

Infecções simples e mistas de vírus da batata em plantações comerciais feitas com batata-semente oriundas de multiplicações sucessivas de batata-consumo na Paraíba

Gilvan PIO-RIBEIRO¹, Francisco Miguel de ASSIS FILHO², Genira Pereira de ANDRADE³, Helder Grangeiro LIRA⁴, Francisco Canindé de OLIVEIRA⁵, Cristiane Domingos da PAZ⁶, Isairas Pereira PADOVAN⁷, Rafael José Ribeiro PADILHA⁸

RESUMO: Para avaliar a ocorrência de vírus em plantações comerciais de batata na Paraíba, onde normalmente se utiliza material de propagação obtido por multiplicações sucessivas de batata-consumo, 128 amostras foliares de 20 campos foram analisadas sorologicamente em 1994. Através das técnicas DAC-ELISA e eletro-microscopia imuno-específica, demonstrou-se a ocorrência dos vírus Y (PVY), S (PVS), X (PVX) e do enrolamento das folhas (PLRV), em infecção simples e mista em 56,2% das amostras. Presença simultânea de dois ou mais vírus foi verificada em 21,8% e infecções simples de PVY e PVS em 24,2 e 10,2%, respectivamente. No ano seguinte, três campos foram avaliados em duas épocas após o plantio, observando-se maior incremento de plantas infectadas com o PVS, seguido de PVX, PVY e PLRV. Não foi detectada reação positiva para o anti-soro contra o "Andean potato mottle virus".
Palavras chave: Batata, *Solanum tuberosum*, vírus, teste ELISA

INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma das principais hortaliças cultivadas no Brasil. Em 1991, o Estado da Paraíba foi o maior produtor nordestino e sétimo produtor brasileiro dessa solanácea (IBGE, 1992). Apesar disto a produtividade média nos últimos seis anos foi cerca de 7 t/ha, enquanto a média nacional foi aproximadamente o dobro (IBGE, 1992, 1993).

O cultivo por pequenos produtores, a degenerescência do material de propagação e o cultivo de sequeiro são, provavelmente, os principais fatores responsáveis pela baixa produtividade.

Para avaliar a ocorrência de viroses onde se usa rotineiramente batata-consumo como material de propagação, foi realizado um levantamento nas principais áreas produtoras da Paraíba e um estudo mais detalhado em uma propriedade de Montadas, envolvendo três cultivares.

MATERIAL E MÉTODOS

Levantamento de viroses - No ano de 1994, foi analisada sorologicamente, material foliar de 20 campos dos municípios paraibanos de Esperança, Montadas, Areial, Remígio e São Sebastião de Lagoa de Roça. As amostras,

num total de 128 foram colhidas de plantas que exibiam um ou mais tipos de alterações externas, semelhantes àquelas induzidas por vírus, como mosaico, clorose, redução de tamanho, distorção e enrolamento foliar e nanismo.

Dos campos em que foi possível colher informações, as batatas-consumo usadas como material propagativo foram obtidas em plantios sucessivos pelos produtores em pelo menos quatro gerações.

Evolução de viroses em campos comerciais

- Uma das propriedades de Montadas em que se detectou infecção mista de vírus no ano de 1994, em plantações feitas com batata-semente de pelo menos quatro gerações, foi selecionada para acompanhamento de viroses no ano seguinte. Em três campos contíguos das cultivares Aracy (3,0ha), Itararé (1,5ha) e Monalisa (1,0ha), foram marcadas ao acaso 80, 80, e 40 plantas, respectivamente e analisadas amostras foliares colhidas na quarta semana após o plantio. No final do ciclo da cultura, as plantas marcadas, de que se pode obter material foliar em boas condições, foram retestadas num total de 63 de 'Aracy', 69 de 'Itararé' e 34 de 'Monalisa'.

¹ Prof. Visitante do Depto. de Agronomia da UFRPE, Bolsista do CNPq

² Eng. Agrônomo do Depto. de Agronomia da UFRPE

³ Bióloga(Apoio Técnico a Pesquisa)-Depto. de Agronomia da UFRPE, Bolsista do CNPq

⁴ Eng. Agrônomo da EMATER - PB

⁵ Prof. Adjunto do Depto. de Biologia Molecular da UFRN

⁶ Bióloga - Depto. de Agronomia da UFRPE, Bolsista de Pré-doutorado da FACEPE,

⁷ Prof. Adjunto do Depto. de Histologia e Embriologia da UFPE

⁸ Técnico em Microscopia Eletrônica do Depto de Histologia e Embriologia da UFPE

Técnica usada para análises - Para análises de viroses no levantamento e no acompanhamento da evolução em campos comerciais, adotou-se a técnica "direct antigen coating enzyme-linked immunosorbent assay" - DAC-ELISA, (Hobbs, Reddy, Rajeswari *et al.*, 1987), com modificações. Utilizou-se preliminarmente um anti-soro polivalente, obtido pela mistura de anti-soros policlonais, obtidos do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças-EMBRAPA, para os seguintes vírus da batata: "Potato leafroll virus" (PLRV), "potato virus S" (PVS), "potato virus Y" (PVY), "potato virus X" (PVX) e "Andean potato mottle virus" (APVM). Para as amostras com reação positiva, um segundo teste foi realizado com anti-soros específicos, objetivando a identificação viral. Cada poço da placa de microtitulação foi tratado com 100µl de extrato, obtido pela maceração de tecido foliar em tampão carbonato, na proporção de 1:10 (massa-volume) e incubado por 1h em câmara úmida a 37°C. Após três lavagens de três minutos em PBS-T (tampão fosfato salino-tween), cada poço recebeu 100 µl de anti-soro polivalente e/ou anti-soro específico, seguindo-se incubação e lavagens. Os estoques de anti-soros específicos foram obtidos pela adição de uma parte de anti-soro bruto a 800 partes de extrato foliar de planta de batata sadia em tampão de conjugado na proporção de 1:20 (massa-volume). O anti-soro polivalente foi obtido de modo semelhante, sendo todos adicionados conjuntamente. Estas preparações foram incubadas a 37°C por 1h para absorção. Em cada poço foram depositados 100µl de conjugado enzimático "goat anti-rabbit alkaline phosphatase" (SIGMA A-8025), repetindo-se incubação e lavagens. Para desenvolvimento da reação enzimática, utilizou-se o substrato "p-nitrophenil phosphate dissodium" (SIGMA N-9389), à temperatura ambiente. A paralização foi obtida pela adição de 100µl de hidróxido de sódio 3M por poço. Às leituras foram realizadas a 405nm, comparando-se a densidade ótica das amostras e controles positivo e negativo, obtidos em testes preliminares, realizados em 1993 e 1994, com exceção do APMV que não foi detectado.

Observações ao microscópio eletrônico - A observação de partículas virais foi efetuada empregando-se amostras com infecções simples e mistas, do material obtido no levantamento de viroses. Adotou-se a técnica da electro-microscopia imuno-específica, com e sem decoraçao, conforme protocolo descrito por Derrick, (1990). Inicialmente, as grades foram tratadas com anti-soro polivalente para

captura das partículas virais. Após o tratamento com extratos vegetais contendo os vírus, anti-soros específicos foram utilizados para decoraçao. As grades foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA da Universidade Federal de Pernambuco.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Levantamento de viroses - O anti-soro polivalente apresentou resultados satisfatórios quanto a detecção de vírus, com "background" ligeiramente superior aos anti-soros específicos, confirmando a viabilidade de uso (Dusi, 1989 e Pio-Ribeiro, Paz, Assis Filho *et al.*, 1994), como uma análise preliminar.

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos em testes sorológicos, demonstrando a ocorrência de reações positivas para quatro dos cinco anti-soros específicos empregados.

TABELA 1. Ocorrência de vírus em batata no estado da Paraíba determinada, através de DAC-ELISA

Vírus ou combinação de vírus	Amostras Número	com reação positiva* Porcentagem
PVY	31	24,2
PVS	13	10,2
PVS+PVY	17	13,3
PLRV+PVS	04	3,1
PLRV+PVY	01	0,8
PVS+PVX	02	1,5
PLRV+PVS+PVY	01	0,8
PLRV+PVS+PVY+PVX	03	2,3
TOTAL	72	56,2

* Foram analisadas 128 amostras coletadas em 20 campos de produção de batata, de cuja maioria não foi possível se obter informações seguras quanto a cultivar e/ou o número de gerações do material usado como semente.

Das 128 amostras analisadas, 31 reagiram positivamente com o anti-soro contra PVY, 13 foram positivas para o PVS e 28 para mais de um vírus, correspondendo a 24,2, 10,2, e 21,8 por cento, respectivamente. As análises através da técnica de eletro-microscopia imuno-específica revelaram a presença de partículas virais com características já esperadas, com base no teste ELISA, exemplificadas na Figura 1.

Os resultados obtidos estão de acordo com dados da literatura, que relatam a ocorrência destes vírus no Brasil (Daniels e Carvalho, 1993; Figueira, Souza, Cardoso *et al.*, 1985 e Souza-Dias, Amancio e Costa., 1990).

Evolução de viroses em campos comerciais - Os resultados obtidos nos dois períodos de

observação estão reunidos na Tabela 2. Considerando os dados globais, o número de plantas infectadas praticamente triplicou entre a quarta semana e o final do ciclo da cultura. Infecções simples e mistas foram detectadas desde o primeiro teste em todas as cultivares, a cujos vírus foram adicionados outros durante o período de cultivo, passando de 19, 9, 8 e 12

para 54, 14, 15 e 14 plantas infectadas com PVS, PVY, PVX e PLRV, respectivamente, considerando-se conjuntamente as três cultivares. Estes dados evidenciam a grande eficiência na forma de disseminação dos vírus e marcante ação de vetores, em contraposição às informações obtidas por Souza-Dias, Miranda Filho, Carneiro *et al* (1993).

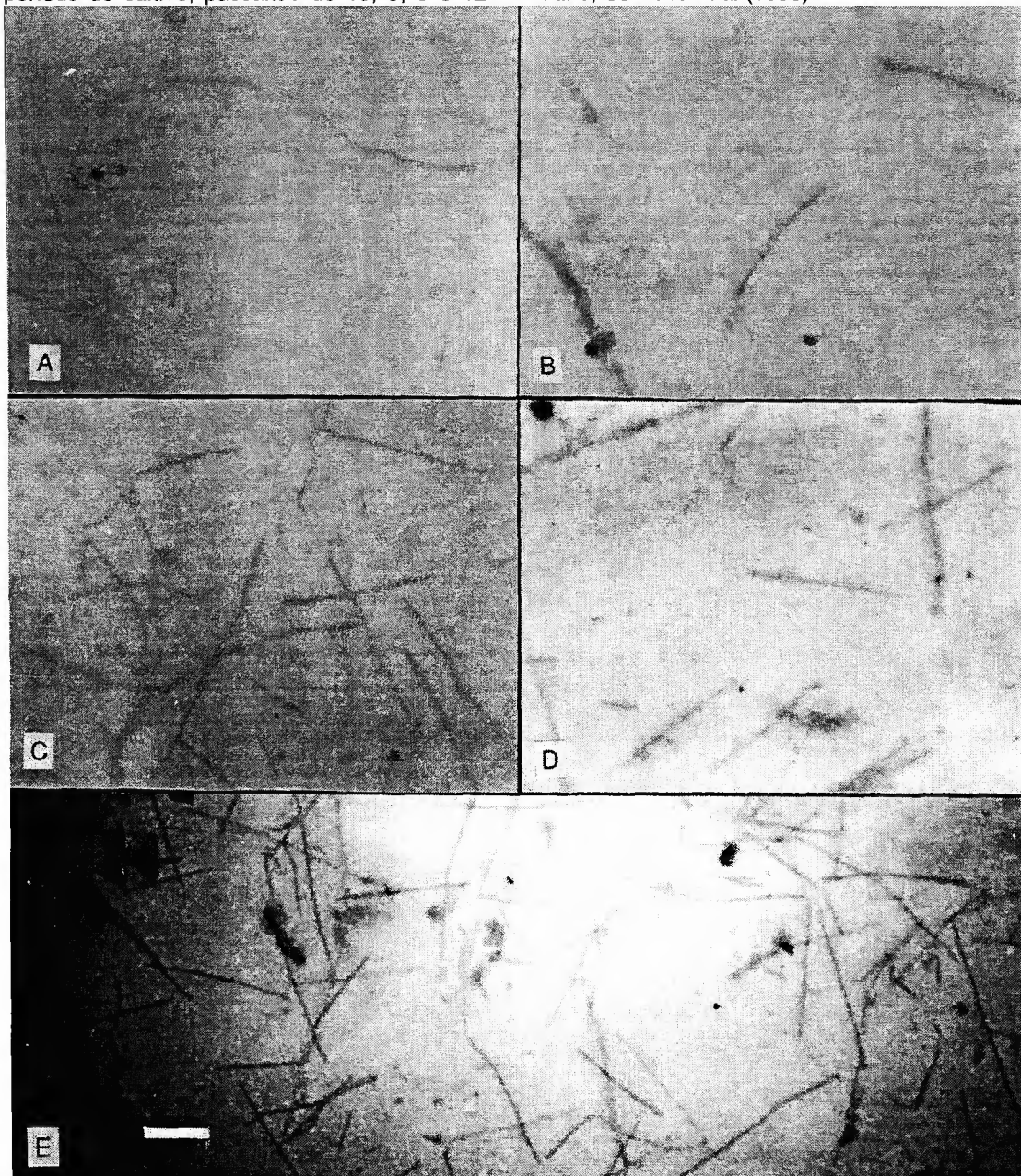


Figura 1. Partículas virais detectadas em amostras foliares de batata pela técnica de eletro-microscopia imuno-específica. Barra, corresponde a 250nm. A=PVY sem decoração; B= PVY com decoração; C= PVS sem decoração; D= PVS com decoração e E= PVY+PVS+PVX sem decoração. Partículas com mais de 800nm são resultantes de agregação, especialmente do PVS.
TABELA 2 - Detecção de vírus , pelo teste DAC-ELISA, em amostras foliares de batata de três campos comerciais adjacentes, em duas épocas após o plantio

Vírus ou combinação de vírus	'Aracy'		'Itararé'		'Monalisa'		'Somatório'	
	Quarta Semana	Semana da colheita	Quarta Semana	Semana da colheita	Quarta Semana	Semana da colheita	Quarta Semana	Semana da colheita
PVS	3	8	2	16	0	8	5	32
PVX	0	1	0	0	0	0	0	1
PVY	3	5	1	2	0	0	4	7
PVS + PVX	0	1	0	3	1	1	1	5
PVS + PVY	0	1	1	2	0	0	1	3
PVS + PLRV	2	2	1	2	0	1	3	5
PVS + PLRV + PVX	3	3	1	1	1	1	5	5
PVS + PLRV + PVY	1	0	1	0	0	0	2	0
PVS+PLRV+ PVX+PVY	0	1	2	3	0	0	2	4
Somatório	12	22	9	29	2	11	23	62

* O número real de plantas com infecções simples e/ou mista na época da colheita foi possivelmente maior do que o observado, uma vez que apenas 63 de 80, 69 de 80 e 34 de 40 plantas das cultivares Aracy, Itararé e Monalisa, respectivamente testadas na quarta semana, puderam ser retestadas.

O plantio de tubérculos obtidos de cultivos sucessivos de batata-consumo pode levar à degenerescência o material de propagação (Salazar, 1990), notadamente pelo acúmulo de vírus (Souza-Dias, Miranda Filho, Ramos *et al.*, 1984), reduzindo significativamente a produtividade (Lago e Perez, 1990 e Spiegel e Martin, 1993). Alguns estudos têm demonstrado a relação direta entre incidência de vírus e número de multiplicação em campo do material de propagação (Figueira, Souza, Cardoso *et al.*, 1985; Souza-Dias, Amancio e Costa, 1990 e Souza Dias, Costa e Nardin, 1993). Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o uso de batata-semente certificada poderia melhorar a produtividade da cultura, minimizando as perdas ocasionadas por infecção viral, numa região onde se emprega para plantio material de até 13ª geração (Souza-Dias, Miranda Filho, Carneiro, *et al.* 1993).

ABSTRACT

In order to evaluate the occurrence of viruses in potato commercial fields in Paraíba, where normally propagative material is obtained from successive multiplication of commercial potato, 128 leaf samples collected from 20 fields were analysed serologically in 1994. By DAC-ELISA and serologically specific electron microscopy it was demonstrated the presence of potato S, Y, X, and leafroll viruses, in single and mixed infections in 56,2 of the samples. The simultaneous occurrence of two or more virus was observed in 21,8% of the tested samples and single infections of PVY and PVS in 24,2 and 10,2%, respectively. In the next year, three fields were evaluated in two periods after planting, observing a higher increase of infected plants with PVS, followed by PVX, PVY, and PLRV. None of the samples presented positive

reaction for Andean potato mottle virus antiserum.

Keys word: Potato, *Solanum tuberosum*, virus, ELISA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. Rio de Janeiro : IBGE, n. 52, 1992. p. 547-554.
- 2 DANIELS, J.; CARVALHO, T. C. Incidência de vírus S da batata, referência para avaliar o programa de produção de batata-semente no Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 18, n. 2, p. 265, 1993 (Resumo).
- 3 DERRICK, K. S. Serologically specific electron microscopy (SSEM). In: HAMPTON, R.; BALL, E.; DE BOER, S. (Ed.). *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens*. St. Paul : The American Phytopathological Society, 1990, p. 313-319.
- 4 DUSI, A. N. Utilização de combinação de anti-soro na detecção simultânea de PVS e PVY em batata semente. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 14, n. 2, p. 129, 1989 (Resumo)
- 5 FIGUEIRA, A. R.; SOUZA, P. E.; CARDOSO, M. R. O.; *et al.* Ocorrência dos vírus que infectam a batateira na região sul de Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 10, n. 2, p. 307, 1985 (Resumo)
- 6 HOBBS, H. A.; REDDY, D. V. R.; RAJESWARI, R. *et al.* Use of direct antigen coating and protein A coating ELISA procedures for detection of three peanut viruses. *Plant Disease*, St. Paul, v. 71, n. 8, p. 747-749, 1987.
- 7 LAGO, L.; PEREZ, S. Virus and viroid detection: strategies in Cuba. In: Report of the 3 Planning

Conference, 1989, Lima. Anais. Lima: International Potato Center (CIP), 1990.p. 89-96.

8

LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA. Rio de Janeiro:IBGE, v. 5. n. 10, 1993, p. 22.

9

PIO-RIBEIRO, G.; PAZ, C. D.; ASSIS FILHO, F. M.; *et al.* Detecção sorológica de vírus de uma coleção de batata (*Solanum tuberosum*) no Estado de Pernambuco. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.19, n. 3, p. 473-475, 1994.

10

SALAZAR, L. F. Main virus diseases of potato. In: Report of the 3 Planning Conference, 1989, Lima. Anais. Lima : International Potato Center (CIP), 1990. p. 9-12.

11

SOUZA-DIAS, J. A. C.; AMANCIO, A. V.; COSTA, A. S. O vírus do entrolamento da folha da batata continua a ser a principal causa da degenerescência da batata-semente no Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 15, n. 2, p. 136, 1990 (Resumo)

12

SOUZA-DIAS, J. A. C.; COSTA, A. S.; NARDIN, A. M. Potato leafroll virus in solanaceous weeds in Brazil explains severe outbreaks of the disease in absence of known potato donor sources.

Summa Phytopathologica, Jaguariuna, v. 19, n. 2, p. 80-85, 1993.

13

SOUZA-DIAS, J. A. C.; MIRANDA FILHO, H. S.; CARNEIRO, O. L.; *et al.* Batata-semente comum mantém baixa incidência de viroses após várias multiplicações sucessivas em plantio de consumo na Paraíba. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 18, n. 2 p. 274, 1993.

14

SOUZA-DIAS, J. A. C.; MIRANDA FILHO, H. S.; RAMOS, V. J.; *et al.* Produção de batata-semente Aracy com diferentes níveis de enrolamento. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 9, n. 2, p. 203-211, 1984.

15

SPIEGEL S.; MARTIN, R. R. Improved detection of potato leafroll virus in dormant potato tubers and microtubers by the polymerase chain reaction and ELISA. *Annual Applied Biology*, Weelsbourne, v. 122, n. 3, p. 493-500, 1993.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório Keizo AsamiliKA da Universidade Federal de Pernambuco, à Empresa IPA, a FACEPE e ao CNPq pelo apoio recebido.

Recebido para publicação em 01 de julho de 1996