MADEIRA, N. R. Avaliação de novos clones de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) na região de Lavras. Universidade Federal de Lavras: Dissertação mestrado 58p. 2000.

MADEIRA, N. R. Micropropagação e indexação de mandioquinha-salsa. Universidade Federal de Lavras: Tese doutorado 139p. 2004.

MATTEWS, R. E. F. *Plant Virology*. London: Academic Press, 1991.

MONTALDO, A. Bibliografía de raíces y tubérculos tropicales. Maracay: Revista de la Facultad de Agronomía – UCV 478p. 1967.

MONTEIRO, D. A.; TREMOCOLDI, W. A.; LORENZI, J. O. & PERESSIN, V. A. A realidade da mandioquinha-salsa no estado de São Paulo. *O agrônomo* 45(2/3):20-25. 1993.

MOWAT, W. P.; DUNCAN, G. H. & DAWSON, S. *Annals of Applied. Biology*. 113:531. 1988.

NEMCHINOV, L. G.; HAMMOND, J.; JORDAN, R. & HAMMOND, R.W. The complete nucleotide sequence, genome organization, and specific detection of Beet mosaic virus. *Archives of Virology* 149:1201–1214. 2004.

NISHIGUCHI, M.; YAMASAKI, S.; LU, X.-Z.; SHIMOYAMA, A.; HANADA, K.; SONODA, S.; SHIMONO, M.; SAKAI, J.; MIKOSHIBA, Y. & FUJISAWA, I. Konjak

mosaic virus: the complete nucleotide sequence of the genomic RNA and its comparison with other potyviruses. *Archives of Virology* 151:1643–1650. 2006.

OLIVEIRA, J. R. & MOURA, A. B. A. Doenças causadas por bactérias em umbelíferas. *Informe Agropecuário* 17(183):68-69.1995.

PARAMESWARI, B.; MANGRAUTHIA, S. K.; PRAVEEN, S. & JAINS, R. K. Complete genome sequence of an isolate of Papaya ringspot virus from India. *Archives of Virology* 152:843–845. 2007.

PEREIRA, A. S. Valor nutritivo da mandioquinha-salsa. *Informe Agropecuário* 19(190):11-12. 1997.

PETRZIK, K. & FRÁNOVÁ, J. Complete genome sequence of Daphne mosaic virus – a potyvirus from an ornamental shrub related to papaya leaf distortion mosaic virus. *Archives of Virology* 151:1461–1465. 2006.

PIRONE, T. P. Viral genes and gene products that determine insect transmissibility. *Seminars in Virology* 2:81-87. 1991.

POZZER, L.; DUSI, A. N. & SILVA, J. B. Estudo da degenerescência da batata-doce (*Ipomea batatas*). *Horticultura Brasileira* 17(20):187. 1992.

REGHIN, M. Y.; OTTO, R. F. & SILVA, J. B. C. "Stimulate Mo" e proteção com "tecido não tecido" no pré-enraizamento de mudas de mandioquinha-salsa. *Horticultura Brasileira* 18(1):53-56. 2000.

RIECHMANN, J. I.; LAIN, S. & GARCIA, J. A. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology* 73:1-16. 1992.

RIECHMANN, J.L.; LAIN, S.; GARCIA, J. A. The genome linked protein and 5' end RNA sequence of plum pox potyvirus. *Journal of General Virology* 70:2785-2789. 1989.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 3, 1989.

SANTOS, F. F. dos & CARMO, C. A. S. do. *Mandioquinha-salsa: manejo cultural*. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998.

SANTOS, F. F. dos & SILVA, V. V. *Curso sobre manejo cultural da mandioquinha-salsa*. Brasília: EMBRAPA/CNPH. 56p. 1998.

SANTOS, F. F. dos. *Clima, cultivares e época de plantio da mandioquinha-Salsa*. *Informe Agropecuário* 19(190):35-37. 1997.

SANTOS, F. F. dos.; VIEIRA, J. V.; PEREIRA, S. A.; LOPES, C. A. & CHARCHAR, J. M. Cultivo da mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). Brasília: EMBRAPA/CNPQ, 1991.

SANTOS, F. F. dos.; COSTA, G. P. da; MACEDO, P. de & KRIEK, R. da S. Mandioquinha-salsa no agronegócio do estado do Paraná. Curitiba: EMATER-PR / Embrapa-SPI, 56p. 2000.

SHUKLA, D. D. & WARD, C. W. Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the Potyvirus group. *Journal of General Virology* 69:2703-2710. 1988.

SHUKLA, D. D. & WARD, C. W. Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. *Archives of Virology* 106:171-200. 1989.

SHUKLA, D. D.; LAURICELLA, R. & WARD, C. W. Serology of Potyviruses: current problems and some solutions. In: Barnett, O. W. *Potyvirus Taxonomy*, Springer, Wien and New York. *Archives of Virology Supplement* 5:31-46. 1992.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W. & BRUNT, A. A. *The Potyviridae*. CAB International. 516p. 1994.

SIQUEIRA, M. F. Caracterização de *Xanthomonas campestris* pv. *arracaciae*, agente etiológico do cretamento da batata-baroa (*Arracacia xanthorrhiza*). Universidade Federal de Viçosa: Dissertação mestrado. 1988.

SOARES, L. Melhoramento de batata-baroa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) II. divergência genética entre clones com base em procedimentos multivariados e estimativas de parâmetros genéticos. Universidade Federal de Viçosa: Dissertação mestrado 1991.

SOUZA, R. J. Cultura da mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). Lavras: ESAL, 8 p. 1992.

STADEN, R.; JUDGE, D. P.; BONFIELD, J. K. Managing sequencing projects in the GAP4 environment. In KRAWETZ, S. A.; WOMBLE, D. D. (Eds). *Introduction to Bioinformatics. A Theoretical and practical approach*. Human Press Inc, Totawa, 2003.

STRADIOTTO, M. F. Doenças das umbelíferas. *Informe Agropecuário* 17(183):64-67. 1995.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. & GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22):4673-4680. 1994.

URCUQUI-INCHIMA, S.; HAENNI, A. L. & BERNARDI, F. Potyvirus protein: a wealth functions. *Virus Research* 74:157-175. 2001.

VENTURA, J. A. & COSTA, H. Doenças da mandioquinha-salsa. In: Mandioquinha-salsa: manejo cultural. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, p. 50-56. 1998.

VENTURA, J. A. Pragas e doenças da mandioquinha-salsa; doenças. V Encontro Nacional sobre mandioquinha-salsa, 30-31.1995.

VILELA, N. V. & MADEIRA, N. R. Fluxo comercial de mandioquinha-salsa no mercado brasileiro. Horticultura brasileira 24(2):373. Suplemento 2. CD-ROM. 2006.

VOLLER, A. & BIDWELL, D. E. Enzyme immunoassays and their potential in diagnostic virology. In: Kurstak, E. & Kurstak, C. (eds), Comparative Diagnosis of Viral Diseases, Volume II. Academic Press, New York, pp. 449-457. 1977.

ZANIN, A. C. W. & CASALI, V. W. D.. Origem, Distribuição Geográfica e Botânica da Mandioquinha-Salsa. Informe Agropecuário 10(120):9-11. 1984.

ZERBINI, F. M. & MACIEL-ZAMBOLIN, E. A família Potyviridae – Parte I. In: Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP), 7:1-67. 1999.

ZERBINI, F. M. & MACIEL-ZAMBOLIN, E. A família Potyviridae – Parte II. In: Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP), 8. 2000.