

na realização de levantamentos e no estabelecimento de métodos de controle. A diferenciação por meio de RT-PCR, utilizando primers diversos, tem sido descrita, havendo inclusive kits específicos para a diagnose do PVY<sup>NTN</sup>. Nesse trabalho diversas técnicas foram testadas, incluindo o kit da Adgen, para avaliar o seu custo/benefício na discriminação de isolados de PVY. Estas foram realizadas com uma coleção de 21 isolados, sendo nove PVY<sup>O</sup>, onze PVY<sup>N</sup> e um PVY<sup>NTN</sup> (cedido pelo IAC). A associação entre DAS-ELISA, com anticorpos policlonal e monoclonal (Agdia 26000) e RT-PCR, com primers desenhados para a região da capa proteica, a partir de um ponto de recombinação (Boonham et al., Plant Pathol., 51:117-126, 2002), foi a única que apresentou uma eficiência e repetibilidade de 100%, em relação ao kit da Adgen, para todos os isolados. O PVY<sup>O</sup> não reagiu com o anticorpo monoclonal e o PVY<sup>N</sup> e PVY<sup>NTN</sup>, que foram ELISA positivos para esse anticorpo, em RT-PCR originaram bandas com 549 e 609 pb, respectivamente. Essa associação de técnicas mostrou uma alta confiabilidade e propiciou uma redução considerável no custo final do teste, favorecendo a realização de levantamentos seguros e mais abrangentes.

250

SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DE CAPA PROTÉICA DE ISOLADO BRASILEIRO DO *Potato virus Yntn*. SAWAZAKI, H. E.; SOUZA-DIAS, J. A. C. & MÓDOLO, D. G. (IAC E-mail: henoke@iac.sp.gov.br) PVYntn: Coat protein sequencing of a Brazilian isolate.

*Potato virus Y* (PVY) isolado de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* cv. *Monalisa*) que apresentavam anéis necróticos superficiais sugestivos da infecção pela estirpe PVYNTN (Souza-Dias et al. Su mma Phytopat 25 (1):36.1999; Souza-Dias, Su mma Phytopat 26 (1): 160-168. 2000), foi caracterizado molecularmente neste trabalho. Após confirmada a identidade de PVY via DAS-ELISA (IgG policlonal) e necrose das nervuras em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* cv. *Turkish* ou TNN) inoculadas mecânicamente, RT-PCR com primers específicos de 3 literaturas permitiram a identificação inicial do PVYNTN. As seqüências alinhadas dos aminoácidos foram agrupadas pelo Clustal X e visualizadas pelo Njplot. O cDNA e RT-PCR do RNA total extraído dos tubérculos sintomáticos (kit GeneAmp da Applied Biosystems) originaram o amplicon do capsídeo com os primers sense (5'CCACCAYATGGSAAATGACACAATYGATGCA3') e antisense (5'GAGCTCATGTTTTSACTCCAAGYAG3'), o qual foi clonado em pMOSBlue (Amersham) e sequenciado no ABI PRISM 377. Através de BLAST, o isolado estudado confirmou ser a estirpe PVYNTN pela similaridade de 97% dos 798 nucleotídeos observados da capa protéica, ao acesso AJ390291 e proximidade de ligação ao agrupamento de outros dois isolados de PVYNTN. Essa constatação a nível molecular vem ao encontro das suspeitas patológicas mencionadas, apesar de alerta preventivo feito anteriormente (Souza-Dias, Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 18 (184):54-63. 1996).

251

VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE *Prune dwarf* E *Prunus necrotic ringspot virus* EM DIFERENTES TECIDOS E ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DE PESSEGUEIRO CV. CHIRIPÁ. MACIEL, S. C.<sup>1</sup>; DANIELS, J.<sup>2</sup>; FAJARDO, T. V. M.<sup>3</sup>; FACHINELLO, J. C.<sup>4</sup>; MOURA, A. B.<sup>4</sup> & SILVA, R. F.<sup>1</sup> ('ESALQ/USP, <sup>2</sup>Embrapa Clima Temperado, <sup>3</sup>Embrapa Uva e Vinho & <sup>4</sup>UFPel E-mail: s cmaci@esalq.usp.br) Variation of Prune dwarf and Prune necrotic ringspot virus concentrations in different plant tissues and development stages of the peach tree cv. Chiripá.

*Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) e *Prune dwarf virus* (PDV) são importantes patógenos de muitas espécies de *Prunus*, incluindo o pessegueiro [*P. persica* (L.) Batsch.]. O objetivo deste

trabalho foi determinar os melhores tecidos vegetais para testes de rotina na certificação de mudas e a variação da concentração de vírus durante o ano. A concentração de PNRSV e PDV foi analisada na cultivar Chiripá, por DAS-ELISA em folhas, entrenós, frutos e sementes (dezembro), entrenós, gemas vegetativas e floríferas (junho), flores, brotos novos e entrenós (agosto), e folhas novas, folhas velhas e entrenós (outubro). Os maiores valores de absorbância ( $A_{405nm}$ ), representativos da concentração de vírus, ocorreram em agosto, período de elongação dos ramos. Flores coletadas neste período apresentaram valores médios de absorbância de 0,787 para o PDV e 1,835 para o PNRSV. Entretanto, em todos os estádios fenológicos foi possível determinar tecidos vegetais capazes de fornecer resultados adequados e confiáveis para a distinção entre plantas sadias e infectadas.

252

PROPERTIES OF STRAINS OF *Sweet potato feathery mottle virus* AND TWO NEWLY RECOGNIZED POTYVIRUSES INFECTING SWEET POTATO IN THE UNITED STATES. SOUTO, E. R.<sup>1</sup>; SIM, J. C. J.<sup>2</sup>; VALVERDE, R. A.<sup>2</sup> & CLARK, C. A.<sup>2</sup> ('UEM & <sup>2</sup>Louisiana State University E-mail: ersouto@uem.br) Propriedades de estirpes do Sweet potato feathery mottle virus e o reconhecimento de dois novos potyvirus infectando batata-doce nos Estados Unidos.

Some biological and molecular properties of six potyvirus isolates (LSU-1, 2, 3, and 5, 95-2, and 95-6) from sweet potato (*Ipomoea batatas*) were evaluated. Isolates LSU-1, -3 and 95-2 were transmitted by *Aphis gossypii* and *Myzus persicae* while LSU-2 and 5 were not transmitted by either aphid. The partial nucleotide sequence of the nuclear inclusion b (NIb) and the coat protein (CP) genes of these six isolates were compared with the corresponding sequences of 17 *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) strains and 18 other potyviruses. LSU-1 and LSU-3 had high sequence similarity to the published sequences for *Sweet potato virus G* (SPVG), did not react with antisera to other known sweet potato viruses, and caused distinct symptoms. We propose to designate these two isolates as SPVG. This report documents the occurrence of this virus in the United States and provides the first characterization of its biological properties. LSU-2 and LSU-5 were distinct in symptomatology, partial NIb and CP nucleotide and derived amino acid sequence, and serology to other viruses. We propose to call this virus (LSU isolates 2 and 5) *Ipomoea vein mosaic virus*. The present study revealed a high degree of sequence similarity between 95-6 and the common strain of SPFMV, and between 95-2 and the russet crack strain of SPFMV. Results from this study suggest not only that at least two strains of SPFMV occur in the United States, but that two other potyviruses also are present.

253

DECODIFICANDO O GENOMA DO VÍRUS DA "MELEIRA". TAVARES, E. T.<sup>1</sup>; TATAGIBA, J. S.<sup>2</sup>; MARTINS, N. F.<sup>1</sup>; SILVA, F. R.<sup>1</sup>; MARINHO, V. L. A.<sup>1</sup>; VENTURA, J. A.<sup>2</sup>; ZAMBOLIM, E. M.<sup>3</sup> & SOUZA JR., M. T.<sup>1</sup> ('Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, <sup>2</sup>INCAPER & <sup>3</sup>UFV E-mail: eder@cenargen.embrapa.br) Decoding the Papaya meleira virus genome.

A "meleira" do mamoeiro (*Carica papaya* L.) tornou-se, em algumas regiões produtoras, o principal fator limitante desta cultura. Estudos recentes demonstraram que o agente causal desta doença é um vírus de partícula isométrica de 40-50 nm de diâmetro e com uma única molécula de dsRNA de cerca de 12 kb. Tudo indica tratar-se de uma nova espécie. Com o objetivo de classificar, conhecer seus genes e desenvolver ferramentas de diagnose e controle para esse vírus, o sequenciamento do

Fitopatol. bras. 28(Suplemento), agosto 2003

S253

15579

F. 9548

Takimoto  
9548

seu genoma é um requisito. Até o momento, obtivemos seqüências que somam cerca de 65% do genoma viral, utilizando uma estratégia que envolve reações de RT e RAPD para a construção de uma biblioteca de cDNA. Fragmentos de DNA amplificados a partir do uso de nove oligonucleotídeos (10 mers) foram clonados e submetidos a sequenciamento. Setenta clones foram seqüenciados, forward e reverse. As 140 seqüências, submetidas à análise no programa CAP3, geraram nove contigs, que somados chegam a 7.828 nucleotídeos. Os contigs foram submetidos à análise pelo programa BlastX, e comparados com o Database do NCBI. Análises de Dot-blot utilizando seqüências pertencentes a dois contigs mostraram que estas pertencem ao dsRNA viral e não ao DNA total de mamoeiro.

254

**DIAGNOSE PRECOCE DA MELEIRA DO MAMOEIRO.**  
**TAVARES, E. T.<sup>1</sup>; TATAGIBA, J. S.<sup>2</sup>; VENTURA, J. A.<sup>2</sup> & SOUZA JR., M. T.<sup>1</sup>** (<sup>1</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia & <sup>2</sup>INCAPER E-mail: msouza@cenargen.embrapa.br) *Early diagnosis of papaya sticky disease.*

A "meleira" do mamoeiro (*Carica papaya L.*), relatada pela primeira vez na segunda metade da década de 80, encontra-se, hoje, presente nas principais regiões produtoras nacionais, tornando-se, em algumas delas, o principal fator limitante desta cultura. Os sintomas caracterizam-se por exsudação excessiva de látex mais fluido dos frutos, que enegrecidos devido à oxidação do látex, tornam-se impróprios para a comercialização. O agente causal, um vírus de partícula isométrica com 40-50 nm de diâmetro, possui uma única molécula de dsRNA de cerca de 12 kb, o que leva a crer que se trata de uma espécie nova. A diagnose desta doença é feita por sintomas que aparecem principalmente nos frutos, permitindo que uma planta infectada permaneça no campo vários meses antes de ser diagnosticada. Outra forma de diagnose é a extração de dsRNA a partir látex/folha, método laborioso, e que não se presta à detecção em larga escala. Visando o desenvolvimento de sistemas de diagnose precoce de "meleira" que pudesse ser usado em larga escala, nosso grupo desenvolveu um método que utiliza o látex extraído dos frutos, folhas ou caule de plantas. Látex em tampão citrato (1:1, v/v) é submetido a extração de dsRNA utilizando-se proteinase K. A presença do vírus é confirmada pela visualização do seu dsRNA em gel de agarose (1%) em 1X TBE. Com esta técnica temos conseguido resultados confiáveis a ponto de diagnosticar precocemente a "meleira" em plantas ainda jovens e em plantas assintomáticas.

255

**DOENÇA AZUL DO ALGODEOIRO: POSSÍVEL NÃO LUTEOVÍRUS.** **TAKIMOTO, J. K.; SAWAZAKI, H. E.; SOUZA-DIAS, J. A. C. & CIA, E.** (IAC E-mail: ju\_taki@yahoo.com.br) *Cotton blue disease, a possible no luteovirus.*

A doença azul do algodeiro, ou azulão, é uma virose em destaque na cotoniicultura nacional. Apesar do agente causal não estar bem caracterizada ainda, transmissão por enxertia e afídeo vetor *Aphis gossypii* são comuns. Na tentativa de obtenção de métodos alternativos para detecção desta virose, testes sorológicos foram realizados com sucesso utilizando anti-soro para *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) raças PAV e RPV ([http://saenzpe.inta.gov.ar/Fito/enf\\_azul.htm](http://saenzpe.inta.gov.ar/Fito/enf_azul.htm)). Tentativas com anti-soro polyclonal para outros luteovírus foram testados: *Potato leafroll virus* (PLRV), do kit CNPH-EMBRAPA; *Beet western yellows virus* (BWWV), do kit Agdia Inc.-USA; BYDV (raça PAV e MAV), cortesia da Dra. Jurema Schons (U. Passo Fundo-RS) e *Sugarcane yellow leaf virus* (SYLV), cortesia do Dr. Marcos Gonçalves (APTA/IB). Testes moleculares (RT-PCR) foram também efetuados com primers universais para o PLRV (SOUZA-DIAS *et al.*, 1999 – Am J of Potato Res 76:17-24; SOUZA-DIAS *et al.*, 2001 – Anais VII Sem

Nac de Bat Sem) e para o grupo luteovírus (ROBERTSON *et al.*, 1991 – J of Gen Vir 72:1743-1777). Os resultados, entretanto, têm sido negativos em plantas de algodão com sintomatologia típica (transmissão experimental). Com base nestes dados, não se pode afirmar ainda que o vírus causador da doença azul do algodeiro seja membro da família Luteoviridae. Avanços neste estudo são necessários para epidemiologia e controle dessa virose.

256

**DOENÇA AZUL DO ALGODEOIRO: UMA TENTATIVA DE IDENTIFICAÇÃO HISTOLÓGICA.** **TAKIMOTO, J. K.; QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; SOUZA-DIAS, J. A. C. & CIA, E.** (IAC E-mail: ju\_taki@yahoo.com.br) *Cotton blue disease: attempts toward a histological identification.*

A doença azul, ou azulão do algodeiro, é uma virose com etiologia putativa para família Luteoviridae. O afídeo vetor *Aphis gossypii* é o mesmo do *Cotton anthocyanosis*, outro putativo membro da mesma família, causador do "vermelhão" do algodeiro. Na ausência de técnicas imunológicas ou moleculares, alterações anatômicas estão sendo analisadas visando diagnosticar o azulão. Para isso, lâminas permanentes de folhas adultas, sadias e infectadas foram coradas com safranina e "alcian blue". Nos testes de calose (polissacárido constituinte do floema com maior acúmulo em luteovíroses), utilizou-se o azul de anilina em tecidos de caule. No azulão, as células do mesofilo apresentaram cloroplastos íntegros e uma sugestiva alteração química devido a uma coloração azulada ou avermelhada enquanto que no vermelhão os cloroplastos apresentaram-se destruídos e núcleos aumentados. Além disso, a possível identidade de luteovírus do azulão do algodeiro pode ser sustentada pelo maior acúmulo de calose conforme observado em tecidos de caule de plantas infectadas comparadas com sadias. Acúmulo de calose já foi utilizado na diagnose de outros luteovírus como o *Potato leafroll virus*, na cultura da batata (*Solanum tuberosum*). Aspectos histológicos, conforme observados, podem auxiliar na identificação do azulão do algodeiro, enquanto avanços imunológicos e moleculares desse vírus não ocorrem.

257

**EFICIENCIA DE TRANSMISIÓN DEL MRCV POR *Delphacodes kuscheli* SEGÚN LA EDAD DEL VECTOR DURANTE LA ADQUISICIÓN.** **ARNEODO, J. D.<sup>1</sup>; RAMOS, M. L.<sup>1</sup>; OJEDA, S.<sup>2</sup>; GUZMÁN, F. A.<sup>1</sup>; CONCI, L.<sup>1</sup>; LAGUNA, I. G.<sup>1</sup> & TRUOL, G. A.<sup>1</sup>** (<sup>1</sup>INTA - IFFIVE & <sup>2</sup>FAMAF (UNC E-mail: arneodoj@correo.inta.gov.ar) *Transmission efficiency of MRCV by Delphacodes kuscheli depending on vector age at acquisition.*

El virus del mal de Río Cuarto (MRCV) es transmitido en forma persistente por *Delphacodes kuscheli*. En este trabajo, se estudió la capacidad del vector para adquirir y transmitir el virus en diferentes estadios.

Ninfas I, III y adultos (180 ejemplares por estadio) adquirieron el MRCV durante 48 h sobre plantas de trigo infectadas y bajo condiciones controladas. Luego, los individuos de cada estadio fueron divididos en subgrupos de tres y transferidos a plantas de trigo sanas (1 subgrupo/planta) a 3, 5, 7, 9, 12, 14, 17 y 22 días de iniciada la adquisición para inocular el virus por un período de 24 h. La presencia del MRCV en las plantas fue corroborada mediante DAS-ELISA y SDS-PAGE. Se detectaron diferencias significativas en la cantidad de subgrupos infectivos, dependiendo de que la adquisición se efectuara como ninfas I (32/60), ninfas III (20/60) o adultos (5/60). La baja eficiencia de transmisión de este último grupo, se debió principalmente a la mortalidad registrada (por la longevidad normal de los insectos en laboratorio), ya que el análisis por sondas de hibridación molecular de adultos muertos reveló un 25% de ejemplares virulíferos. La duración del período

FOL.9548

T231d

2003

ex. 15587

Fitopatol. bras. 28(Suplemento), agosto 2003

15587