



COMUNICADO
TÉCNICO

132

Brasília, DF
Dezembro, 2021



Métodos de indexação de vírus em batata

Mirtes Freitas Lima
Giovani Olegário da Silva

OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL

12 CONSUMO E
PRODUÇÃO
RESPONSÁVEIS



Métodos de indexação de vírus em batata

Mirtes Freitas Lima¹

Giovani Olegário da Silva²

Introdução

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é importante fonte alimentar, situando-se entre os alimentos mundialmente mais importantes: o trigo (*Triticum* spp.), o arroz (*Oryza* spp.) e o milho (*Zea mays* L.) (KARASEV; GRAY, 2013). No Brasil, a cultura se destaca pela relevância econômica e social, gerando renda e empregos ao longo da cadeia produtiva. Em 2018 e 2019 os dados de produção de tubérculos, assim como do tamanho da área cultivada foram similares. Enquanto que em 2018, a produção foi de 3.688.029 ton em 119.117 ha plantados, em 2019 foram produzidas 3.696.930 ton em uma área total de 116.804 ha (IBGE, 2019; IBGE, 2020). O estado de Minas Gerais foi o maior produtor no período, com 1.147.322 ton em 2018 e 1.199.571 ton em 2019. Outros estados produtores que também se destacaram nestes dois anos foram Paraná, São Paulo, Rio Grande do Sul, Bahia e Goiás.

Diversas doenças afetam a batateira e vários fatores podem influenciar a ocorrência de doenças e a severidade dos sintomas. Como a batata é produzida comercialmente por meio do plantio de tubérculos, um dos fatores mais importantes para o estabelecimento de novos plantios é o estado fitossanitário do tubérculo-semente. A propagação vegetativa de plantas incorre na degenerescência do material de plantio pelo acúmulo gradativo de patógenos, em especial os patógenos virais, de geração para geração. No caso da batata, é essencial que após duas ou três gerações, a depender de vários fatores, a semente seja renovada, adquirindo-se batata semente certificada, que passou por processo de limpeza e que tem garantia de sanidade estabelecida por padrões do MAPA. Segundo Cepea (2020), o custo do tubérculo-semente representa de 15% a 20% dos custos de produção. Neste contexto, a degenerescência

¹ Eng. Agrônoma, Ph.D. Fitopatologia, pesquisadora Embrapa Hortaliças.

² Eng. Agrônomo, D.Sc. Agronomia, pesquisador Embrapa Hortaliças.

da batata-semente é considerada a principal causa da obtenção de baixas produtividades, principalmente em países que adotam sistemas de produção menos tecnificados (GILDEMACHER *et al.*, 2009; CROMME *et al.*, 2010). Apesar da complexa etiologia da degenerescência (THOMAS-SHARMA *et al.*, 2016), os vírus são classificados como a causa primária nesse processo (SALAZAR, 1996; SOLOMON-BLACKBURN; BARKER, 2001). Os vírus são considerados os patógenos mais danosos à batata, devido a sua transmissão em tubérculos infectados ao longo das gerações de cultivo e das perdas significativas que podem causar na produção (ROSS, 1986). A infecção das plantas por vírus resulta em declínio da cultura com perda de vigor, além de redução na produtividade. A inexistência de medidas curativas para controle de viroses as torna doenças complexas. Neste caso, devem ser adotadas medidas de controle preventivo, visando evitar ou reduzir a ocorrência da infecção.

A disseminação de vírus via material propagativo pode ainda ser agravada considerando-se a possibilidade de ocorrência de infecção latente, ou seja, quando as plantas não apresentam sintomas aparentes, apesar de infectadas com vírus.

Dessa forma, a avaliação de sintomas de viroses em plantas no campo, além

da correta identificação laboratorial do agente viral associado à doença, é de fundamental importância, visando dar suporte à tomada de decisão quanto à definição das estratégias a serem empregadas no controle. Esta publicação tem como objetivo apresentar os métodos mais utilizados na diagnose e na indexação dos principais vírus que infectam a batata no Brasil.

Viroses

Mais de 40 espécies de vírus e dois viroides já foram relatados infectando batata em todo o mundo (VALKONEN, 2007; WANG *et al.* 2011; PALUKAITIS, 2012). No entanto, apenas cerca de nove espécies são citadas como as mais frequentemente detectadas na cultura, podendo causar sérios prejuízos, dentre as quais estão *Potato virus Y* (PVY), *Potato leafroll virus* (PLRV), *Potato virus S* (PVS) e *Potato virus X* (PALUKAITIS, 2012). No Brasil, há pouco mais de 10 anos apenas essas quatro espécies eram consideradas como as mais importantes para a cultura (DANIELS *et al.*, 2002; PEREIRA; DANIELS, 2003; AVILA *et al.*, 2009), principalmente PVY e PLRV (AVILA *et al.*, 2009). Entretanto, a situação fitossanitária da batata tornou-se mais complexa, considerando a infecção da cultura por novos vírus no País. Entre esses, destacam-se *Tomato chlorosis virus* (ToCV) (FREITAS *et al.*, 2012; SOUZA-DIAS *et al.*, 2013;

SILVA; LOPES, 2018; LIMA; SANTOS, 2016), *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) (SOUZA-DIAS *et al.*, 2003; PEREIRA; DANIELS, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2006) e *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) (SOUZA-DIAS *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2018). Surtos de vira-cabeça também têm sido registrados em lavouras da região Centro-Sul do Brasil (SOUZA-DIAS *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2017; LIMA; MICHEREFF FILHO, 2018; LIMA *et al.*, 2019) (Tabela 1).

Informações adicionais sobre as espécies virais apresentadas na Tabela

1 podem ser obtidas no site oficial do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/).

As Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6 ilustram os diferentes tipos de sintomas (induzidos por vírus citados na Tabela 1) observados em batateiras naturalmente infectadas em campo. A identidade dos vírus causando sintomas nas plantas foi confirmada por meio da utilização de métodos sorológicos e antissoros policlonais (PVY; PVS; PVX; PLRV; GRSV) e métodos moleculares (ToSRV; ToCV; GRSV). Os sintomas

Tabela 1. Vírus mais frequentes infectando lavouras de batata no Brasil.

Vírus ¹	Família	Gênero	Transmissão natural	Modo de transmissão pelo vetor	Referência
PVY	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	Afídeos	Não persistente	Palukaitis (2012)
PVS	<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Carlavirus</i>	Afídeos; mecânica ²	Não persistente	Palukaitis (2012)
PVX	<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Potexvirus</i>	Mecânica ²	SRTI ³	Palukaitis (2012)
PLRV	<i>Luteoviridae</i>	<i>Polerovirus</i>	Afídeos	Circulativo persistente	Palukaitis (2012)
ToYVSV	<i>Geminiviridae</i>	<i>Begomovirus</i>	Mosca branca	Circulativo persistente	Palukaitis (2012)
ToSRV	<i>Geminiviridae</i>	<i>Begomovirus</i>	Mosca branca	Circulativo persistente	Souza-Dias <i>et al.</i> (2008); Lima <i>et al.</i> (2018)
ToCV	<i>Closteroviridae</i>	<i>Crinivirus</i>	Mosca branca	Semipersistente	Freitas <i>et al.</i> (2012)
TSWV	<i>Tospoviridae</i>	<i>Orthotospovirus</i>	Tripes	Persistente circulativo propagativo	Costa; Kiel (1938); Souza Dias <i>et al.</i> (2015)
GRSV	<i>Tospoviridae</i>	<i>Orthotospovirus</i>	Tripes	Persistente circulativo propagativo	Lima <i>et al.</i> (2017; 2019)

¹ PVY=Potato virus Y; PVS=Potato virus S; PVX=Potato virus X; PLRV=Potato leafroll virus
ToYVSV=Tomato yellow vein streak virus; ToSRV=Tomato severe rugose virus; ToCV=Tomato chlorosis virus; TSWV=Tomato spotted wilt orthotospovirus; GRSV=Groundnut ringspot orthotospovirus.

²Mecânica: principalmente por contato entre plantas.

³SRTI=sem relatos de transmissão por insetos.

mostrados nas figuras são resultantes de infecção viral simples da planta (presença de apenas uma espécie de vírus) (Figuras 1, 3, 4, 5 e 6) ou infecção

mista (envolvimento de dois ou mais vírus causando a doença) (Figura 2) em condições de campo aberto.

Foto: Mirtes F. Lima



Figura 1. Sintomas induzidos por *Potato virus Y* em plantas de batata, mediante infecção natural em campo. Plantas com sintomas de mosaico e enrugamento em folíolos.



Foto: Mirtes F. Lima

Figura 2. Sintomas de infecção múltipla causados por *Potato virus Y*, *Potato virus X* e *Potato virus S* em batata, sob infecção natural. Plantas com sintomas de mosaico intenso e rugosidade severa nas folhas e redução do tamanho dos folíolos.



Foto: Acervo Embrapa Hortaliças

Figura 3. Sintomas de infecção causados por *Potato leafroll virus* (PLRV) em batata no campo. Plantas com sintomas de enrolamento nos folíolos.



Figura 4. Sintomas de infecção induzidos por *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em batata naturalmente infectada em condições de campo. Sintomas de mosaico amarelo, clorose internerval e deformação em folíolos.



Figura 5. Sintomas de infecção causada por *Tomato chlorosis virus* (ToCV) em batateira naturalmente infectada. Sintomas de clorose internerval e enrugamento em folíolos.



Figura 6. Sintomas de infecção causada por *Groundnut ringspot orthotospovirus* (GRSV) em folíolos de batateira, sob infecção natural em campo. Sintomas de (A) anéis necróticos, (B) manchas necróticas e coalescimento de lesões em folíolos.

Diagnose e indexação viral

O desenvolvimento de técnicas para detecção de vírus em plantas tem propiciado rapidez e precisão na sua correta identificação. Em batata, a diagnose com a identificação viral, tanto em trabalhos de monitoramento / levantamento de vírus quanto em programas de indexação em sistemas de produção de batata-semente é realizada com base em observações

feitas em plantas no campo, e também em tubérculos sementes amostrados no galpão, portanto depois de colhidos. No caso da produção de tubérculos sementes, as inspeções de campo são feitas para verificar a presença de sintomas nas plantas, quando ainda é possível efetuar a retirada das plantas infectadas com vírus (*roguing*), e caso o responsável técnico tenha alguma dúvida pode coletar amostras foliares para análise (testes sorológicos; testes moleculares específicos) em laboratórios equipados e com pessoal treinado. A amostragem para a emissão do boletim de análises oficial é feita pelo responsável técnico nos lotes de tubérculos sementes colhidos, portanto normalmente ainda no galpão do produtor, e essa análise/boletim, só pode ser realizada por laboratório oficialmente registrado no MAPA. Na legislação vigente para batata-semente, Instrução Normativa número 32 de 2012 (BRASIL, 2012), apenas os vírus PVX, PVY, PLRV e PVS estão contemplados.

As técnicas de identificação de vírus mais utilizadas na diagnose e na indexação são: (a) observação da presença de sintomas nas plantas em inspeções visuais; (b) utilização de testes biológicos com a inoculação em plantas indicadoras por meio de transmissão mecânica, enxertia ou ainda com o emprego de vetores; (c) testes sorológicos e, (d) testes moleculares. Entretanto, a utilização das diversas técnicas de

detecção, concomitantemente, constitui o procedimento mais recomendado, pois assegura a obtenção de resultados mais robustos e conclusivos na diagnose e indexação viral.

Sintomatologia

A dificuldade em reconhecer sintomas induzidos por vírus em plantas de batata foi apontada por Cupertino e Costa (1968), entre outros, como um dos fatores que podem influenciar o aumento das doenças causadas por vírus após diversas multiplicações de tubérculos-semente. Isto ocorre por que vários fatores podem afetar a expressão de sintomas em plantas infectadas dificultando não apenas o seu reconhecimento, mas também, limitando a possibilidade da utilização dos sintomas na diagnose da doença em avaliações de campo.

A sintomatologia verificada em plantas doentes pode ser complexa, quando se considera, por exemplo, que a planta pode estar infectada por mais de uma espécie de vírus ou mesmo por estirpes diferentes do mesmo vírus (infecção mista ou infecção múltipla) (Figura 2). Isto dificulta as avaliações de plantas em campo, visando à identificação de plantas doentes, mesmo para aquelas com infecção simples (apenas um vírus) (Figuras 1, 3, 4, 5 e 6).

De acordo com Naidu e Huges (2003), a avaliação de sintomas em campo pode

ser facilitada quando as plantas infectadas exibem sintomas característicos de uma doença específica. Dessa forma, a presença de sintomas característicos da doença em infecção viral simples na planta, apesar de não ser suficiente, ajuda na diagnose. Entretanto, esta pode não ser uma situação comumente observada no campo, além de exigir treinamento do avaliador.

Os relatos de ocorrência de infecção mista ou múltipla são muito frequentes em batata, envolvendo principalmente PVY, PLRV, PVX e PVS (SRINIVASAN; ALVAREZ, 2007; WANG *et al.*, 2011; NYALUGWE *et al.*, 2012; GHORAI *et al.*, 2018). Esta situação é favorecida com o plantio de tubérculos já infectados associado à eficiente transmissão (PVY; PRLV; PVS) no campo por afídeos. Beemster e Bokx (1987) relatam perdas de até 50% em lavouras de batata infectadas com PVX juntamente com PVY. Entretanto, quando em infecção simples, essas perdas situam-se na faixa de 10% a 20% para PVX e PVS, respectivamente (BURTON, 1989; KOJIMA; LAPIERRE, 1988) e de até 80% para infecção individual com PVY ou PLRV (PALUKAITES, 2012).

A indução de sintomas pouco evidentes na planta, mesmo em infecção simples, também pode dificultar o reconhecimento de plantas doentes, em avaliações de campo. É o caso de PVX, relatado como pouco frequente em áreas produtoras do

Brasil (SOUZA-DIAS, 1995; DANIELS, 1995; AVILA *et al.*, 2009). Quando somente PVX está presente infectando a planta, apenas sintomas suaves são observados na folhagem da planta infectada (PALUKAITIS, 2012) como mosaico, mosqueado e folíolos de menor tamanho. Entretanto, a importância do PVX em batata, aumenta quando o vírus está presente em infecção mista na planta com outros vírus, como, por exemplo, com PVY (SALAZAR, 1996; DRAPER *et al.*, 2002), induzindo sintomas mais severos como resultado do efeito sinérgico entre as duas espécies virais na infecção da planta (PALUKAITIS, 2012).

A ocorrência de infecção latente, quando a planta doente mostra-se assintomática, é comum em plantas infectadas com PVS ou PVX. Na maioria das cultivares de batata esses vírus podem induzir sintomas latentes (PALUKAITIS, 2012) e em apenas alguns casos, são percebidos sintomas suaves nas plantas. Assim, os sintomas podem passar despercebidos e, em não sendo observados em inspeções de campo, essas plantas infectadas com PVS ou PVX seriam equivocadamente consideradas como sadias, propiciando a disseminação do vírus quando tubérculos dessas plantas forem utilizados em plantios subsequentes.

Outro aspecto importante é a produção de sintomas similares por espécies virais distintas em plantas infectadas. Por

exemplo, as espécies de orthotospovírus que infectam batata no País, GRSV (LIMA *et al.*, 2017) e TSWV (COSTA; KIEL, 1938; SOUZA-DIAS *et al.*, 2015) causam sintomas muito semelhantes, não sendo possível diferenciar essas espécies virais apenas pela expressão de sintomas na planta (LIMA; MICHEREFF FILHO, 2015). A mesma situação ocorre com os begomovírus ToSRV e ToYVSV. Essas espécies induzem mosaico amarelo e deformação foliar em plantas de batata afetadas pelo mosaico deformante (DANIELS; CASTRO, 1985; LIMA *et al.*, 2011) (Figura 4).

Dessa forma, torna-se importante o emprego de testes específicos para confirmação da infecção viral na planta, considerando a importância limitada que os sintomas podem ter para a diagnose da doença. De fato, Bock (1982) já relatou há décadas que as inspeções visuais de plantas no campo devem ser realizadas paralelamente à utilização de técnicas de detecção que assegurem a precisão da diagnose da infecção viral. A seguir, serão descritos os testes mais utilizados para detecção de vírus em batata.

Testes biológicos

Os testes biológicos (transmissão mecânica; transmissão por enxertia; transmissão por meio de vetores) são tradicionalmente utilizados na caracterização de vírus de plantas e são essenciais na complementação da

diagnose, caso seja necessário, pela sua relevância e eficiência.

Na realização desses testes é utilizado um grupo de plantas conhecidas como plantas indicadoras. São espécies herbáceas que quando inoculadas com determinadas espécies virais, reagem à inoculação com manifestação de sintomas característicos. Entre os métodos biológicos utilizados na indexação, a transmissão mecânica, pela facilidade de execução, é considerada a mais simples e pode ser empregada para a maioria dos principais vírus que infectam a batata (PVY; PVX; PVS; GRSV; TSWV).

A inoculação mecânica consiste em: (a) aplicação de abrasivo (carborundum ou celite) nas folhas da planta indicadora que vai receber o inóculo (extrato da planta infectada); (b) preparo do extrato a ser utilizado na inoculação pela maceração de tecido vegetal da planta a ser testada em tampão de inoculação (ex. tampão fosfato); (d) aplicação do extrato, obtido da planta a ser testada, nas folhas da planta indicadora com cotonete e (e) enxágue das folhas inoculadas com água (JAYASINGHE; CHUQUILLANQUI, 1992). A função do abrasivo é produzir pequenos ferimentos no tecido vegetal, propiciando a penetração das partículas de vírus na planta indicadora. As plantas inoculadas devem permanecer em casa de vegetação até a avaliação. Quando houver transmissão do vírus

para a planta indicadora haverá desenvolvimento de sintomas típicos que podem ser observados em cerca de 10-15 dias após a inoculação (Figura 7).

Para os vírus que não são transmitidos mecanicamente, outros métodos podem ser utilizados, com o emprego de vetores ou enxertia (união de tecidos) em plantas hospedeiras indicadoras (FRIDLUND, 1980). Para as espécies PLRV, ToCV e ToSRV, sintomas não são produzidos nas espécies indicadoras pois estes vírus não são transmitidos mecanicamente (Tabela 2). As espécies virais anteriormente citadas são restritas ao floema (PETER *et al.*, 2008; WISLER *et al.*, 1998; CZOSNEK *et al.*, 2017). Entretanto, no caso de ToYVSV, há relato de transmissão mecânica (COLARICCIO *et al.*, 2007). A transmissão desses vírus também pode ser realizada pelos seus respectivos insetos vetores: afídeos (PLRV) e mosca-branca (ToCV; ToSRV; ToYVSV).

Os vírus que infectam a batata podem ser transmitidos por enxertia e no emprego desse método, alguns cuidados são necessários. Jayasinghe e Chuquillanqui (1992) ressaltam que as espécies de plantas utilizadas como enxerto e porta-enxerto devem ser compatíveis e os sintomas produzidos na planta indicadora (porta-enxerto) devem ser sistêmicos. Mencionam também que as plantas indicadoras devem estar mais desenvolvidas se

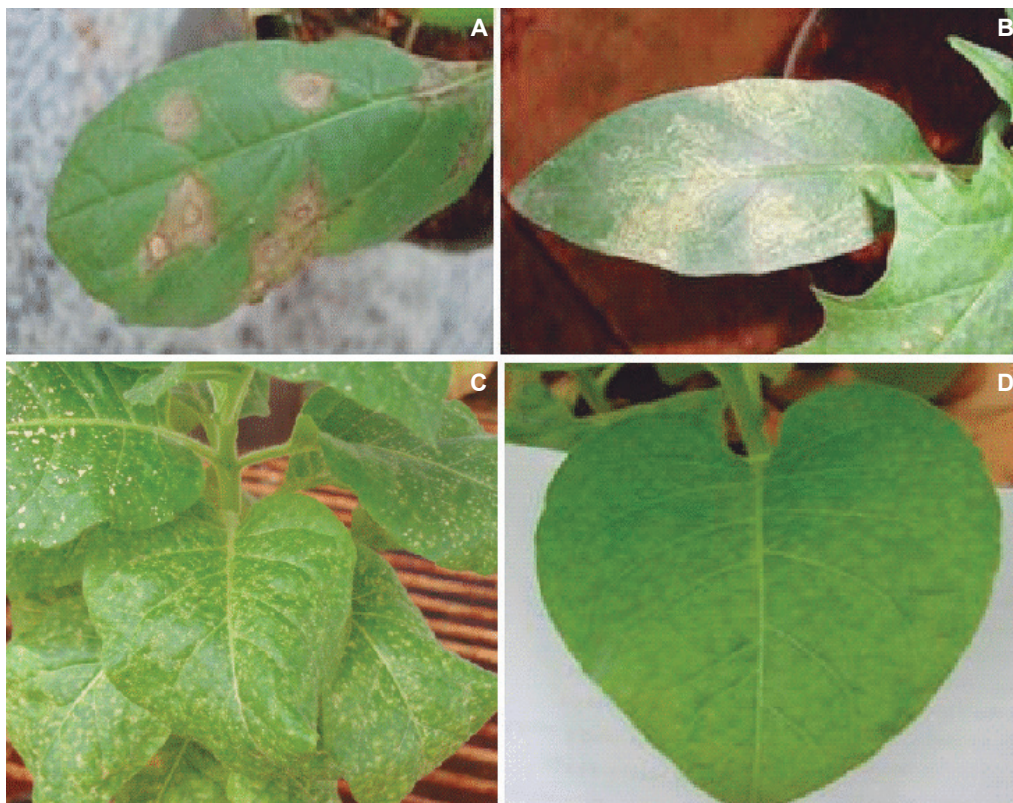


Figura 7. Indexação biológica: espécies indicadoras exibindo sintomas de infecção causada por *Groundnut ringspot orthotospovírus* (A, B) e por *Potato virus Y* (C, D) após inoculação mecânica. (A) Manchas necróticas em *Nicandra physaloides*; (B) anéis necróticos em *Datura stramonium*; (C) manchas necróticas e, (D) manchas em *Nicotiana tabacum* cv. TNN.

comparadas às plantas utilizadas na inoculação mecânica, considerando-se que a haste da indicadora deve estar robusta o suficiente para dar suporte ao enxerto.

Na Tabela 2 é apresentada uma lista de espécies de plantas indicadoras utilizadas na caracterização biológica dos principais vírus que infectam a batata no Brasil.

Testes sorológicos

A sorologia é um dos métodos mais usados na detecção de vírus em batata e o teste conhecido como ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) se tornou o mais empregado em análises dessa natureza (PETRUNAK *et al.*, 1991). A utilização do ELISA na área de Virologia Vegetal foi iniciada por Clark e

Tabela 2. Vírus, espécie de planta indicadora para indexação biológica, referência e método de transmissão dos principais vírus que infectam a batata no Brasil.

Vírus	Planta Indicadora	Referência	Método de transmissão		
			Mecânica	Enxertia	Vetor
Potato virus Y (PVY)	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. TNN	de Bokx (1981)			
	<i>N. benthamiana</i>	Jayasinghe; Chuquillanqui (1989)	X	X	X
	<i>N. debneyi</i>	Mackinnon; Bagnall (1972)			
	<i>N. occidentalis</i>	Bonierbale <i>et al.</i> (2010)			
Potato virus X (PVX)	<i>N. glutinosa</i>	Jayasinghe; Chuquillanqui (1989) Bonierbale <i>et al.</i> (2010)	X	X	-
	<i>N. debneyi</i>	Mackinnon; Bagnall (1972)			
	<i>Datura metel</i>	Singh (1969)			
Potato virus S (PVS)	<i>Chenopodium murale</i>	Jayasinghe; Chuquillanqui (1989)	X	X	X
	<i>D. stramonium</i>	Jayasinghe; Chuquillanqui (1989)			
	<i>N. debneyi</i>	Mackinnon; Bagnall (1972) Jayasinghe; Chuquillanqui (1989)			
Potato leafroll virus (PLRV)	<i>Physalis floridana</i>	Jayasinghe; Chuquillanqui (1989) Syller (1996); Kirkpatrick (1948)	-	X	X
	<i>D. stramonium</i>	Jayasinghe; Chuquillanqui (1989) Kirkpatrick (1948); Syller (1996)			
Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV)	<i>D. stramonium</i> <i>N. tabacum</i> cv. TNN <i>C. amaranticolor</i>	Firmino <i>et al.</i> (2009)	-*	X	X
	<i>N. benthamiana</i> <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Viradoro	Albuquerque <i>et al.</i> (2010)			
Tomato severe rugose virus (ToSRV)	<i>Nicandra physaloides</i> <i>S. lycopersicum</i>	Barbosa <i>et al.</i> (2011) Macêdo <i>et al.</i> (2015)	-	X	X
	<i>D. stramonium</i> <i>C. album</i> <i>N. clevelandii</i> <i>N. tabacum</i> cv. TNN	Barbosa <i>et al.</i> (2011)			
	<i>N. clevelandii</i>	Wisler <i>et al.</i> (1998) Wintermantel; Wisler (2006)			
	<i>Physalis wrightii</i> <i>N. benthamiana</i>	Wintermantel; Wisler (2006)			
Tomato spotted wilt orthotospovirus (TSWV)	<i>Petunia hybrida</i>	Allen; Matteoni (1991)	X	X	X
	<i>N. tabacum</i>	Srinivasan <i>et al.</i> (2014)			
	<i>D. stramonium</i>	Bag <i>et al.</i> (2012)			
	<i>Capsicum chinense</i> 'PI159236' e 'PI 152225'	Black <i>et al.</i> (1991)			
Groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV)	<i>D. stramonium</i> <i>D. metel</i> <i>N. benthamiana</i> <i>N. debneyi</i> <i>N. glutinosa</i> <i>N. occidentalis</i> <i>N. rustica</i>	Webster <i>et al.</i> (2015)	X	X	X

(*) Há relato de transmissão mecânica de *Tomato yellow vein streak virus* (Colariccio *et al.*, 2007).

Adams (1977) e por ser de baixo custo e propiciar a avaliação de amostras em larga escala, passou a ser uma das técnicas mais empregadas em estudos de levantamentos de vírus e também em trabalhos de indexação. No teste são empregados anticorpos específicos que reconhecem determinadas proteínas, normalmente a proteína capsidial, que forma a partícula viral.

Há diversas variações do método ELISA; entretanto, essas variações estão classificadas em dois tipos principais: ELISA direto [*double antibody sandwich* (DAS)-ELISA] e ELISA indireto [*plate trapped antigen* (PTA)-ELISA; *triple antibody sandwich* (TAS)-ELISA; *protein A-sandwich* (PAS)-ELISA], cuja diferença reside no modo pelo qual o complexo antígeno-anticorpo é detectado (NAIDU; HUGHES, 2003). Na reação do teste ELISA, o antígeno é constituído por extrato obtido de tecido vegetal coletado da planta a ser testada, preparado pela maceração em tampão específico.

No tipo ELISA direto, o anticorpo (IgG) e o conjugado (IgG + enzima) utilizados na detecção do vírus são específicos. Entretanto, no ELISA indireto, apenas o anticorpo empregado na detecção do vírus (anticorpo primário) é específico. O conjugado (anticorpo secundário que também é associado a uma enzima) é produzido contra proteínas do animal no qual foi produzido o anticorpo primário

e, por isso, não reconhece o antígeno viral. Assim, se o anticorpo primário foi produzido em coelho, deve-se utilizar cabra ou rato na produção de anticorpo contra o coelho. Na reação, o anticorpo secundário vai se ligar ao anticorpo primário.

O tipo direto DAS-ELISA tem sido muito utilizado na detecção/identificação e caracterização viral (PVY; PLRV; PVS; PVX; GRSV; TSWV) em batata no Brasil (LIMA *et al.*, 2017; LIMA; SANTOS, 2016; SOUZA-DIAS *et al.*, 2015; AVILA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2005; DANIELS; PEREIRA, 2004; GUEDES, 2000). Para esses vírus, há antissoros disponíveis no mercado, o que facilita a indexação viral, principalmente, no caso de sua utilização em sistema de produção de mudas livres de vírus.

O teste DAS-ELISA é feito em placas de microtitulação de poliestireno e segue as seguintes etapas, intercaladas por períodos de incubação, descritas por Agrios (1997): (a) deposição do antissoro diluído em tampão nos poços da placa; (b) adição do antígeno (extrato de planta a ser testada, preparado em tampão); (c) deposição do conjugado (antissoro ligado a uma enzima); (d) etapa de revelação com adição do substrato a ser digerido pela enzima que encontra-se associada ao antissoro (=conjugado). Na primeira fase (a), o antissoro adere à superfície dos poços da placa de microtitulação e na sequência

(b), as partículas virais são capturadas pelo antissoro a partir do extrato da amostra quando esta está infectada. Entre cada duas etapas de incubação, os poços da placa são lavados três vezes com tampão. O resultado do ELISA (d) é monitorado pela reação colorimétrica da ação da enzima (c) sobre o substrato (d), indicando reação positiva (pela mudança de coloração de incolor para amarelo) e, nesse caso, que a amostra está infectada (d; Figura 8A). A avaliação da reação é feita em leitora de placas, que fornece valores de absorvância em filtro de 405 nm. A ausência de reação colorimétrica é um indicativo de que a amostra não está infectada com aquele vírus.

Outro método sorológico muito utilizado é o *Nitrocellulose Membrane* (NCM)-ELISA (ALMEIDA, 1995) que utiliza membrana de nitrocelulose ao invés de placas de microtitulação. O extrato das amostras é aplicado na membrana, que, posteriormente é submetida à reação de bloqueio que pode ser, por exemplo, em solução de leite desnatado, com o objetivo de bloquear os sítios da membrana não ocupados pelo extrato das amostras. Em sequência, aplica-se o antissoro (anticorpo primário) e em seguida, a membrana permanece no anticorpo secundário. Após cada etapa, a membrana é lavada três vezes em tampão. A revelação é feita em solução preparada com BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) e NBT (*Nitro blue tetrazolium*) que constituem

o substrato para a enzima (associada ao anticorpo secundário). Para as amostras infectadas com vírus, há a formação de manchas arroxeadas como resultado da formação de precipitado pela ação de reação enzimática sobre o BCIP e NBT (Figura 8B). O método tem sido empregado na detecção de vírus que infectam batata, como PVX e PVY (LIZARRAGA; FERNANDEZ-NORTHCOTE, 1989).

Na avaliação de clones elite de batata do Programa de Melhoramento da Embrapa, quanto à resistência ao PVY, são empregados os testes DAS-ELISA (Figura 8A) e NCM-ELISA (Figura 8B). Os experimentos são instalados em campo em três repetições de 10 plantas cada. As parcelas com os clones a serem testados (materiais livres de vírus) são intercaladas com tubérculos de cultivares espalhadoras (materiais suscetíveis e infectados com PVY). As avaliações são realizadas antes do florescimento das plantas, 50-55 dias após o plantio dos tubérculos.

Como exemplo do uso dessa técnica de detecção, resultados obtidos com a análise sorológica (DAS-ELISA) de amostras foliares de batata foram comparados àqueles obtidos por meio da inoculação mecânica em três espécies indicadoras (*Nicotiana tabacum* cv. TNN; *N. benthamiana*; *Datura stramonium*) nos testes de detecção de PVY. Foram empregadas 47 amostras de batateira

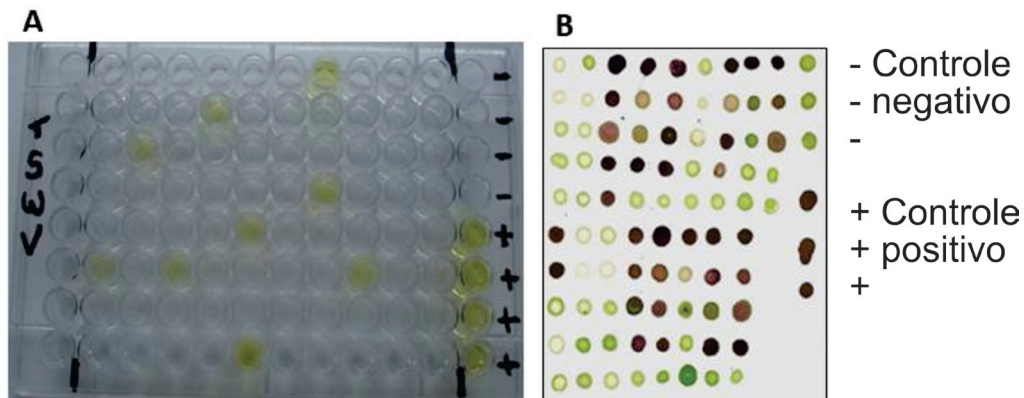


Figura 8. Métodos sorológicos de detecção de vírus em batata. (A) DAS-ELISA em placas de poliestireno: Poços com coloração amarela: reação positiva das amostras testadas com o antissoro contra TSWV; (+) controle positivo do vírus, extrato de planta infectada com TSWV; (-) controle negativo, extrato de planta sadia. (B) NCM-ELISA: manchas escuras na membrana, no local de deposição da amostra, representam reação positiva do extrato das amostras testadas com os anticorpos específicos contra PVY.

coletadas em lavouras do Município de Cristalina, Goiás e também na Estação Experimental da Embrapa Hortaliças, no período de 2012-2013 (BARRIOLLI; LIMA, 2013). A análise das amostras foi feita no Laboratório de Virologia e Biologia Molecular da Embrapa Hortaliças.

O extrato vegetal empregado no teste sorológico foi preparado pela maceração de tecido foliar em tampão 1X PBS, na proporção de 1:10 (p:v; g/ml). Antissoro policlonal (contra a proteína capsial do PVY) e conjugado (produzidos na Embrapa Hortaliças) foram usados na concentração de 1 mg/mL. Extratos de folhas de *N. tabacum* cv. TNN infectadas com PVY e de plantas sadias foram os controles positivo e negativo, respectivamente. A leitura da

absorbância foi em leitora de placas (Titertek Multiskan) no filtro 405 nm.

A inoculação mecânica em plantas indicadoras, previamente polvilhadas com carborundum, foi feita no estádio de quatro folhas verdadeiras, com extrato foliar preparado em tampão fosfato pH 7,0 e a avaliação de sintomas realizada 10-15 dias após a inoculação.

Verificou-se que 72,34% das amostras testadas foram positivas para PVY, em DAS-ELISA e a mesma porcentagem foi verificada com o teste biológico em plantas de *N. tabacum* cv. TNN (Tabela 3). Observaram-se sintomas em *N. tabacum* cv. TNN (34 amostras) e em *N. benthamiana* (30 amostras; a inoculação de quatro amostras –

Tabela 3. Análise sorológica de amostras de batata coletadas em Cristalina-GO e no Distrito Federal, utilizando antissoro contra PVY (em DAS-ELISA) e inoculação mecânica em hospedeiras indicadoras. Embrapa Hortaliças, 2012-2013.

Isolado do vírus (N°)	Idade Planta (dias)	Data coleta	Batata (Cultivar)	PVY ¹	Sintomas		
					N. <i>tabacum</i> cv. TNN	N. <i>benthamiana</i>	D. <i>stramonium</i>
Local de coleta: Cristalina, Goiás							
CNPH 27	43	2013	Cupido	+ ²	NN ³	Mo; DF	SS
CNPH 46	43	2013	Cupido	+	NN	Mo; DF	SS
CNPH 49	43	2013	Cupido	+	NN	Mo; DF	SS
CNPH 52	43	2013	Cupido	+	NN	Mo; DF	SS
CNPH 55	43	2013	Cupido	+	NN	Mo; DF	SS
CNPH 59	43	2013	Cupido	+	NN	Mo; DF	SS
CNPH 64	43	2013	Cupido	+	NN	Mo; DF	SS
CNPH 65	43	2013	Cupido	+	NN	Mo; DF	SS
CNPH 66	43	2013	Cupido	+	CN; MP	Mo; DF	SS
CNPH 68	43	2013	Cupido	+	NN	Mo; DF	SS
CNPH 70	43	2013	Cupido	+	NN	Mo; DF	SS
CNPH 71	43	2013	Cupido	+	NN	Mo; DF	SS
CNPH 21	43	2013	Cupido	-	SS	SS	SS
CNPH 28	43	2013	Cupido	-	SS	SS	SS
CNPH 30	43	2013	Cupido	-	SS	SS	SS
CNPH 47	43	2013	Cupido	-	SS	SS	SS
CNPH 60	43	2013	Cupido	-	SS	SS	SS
Local de coleta: Gama, Distrito Federal							
CNPH 1	55	2012	Asterix	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 2	55	2012	Asterix	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 3	55	2012	Asterix	+	CN; MP	SS	SS
CNPH 4	55	2012	Asterix	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 5	50	2012	Binjje	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 6	60	2012	Agata	+	CN; MP	SS	SS
CNPH 7	60	2012	Agata	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 8	60	2012	Agata	+	NN	Mo;DF	SS
CNPH 9	55	2012	Asterix	+	NN	Mo;DF	SS
CNPH 10	55	2012	Asterix	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 11	50	2012	Monalisa	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 12	50	2012	Monalisa	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 13	50	2012	Monalisa	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 14	50	2012	Monalisa	+	CN; MP	SS	SS
CNPH 15	50	2012	Monalisa	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 16	50	2012	Monalisa	+	NN	Mo;DF	SS
CNPH 17	50	2012	Monalisa	+	NN	Mo;DF	SS
CNPH 18	50	2012	Monalisa	+	NN	SS	SS
CNPH 19	55	2012	Asterix	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 20	55	2012	Asterix	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 21	50	2012	Monalisa	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 30	60	2012	Agata	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 23	50	2012	RM9823-05	-	SS	SS	SS
CNPH 24	50	2012	RM9823-05	-	SS	SS	SS
CNPH 25	50	2012	RM9823-05	-	SS	SS	SS
CNPH 26	50	2012	RM9823-05	-	SS	SS	SS
CNPH 27	50	2012	RM9823-05	-	SS	SS	SS
CNPH 28	50	2012	RM9823-05	-	SS	SS	SS
CNPH 29	50	2012	RM9823-05	-	SS	SS	SS

¹ PVY= *Potato virus Y*;

² Resultados do teste sorológico DAS-ELISA: (+)= amostra positiva; (-)=amostra negativa.

³ NN=necrose das nervuras; Mo=mosaico; DF=deformação foliar; SS=sem sintomas; CN=clareamento de nervuras; MP=manchas peroladas.

CHPH-3; CHPH-6; CHPH-14; CHPH-18; não resultou na expressão de sintomas, o que pode ser atribuído a escape), entretanto, nenhum sintoma foi verificado em *D. stramonium*. Esta última indicadora é relatada como imune a PVY (de BOKX, 1981) e foi utilizada como testemunha. Dezesesseis isolados de PVY induziram sintomas de necrose das nervuras (estirpe necrótica=PVY^N) e 18 isolados causaram clareamento de nervuras e manchas peroladas (estirpe O= PVY^O) em plantas de *N. tabacum* cv. TNN. Essa espécie é uma das indicadoras recomendadas na caracterização de estirpes de PVY (de BOKX, 1981), pois produz sintomas diferenciados segundo a estirpe de PVY inoculada. Esses resultados indicam a importância do emprego de mais de uma técnica na análise das amostras e também a sensibilidade de ambos os métodos na detecção de PVY.

Há também outros tipos de testes sorológicos que podem ser utilizados na detecção de vírus, mas a sua utilização é mais recomendada em estudos de caracterização viral, como, por exemplo, Western blot, um método imunoeletroforético empregado na caracterização de proteínas virais (HAMMOND, 1993) que são obtidas de plantas infectadas.

Métodos Moleculares

A detecção, assim como a identificação de vírus, foi aprimorada a partir da

utilização de métodos moleculares (VALKONEN, 2007) que se baseiam na detecção do ácido nucleico – RNA ou DNA. Entre esses, a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) (MULLIS *et al.*, 1986) destaca-se como a técnica mais utilizada na detecção de vírus de plantas.

A PCR é utilizada para a identificação dos vírus que infectam a batata (Tabela 1). Para PLRV, PVX, PVS, PVY, ToCV, GRSV e TSWV que possuem RNA como material genético, a PCR é precedida da etapa de transcrição reversa (RT) para a síntese do DNA complementar (cDNA). Isto é feito a partir do RNA total extraído da amostra vegetal, que é utilizado como molde na reação. Para as demais espécies virais, ToSRV e ToYVSV, realiza-se a PCR partindo-se do DNA total extraído da planta (DELLAPORTA *et al.*, 1983).

A reação torna possível a detecção e amplificação do material genético do vírus por meio da utilização de oligonucleotídeos (*primers*), reagentes específicos e as enzimas transcriptase reversa (RT) e Taq DNA Polimerase (PCR). Para detecção dos vírus que infectam a batateira, há sequências de oligonucleotídeos disponíveis na literatura para PVY (WEILGUNY; SINGH, 1998), GRSV (WEBSTER *et al.*, 2011), TSWV (ADKINS; ROSSKOPF, 2002), ToCV (DOVAS *et al.*, 2002), ToSRV e ToYVSV (FERNANDES *et*

al., 2010; ROJAS *et al.*, 1993), PVS e PVX (NIE; SINGH, 2000). Entretanto, oligonucleotídeos para a detecção desses vírus também podem ser desenhados tomando-se como base as sequências de nucleotídeos disponíveis em bancos públicos de dados.

A reação é incubada em aparelhos termocicladores que são programados para executar tanto a RT como a PCR em múltiplos ciclos. Ao final da programação, a análise dos produtos da reação ocorre por eletroforese em gel de agarose, que posteriormente é corado em solução de brometo de etídeo, reagente que se intercala entre as fitas de DNA e facilita a visualização

dos resultados pois é fluorescente quando exposto à luz ultravioleta. Como resultado da reação, é obtida a amplificação do fragmento de DNA do genoma do vírus compreendido entre os dois oligonucleotídeos utilizados na reação (Figura 9).

A grande vantagem da RT-PCR é a sensibilidade da técnica, sendo possível detectar o vírus mesmo que esteja presente em baixas concentrações na planta. Entretanto, na ausência de amplificação de fragmentos de DNA, indica, entre outros fatores, que o título viral pode estar muito baixo, a técnica empregada não foi capaz de detectar, ou então, a amostra não está

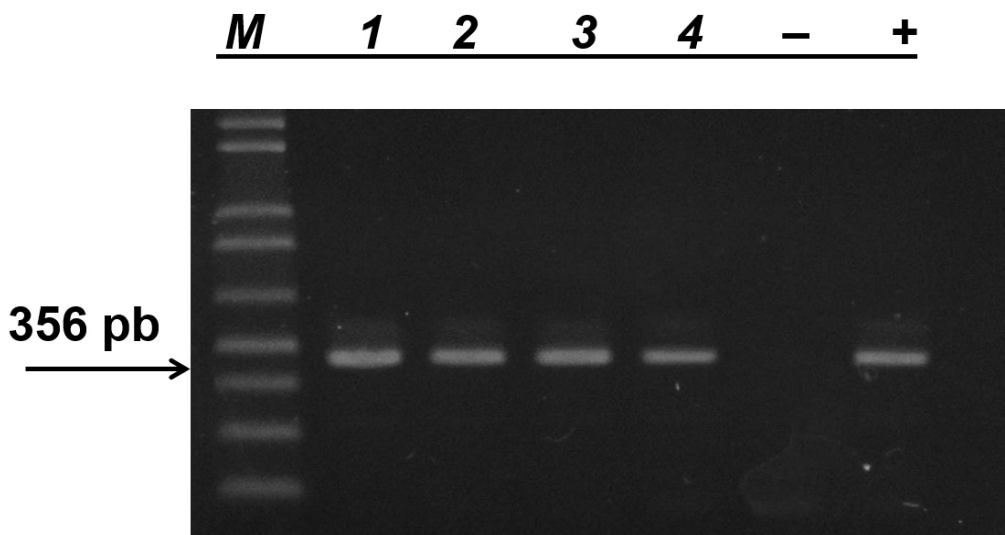


Figura 9. Análise em gel de agarose 1,2% de produtos da RT-PCR realizada utilizando-se RNA total extraído de planta de batata infectada com *Tomato chlorosis virus* (ToCV). Linhas de 1-4= amostras positivas para ToCV; (-) controle negativo, RNA total de planta sadia; (+) controle positivo do vírus; M= marcador 1kb DNA Ladder Plus.

especificamente infectada com o vírus para o qual os oligonucleotídeos foram empregados.

A RT-PCR tem sido muito utilizada na detecção e caracterização de vírus em batata (FONSECA *et al.*, 2005; AVILA *et al.*, 2009; GIL *et al.*, 2013), na confirmação de resultados obtidos apenas por meio de sorologia, ou ainda, quando não há antissoros disponíveis que possam ser utilizados na detecção de determinadas espécies virais. Nesse caso, devido a dificuldades relacionadas à produção de antissoros, as técnicas RT-PCR (detecção de ToCV) e PCR [detecção de begomovírus como ToSRV (FIRMINO *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2018) e ToYVSV (ALBUQUERQUE *et al.*, 2010; BARBOSA *et al.*, 2011; MACÊDO *et al.*, 2015)] têm sido empregadas com sucesso.

Há ainda outros métodos moleculares que, entretanto, não são rotineiramente empregados na detecção de vírus em batata, mas que, eventualmente podem ser utilizados para esse fim. Por isso, serão apenas brevemente discutidos nesta publicação: sequenciamento, *Next generation sequencing* (NGS), hibridização, RT-PCR quantitativo.

Sequenciamento: o fragmento de DNA que é obtido por amplificação por meio da RT-PCR ou PCR utilizando oligonucleotídeos e RNA total ou DNA total como molde pode ser sequenciado.

O produto da reação é purificado, após a análise desse produto por eletroforese em gel de agarose para visualização (sob luz ultravioleta) do fragmento de DNA do tamanho esperado. Alternativamente, o fragmento de DNA pode ser excisado do gel e purificado com o auxílio de kits. O produto dessa purificação contendo o fragmento de DNA é sequenciado utilizando os oligonucleotídeos (senso e anti-senso) empregados inicialmente na sua amplificação. O fragmento pode também ser clonado em plasmídeo vetor e, então, sequenciado (Sambrook *et al.*, 1989). As informações obtidas com o sequenciamento de fragmentos ou mesmo de todo o genoma do vírus são importantes na realização de estudos de variabilidade do patógeno.

NGS: a introdução da tecnologia conhecida como *Next generation sequencing* (Sequenciamento de Nova Geração - NGS) propiciou o rápido aumento da descoberta de novas espécies virais. O NGS começou a ser utilizado na detecção de vírus de plantas em 2009 (ADAMS *et al.*, 2009; Al RWAHNIH *et al.*, 2009; KREUZE *et al.*, 2009). O método propicia uma abordagem genérica (não específica) para a identificação de vírus para o qual não é necessário ter conhecimento prévio do patógeno alvo; entretanto, sua utilização pode fornecer resultados específicos das espécies presentes na amostra analisada (ADAMS; FOX,

2016). A utilização da técnica propicia rapidez na obtenção dos resultados, automatização e alto rendimento, com a obtenção de muitas sequências (*reads*) de uma única vez em que o método é utilizado. Essas sequências serão posteriormente analisadas para a identificação do patógeno.

Hibridização: as técnicas de hibridização são baseadas na capacidade de sequências de ácidos nucleicos (RNA; DNA), fita simples e complementares, hibridizarem sob determinadas condições (KARJALAINEN *et al.*, 1987). Essa interação específica entre bases complementares resulta em um híbrido estável formado pela sequência do ácido nucleico do patógeno (vírus) a ser detectado (molécula alvo) e a sequência complementar (sonda) (PALLAS *et al.*, 2011). A hibridização propicia a detecção de RNA (*Northern blot*) ou DNA (*Southern blot*). O ácido nucleico ou o extrato da planta é aplicado, geralmente em membrana de nitrocelulose ou de *nylon*, que é posteriormente incubada em tampão específico contendo a sonda. É uma técnica extremamente sensível e capaz de detectar ácidos nucleicos virais que estejam presentes na planta em concentrações muito baixas.

RT-PCR quantitativo (RT-PCR em tempo real): o método possui como principal característica a detecção da amplificação do DNA em tempo real, ou seja, na medida em que a RT-PCR

ocorre. Essa detecção é mediada por uma molécula repórter fluorescente, de modo que a fluorescência do repórter estará diretamente relacionada ao número de cópias amplificadas (JIA, 2012). Os dois sistemas de detecção mais utilizados na RT-PCR em tempo real são SYBR Green e TaqMan (TAJADINI *et al.*, 2014). O primeiro não é tão oneroso, sendo baseado na associação do corante fluorescente à molécula de DNA de fita dupla, na reação, enquanto que o segundo método (a sonda por hidrólise) é mais caro e é baseado em oligonucleotídeo marcado nas duas extremidades (fluoróforo repórter na extremidade 5' e uma molécula silenciadora – *quencher*, na extremidade 3'). A técnica propicia elevada sensibilidade, maior velocidade, além de reprodutibilidade e risco limitado de contaminação quando comparada à reação da RT-PCR convencional (OSMAN *et al.*, 2014; 2016). Apesar das vantagens do RT-PCR quantitativo, a sua adoção em laboratório requer investimento em equipamento específico, reagentes e capacitação de recursos humanos.

Considerações finais

Com o desenvolvimento das áreas da Virologia Molecular e da Biotecnologia, diversas técnicas para a detecção de vírus em plantas têm sido desenvolvidas, o que tem propiciado

a sua utilização não apenas em detecção, mas também na identificação e caracterização viral. A precisão, a sensibilidade e a especificidade dessas técnicas permitem o seu emprego com segurança na realização de uma diagnose precisa, demonstrando sua extensa aplicabilidade. A indexação de vírus em batata é um trabalho que requer a utilização de técnicas de rápida aplicabilidade, pouco onerosas, sensíveis e que propiciem a geração de resultados consistentes. Neste contexto, os testes sorológicos se apresentam como um dos métodos mais adequados a serem empregados em testes de detecção de PVY, PLRV, PVX e PVS. Entretanto, para outros vírus que infectam a batata como ToCV, ToSRV e ToYVSV, para os quais não há antissoros que possam ser utilizados, a RT-PCR e a PCR são métodos altamente eficazes e que podem ser empregados na sua identificação. Eventualmente, outras técnicas também podem ser empregadas em testes de detecção, a depender dos objetivos da investigação. Porém, vale ressaltar que a utilização de mais de um método na detecção viral é importante na diagnose, visando à geração de informações para uma diagnose acurada e que servirão de suporte à definição de estratégias de controle.

Referências

- ADAMS, I. P.; GLOVER, R. H.; MONGER, W. A.; MUMFORD, R.; JACKEVICIENE, E.; NAVALINSKIENE, M.; SAMUITIENE, M.; BOONHAM, N. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. **Molecular Plant Pathology** v.10, p.537–545, 2009. doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00545-x.
- ADKINS, S.; ROSSKOPF, E.N. Key West nightshade, a new experimental host for plant viruses. **Plant Disease**, v.86, p. 1310–1314. 2002.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 4th ed. Academic Press. San Diego. 1997. 635 p.
- ALBUQUERQUE, L. C.; MARTIN, D. P.; ÁVILA, A. C.; INOUE-NAGATA, A. K. Characterization of Tomato yellow vein streak virus, a begomovirus from Brazil. **Virus Genes**, v. 40, p.140–147, 2010.
- ALLEN, W. R.; MATTEONI, J. A. Petunia as an indicator plant for use by growers to monitor for thrips carrying the tomato spotted wilt virus in greenhouses. **Plant Disease**, v.75, p.78-82, 1991.
- ALMEIDA, A. M. R. **Noções de Sorologia Aplicadas a Fitovirologia**. Londrina-PR: Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo). 1995. 105 pp.
- AI RWAHNIH, M., DAUBERT, S., GOLINO, D., ROWHANI, A. Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. **Virology**, v.387, p.395–401, 2009. doi: 10.1016/j.virol.2009.02.028.
- AVILA, A. C.; MELO, P. E.; LEITE, L. R.; INOUE-NAGATA, A. K. Ocorrência de vírus em batata em sete estados do Brasil. **Horticultura Brasileira**, v.27, n.4, p.490-497, 2009.
- BAG, S.; MITTER, N.; EID, S.; PAPPU, H.R. Complementation between two tospoviruses facilitates the systemic movement of a plant virus silencing suppressor in an otherwise restrictive host. **PLoS ONE**. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0044803>, 2012.

- BARBOSA, J. C.; BARRETO, S. D.; INOUE-NAGATA, A. K.; REZENDE, J. A. M. Characterization and experimental host range of a Brazilian tomato isolate of *Tomato severe rugose virus*. **Journal of Phytopathology**, v.159, p.644-646, 2011.
- BARRIOLLI, C.; LIMA, M. F. Comparação dos métodos sorológico e biológico na detecção de Potato virus Y (PVY). In: **Jornada Científica da Embrapa Hortaliças**. 10-11 de junho, 2013. Embrapa Hortaliças: Brasília-DF. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/974907/1/COMPARACAO_DOSMETODOSSOROLOGICOE_BIOLOGICONADETECCAODE.pdf> Acesso em: 20 ago. 2018.
- BEEEMSTER, A. B. R.; BOKX, J. A. Survey of properties and symptoms. In: BOKX, J. A. de; WANT, J. P. H. van der (Ed.). **Viruses of potato and seed potato production**. 2. ed. Wageningen: Pudoc, 1987. p. 84-113.
- BLACK, L.L.; HOBBS, H.A.; QATTI, J. M. Jr. *Tomato spotted wilt virus* resistance in *Capsicum chinense* PI 152225 and PI 159236. **Plant Disease**, v.75, p. 863, 1991.
- BOCK, K.R. The identification and partial characterization of plant viruses in the tropics. **Tropical Pest Management**, v.28, p. 399-411, 1982.
- BONIERBALE, M.W.; HAAN, S. de; FORBES, A.; BASTOS, C. (Ed.). **Procedimientos para pruebas de evaluación estándar de clones avanzados de papa**: Guía para cooperadores internacionales. Lima (Peru). Centro Internacional de la Papa (CIP). 2010. 151 p.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 32 / MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 20 de novembro 2012.
- BURTON, W. G. **The Potato**. 3rd Edition. Longman, Harlow, UK. 1989.
- CEPEA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - **CEPEA-Esalq/USP**. In: Revista Hortifruti, n. 205, p. 17-27, 2020. Disponível em: < <https://www.hfbrasil.org.br/revista/acessar/completo/bataticultura-se-capitaliza-em-plena-pandemia.aspx>> Acesso em: 12 nov. 2020.
- 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**, v.34, p. 475-483, 1977.
- COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; CHAVES, A.; BERGMANN, J.; ZERBINI, F.; HAKAKAVA, R.; CHAGAS, C. Tomato yellow vein streak virus, a new begomovirus on tomato from Brazil: Complete DNA-A sequence and some molecular and biological features. **Journal of Plant Pathology**, v. 89, n. 3, p. 385-390, 2007.
- COSTA, A. S.; KIEL, J. Uma moléstia da batatinha 'Necrose do Topo' causada pelo vírus do 'Viracabeça'. **Jornal de Agronomia de São Paulo**, v.1, p.193-202, 1938.
- CROMME, N.; PRAKASH, A.B.; LUTALADIO, N.; EZETA, F. (Ed.) **Strengthening Potato Value Chains**: Technical and Policy Options for Developing Countries. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and the Common Fund for Commodities (CFC), 2010. 149p.
- CUPERTINO, F. P.; COSTA, A. S. Enrolamento apical da batata, sintoma da estação corrente do vírus do enrolamento. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v. 2, p. 75-80, 1968.
- CUPERTINO, F. P.; COSTA, A. S. Determinação da disseminação do vírus do enrolamento em batata para semente pelo uso de plantas indicadoras. **Bragantia**, v. 29, p.122-137, 1970.
- CZOSNEK, H.; HARITON-SHALEV, A.; SOBOL, I.; GOROVITS, R.; GHANIM, M. **The Incredible Journey of Begomoviruses in Their Whitefly Vector – Review**. **Viruses**, v.9, n.10, 273. 2017. <https://doi.org/10.3390/v9100273>
- de BOKX, J. A. Potato virus Y. In: Hooker W. J. (ed). **Compendium of Potato Diseases**. 1.ed. American Phytopathological Society. St. Paul, 1981. p.70-71.
- DANIELS, J. Víruses da batata e suas implicações na produção de batata semente no

- Rio Grande do Sul. **Summa Phytopatologica**, v. 21, n. 3-4, p. 269-270, 1995.
- DANIELS, J.; CASTRO, L.A.S. Ocorrência do vírus do mosaico deformante da batata no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v.10, p.306, 1985.
- DANIELS, J.; PEREIRA, A.S. Resistência de genótipos de batata ao vírus do enrolamento da folha da batata (PLRV) e ao vírus Y (PVY). **Horticultura Brasileira**, v.22, p. 521-524, 2004.
- DANIELS, J.; SILVA, A.C.F.; SOUZA, Z.S.; SCHONS, J. Degenerescência de batata-semente básica após um ou dois períodos de cultivo. **Horticultura Brasileira**, v. 20, p. 510-513, 2002.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Report**. v.1, p. 19-20, 1983.
- DOVAS, C. I.; KATIAS, N. I.; AVGELIS, A. D. Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of yellowing disease of tomato in Greece. **Plant Disease**, v. 86, p.1345-1349, 2002.
- DRAPER, M. D.; PASCHE, J. S.; GUDMESTAD, N. C. Factors influencing PVY development and disease expression in three potato cultivars. **American Journal of Potato Research**, v.79, p.155-165, 2002.
- FERNANDES, F. R.; ALBUQUERQUE, L. C.; INOUE-NAGATA, A. K. Development of a species-specific detection method for three Brazilian tomato begomoviruses. *Tropical Plant Pathology*, v.35, n.1, p.43-47, 2010.
- FIRMINO, A. F.; YUKI, V.; MOREIRA, A. G.; REZENDE, J. Tomato yellow vein streak virus: Relationship with Bemisia tabaci biotype B and host range. **Scientia Agricola**, v.66, p. 793-799, 2009.
- FONSECA, L.N.; INOUE-NAGATA, A.K.; NAGATA, T.; SINGH, R.P.; ÁVILA, A.C. Diferenciação de estirpes de *Potato virus Y* (PVY) por RT-PCR. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.4, p.904-910, 2005.
- FREITAS, D. M. S.; NARDIN, I.; SHIMOYAMA, N.; SOUZA-DIAS, J. A. C.; REZENDE, J. A. M. First report of Tomato chlorosis virus in potato in Brazil. **Plant Disease**, v. 96, p. 593-594, 2012.
- FRIDLUND, P.R. Glasshouse indexing for fruit tree viruses. **Acta Horticulturae**. v.94, p.153-158. 1980.
- GHORAI, A. K.; SHARMA, S.; SHARMA, A.; KANG, S. S. Prevalence of major potato viruses and aphid population dynamics in Punjab, India. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 6, p.1385-1389, 2018.
- GIL, J. F.; COTES, J. M.; MARÍN, M. Detección serológica y caracterización molecular de Potato virus S (PVS, Carlavirus) en cultivos de papa de Colombia. **Rev. Biol. Trop.** (Int. J. Trop. Biol.), v.61, p.565-575, 2013.
- GILDEMACHER, P. R.; DEMO, P.; BARKER I.; KAGUONGO, W.; WOLDEGIORGIS, G.; WAGOIRE, W.W.; WAKAHU, M.; LEEUWIS, C.; STRUIK, P.C. A description of seed potato systems in Kenya, Uganda and Ethiopia. **American Journal of Potato Research**, v. 86, p. 373-82, 2009.
- GUEDES, M. V.; Eficiência na detecção dos vírus PLRV, PVX e PVY em tecidos vegetais de gema apical dormente mais estolão, brotos e folhas da batata, pelo método sorológico *Enzyme-linked immunosorbent assay*-ELISA. **Scientia Agraria**, v.1, p. 75-82, 2000.
- HAMMOND, J. Western blotting and the use of membranes to adsorb antisera and to affinity purify antibodies. In: HAMPTON, R.; BALL, E.; de BOER, S. (Ed.). **Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A Laboratory Manual**. APS PRESS. St. Paul, IV.F.1, 269-279, 1993.
- JIA, Y. Real-Time PCR. In: CONN, P. M. (ed.). **Methods in Cell Biology: Laboratory Methods in Cell Biology**; Academic Press: Cambridge, MA, USA, Chapter 3 v. 112, pp. 55-68. 2012.
- KREUZE, J. siRNA deep sequencing and assembly: piecing together viral infections. In: GULLINOAND, M. L.; BONANTS, P. J. M. (eds.). **Detection and Diagnostics of Plant Pathogens**. Dordrecht: Springer, p.21-38. 2014.

HIRANO, E.; SILVA, G. O.; Batata-semente: busca pela autossuficiência e qualidade. **Informe Agropecuário**, v.33, p.14-19, 2012.

IBGE. Produção Agrícola Municipal - **Área plantada, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras temporárias** – 2018. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. - Rio de Janeiro: IBGE. 2019. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1612#resultado>>. Acesso em: 28 mar. de 2020.

IBGE. Produção Agrícola Municipal - **Área plantada, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras temporárias** – 2019. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. - Rio de Janeiro: IBGE. 2020. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/go/pesquisa/14/10233>>. Acesso em: 12 nov. 2020.

JAYASINGHE, U.; CHUQUILLANQUI, C. **Use of indicator plants for detection of potato viruses**. CIP Research Guide 21. International Potato Center, Lima, Peru. 1989. 29 pp.

JAYASINGHE, U.; CHUQUILLANQUI, C. **Uso de plantas indicadoras para la deteccion de vírus de papa**. Lima: CIP, 1992. 28p. (CIP. Guia de Investigacion, 21).

KARASEV, A. V.; GRAY, S. M. Continuous and emerging challenges of Potato virus Y in potato. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, p.571-586. 2013.

KARJALAINEN, R.; ROUHIAINEN, L.; SÖDERLUND, H. Diagnosis of plant viruses by nucleic acid hybridization. **Journal of Agricultural Science in Finland**, v.59, p.179-191, 1987.

KIRKPATRICK, H. C. Indicator plants for studies with the leafroll virus of potatoes. **American Potato Journal**, v.25, p.283-290, 1948.

KOJIMA, R.; LAPIERRE, H. Potato leafroll virus. In: SMITH, I. M.; DUNEZ, V.; PHILIPS, D. H.; LELIOT, R. A.; ARCHER, S. A. (Ed.) **European Handbook of Plant Diseases**. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1988. pp. 23-24.

LIMA, M.F.; INOUE-NAGATA, A.K.; RIBEIRO, S.G.; MELO, P.E.; LOPES, C.A. **Begomovirus infection in potato fields in Central Brazil**. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 22., Atibaia, SP: SBV, 2011. CD_ROM.

LIMA, M.F.; MICHEREFF FILHO, M. **Vira-cabeça do tomateiro**: sintomas, transmissão, epidemiologia e medidas de controle. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2015. 16 p. (Embrapa Hortaliças, Comunicado Técnico, 110). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/131429/1/COT-110.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2018.

LIMA, M. F.; MICHEREFF FILHO, M. **Alerta: vira-cabeça em batata**. Revista Batata Show, Ano 18, n. 50, p. 10-12, abr. 2018. Disponível em: <<http://www.abbabatatabrasileira.com.br/site/revista/edicao-50/>>. Acesso em: 18 set. 2018.

LIMA, M. F.; MICHEREFF FILHO, M.; BEZERRA, E. F. **Vira-cabeça em batata em campos de produção da Região Central do Brasil**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 50., 2017, Uberlândia, MG: SBF, 2017. CD_ROM.

LIMA, M. F.; NUNES, G. G.; MOREIRA, C. H. S. **Tomato severe rugose virus: a prevalent begomovirus species infecting potato in the central region of Brazil**. In: BRAZILIAN CONGRESS OF VIROLOGY, 29 & MERCOSUR MEETING OF VIROLOGY, 13., 2018, Pirenópolis, GO: SBV, 2018. Disponível em: <<http://consulteventos.com.br/virologia2018/wp-content/uploads/2018/10/Virologia-2018-Resumos.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2018.

LIMA, M.F.; SANTOS, D.I. **Potato infecting viruses in Brazil: a survey 2010-2015**. In: BRAZILIAN CONGRESS OF VIROLOGY, 27 & MERCOSUR MEETING OF VIROLOGY, 11., 2016, Pirenópolis, GO: SBV, 2016. p. 150-151.

LIMA, M. F.; MOREIRA, C.H.; SANTOS, A. B. C. **Groundnut ringspot virus em áreas produtoras de batata e detecção do vírus em tubérculos provenientes de plantas infectadas**. In: CONGRESSO LUSO-BRASILEIRO DE HORTICULTURA, 2. Goiânia-GO, Brasil: ISHS. 22-25/maio. 2019.

- LIZARRAGA, C.; FERNANDEZ-NORTHCOTE, E. N. 9. Detection of Potato viruses X and Y in sap extracts by a modified indirect enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (NCM-ELISA). **Plant Disease**, v. 73, p.11–14, 1969.
- MACÊDO, M.; MICHEREFF-FILHO, M.; NAVAS-CASTILLO, J.; INOUE-NAGATA, A. Host range and whitefly transmission efficiency of Tomato severe rugose virus and Tomato golden vein virus in tomato plants. **Tropical Plant Pathology**, v.40, p.405-409, 2015.
- MACKINNON, S. J. P.; BAGNALL, R. H. Use of *Nicotiana debneyi* to detect viruses S, X and Y in potato seed stocks and relative susceptibility of six common varieties to potato virus. **Potato Research**, v.15, p.81-85, 1972.
- MULLIS, K. F.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. **Quantitative Biology**, v.51, p.263–273, 1986.
- NAIDU, R. A.; HUGHES, J. D. A. Methods for the detection of plant virus diseases. In: **Proceedings of a Conference on Plant Virology in Sub Saharan Africa**, 4-8 June 2001, Ibadan, Nigeria. 2003. pp. 233-253.
- NIE, X. H.; SINGH, R. P. Detection of multiple potato viruses using an oligo(dT) as a common cDNA primer in multiplex RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.86, p.179-185, 2000.
- NYALUGWE, E. P.; WILSON, C. R.; COUTTS, B. A.; JONES, R. A. C. Biological properties of Potato virus X in potato: Effects of mixed infection with Potato virus S and resistance phenotypes in cultivars from three continents. **Plant Disease**, v.96, p.43-54, 2012.
- OSMAN, F.; AI RWAHNIH, M.; ROWHANI, A. Improved detection of ilarviruses and nepoviruses affecting fruit trees using quantitative RT-QPCR. **Journal of Plant Pathology**, v. 96, p.577–583, 2014.
- OSMAN, F.; AI RWAHNIH, M.; ROWHANI, A. Real-time RT-qPCR detection of cherry rasp leaf virus, cherry green ring mottle virus, cherry necrotic rusty mottle virus, cherry virus a and apple chlorotic leaf spot virus in stone fruits. **Journal of Plant Pathology**, v. 99, p. 279–285, 2016.
- PALLAS, V.; FAGGIOLI, F.; APARICO, F.; SANCHEZ-NAVARRO, J. A. Molecular Hybridization Techniques for Detecting and Studying Fruit Tree Viruses and Viroids. In: HADIDI, A.; BARBA, M.; CANDRESSE, T.; JELKMANN, W. **Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits**. Chapter 59. 2011. pp. 415-429. doi.org/10.1094/9780890545010.
- PALUKAITIS, P. Resistance to Viruses of Potato and their Vectors. **Plant Pathology Journal**, v.28, p. 248-258, 2012.
- PEREIRA, A. da SILVA; DANIELS, J. (Ed.) **O cultivo da batata na região Sul do Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 567 p.
- PETER, K.A.; LIANG, D.; PALUKAITIS, P.; GRAY, S.M. Small deletions in the potato leafroll virus readthrough protein affect particle morphology, aphid transmission, virus movement and accumulation. **Journal of General Virology**, v.89, p. 2037-2045, 2008.
- PETRUNAK, D. M.; GILDOW, F. E.; CHRIST, B. J. Incidence and distribution of six viruses infecting potatoes in Pennsylvania. **Plant Disease**, v.75, p. 644, 1991.
- RIBEIRO, S. G.; INOUE-NAGATA, A. K.; DANIELS, J.; AVILA, A. C. Potato deforming mosaic disease is caused by an isolate of *Tomato yellow streak virus*. **Plant Pathology**, v.55, p.569, 2006.
- ROJAS, M. R.; GILBERTSON, R. L.; RUSSEL, D. R.; MAXWELL, D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminivirus. **Plant Disease**, v. 77, p. 340-347, 1993.
- ROSS, H. **Potato Breeding - Problems and Prospects**. Advances in Plant Breeding 13. Paul Parey, Berlin and Hamburg. 1986.
- SALAZAR, L. F. **Potato Viruses and their Control**. Lima, Peru: International Potato Center. 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p.

SILVA, O. A.; FIGUEIRA, A. F.; BOARI, A. J.; PINTO, C. A. B. P.; BONI, R. R. Biological characterization of the PVX isolates (*Potato virus X*) from Brazil. **Ciência Agrotecnologia**, v. 29, p. 521-527, 2005.

SILVA, G. O. da; LOPES, C. A. (Ed.) **Sistema de produção da batata**. 2 Ed. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1028425>>. Acesso em: 21 out. 2018.

SINGH, R. Use of *Datura metel* L. as a local lesion host for potato virus X. **American Potato Journal**, v. 46, p. 355-357, 1969.

SOLOMON-BLACKBURN, R. N.; BARKER, H. Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a review of traditional and molecular approaches. **Heredity**, v.86, 17–35, 2001.

SOUZA-DIAS, J. A. C. Viroses da batata e suas implicações na produção de batata-semente no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.21, p. 264-266, 1995.

SOUZA-DIAS, J.A.C.; JEFFRIES, C.; REZENDE, J.A.M.; LIMA, M.F. A new virus threat to seed-potato certification in Brazil: the whitefly transmitted Tomato chlorosis virus (genus: Crinivirus). In: EAPR Pathology Section Meeting on Climate Change/Global Warming: Effects on Potato Diseases/Pests., 2013, Jerusalém, Israel: EAPR, 2013. **Potato Research**, v.57, p.165-166. Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11540-014-9258-0.pdf>>. Acesso em: 17 set. 2018.

SOUZA-DIAS, J. A. C.; MENARIM, E.; RENTZ, R.; KITAJIMA, E.W.; SAWASAKI, H. E.; DUARTE, M. **Batata-semente: sintomas e perpetuação de putativo tospovirus em batatais de São Paulo e Paraná** M. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 38., 2015. Botucatu, SP: SPF, 2015. **Summa Phytopathologica**, n.41 Suplemento. 2015. Disponível em: <<http://www.summanet.com.br/summanet-site/congressos/2015/trabalhos/036.htm>>. Acesso em: 20 ago. 2018.

SOUZA-DIAS, J. A. C. de; SAWASAKI, H.; PERNAMBUCO, P. C. A.; ELIAS, L. M. *Tomato severe rugose virus*: another begomovirus causing leaf deformation and mosaic symptoms on potato in Brazil. **Plant Disease**, v. 92, p. 487, 2008.

SOUZA-DIAS, J. A. C.; SAWASAKI, H. E.; SANTINI, A. **Plantio sucessivo de batata e tomate na região de Sumaré, SP favorece a presença do Tomato yellow vein streak geminivirus (ToYVSV) e da mosca branca vetora**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 36., 2003, Uberlândia, MG. Manejo integrado de doenças de plantas: [anais]. [S.l.]: SBF, 2003. CD_ROM.

SRINIVASAN, R.; ALVAREZ, J. M. Effect of mixed viral infections (potato virus Y-potato leafroll virus) on biology and preference of vectors *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae). **Journal of Economic Entomology**, v.100, p. 646-655, 2007.

SRINIVASAN, R.; RILEY, D.; DIFFIE, S.; SHRESTHA, A.; CULBREATH, A. Winter weeds as inoculum sources of tomato spotted wilt virus and as reservoirs for its vector, *Frankliniella fusca* (Thysanoptera: Thripidae) in farm scapes of Georgia. **Environmental Entomology**, v.43, p. 410-420, 2014.

SYLLER, J. Potato leafroll virus (PLRV): its transmission and control. **Integrated Pest Management Reviews**, v.1, p.217-227, 1996.

TAJADINI, M.; PANJEHPOUR, M.; JAVANMARD, S. H. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. **Advanced Biomedical Research**. 2014. Disponível em: <<http://www.advbiores.net>>. Acesso em: 01 nov. de 2020.

THOMAS-SHARMA, S.; ABDURAHMAN, A.; ALI, S.; ANDRADE-PIEDRA, J. L.; BAO, S.; CHARKOWSKI, A.; CROOK, D.; KADIAN, M.; KROMANN, P.; STRUIK, P. C.; TORQUEBIAU, E. F.; GARRETT, K. A.; FORBES, G. Seed degeneration in potato: the need for an integrated seed health strategy to mitigate the problem in developing countries. **Plant Pathology**, v. 65, p. 3-16, 2016.

VALKONEN, J. P. T. Viruses: economical losses and biotechnological potential. In: VREUGDENHIL, D. (Ed.). **Potato Biology and Biotechnology**. Elsevier, New York, NY, USA. 2007. pp.619-641.

WANG, B. A.; MA, Y. L.; ZHANG, Z. B.; WU, Z. M.; WU, Y. F.; WANG, Q. C.; LI, M. F. Potato viruses in China. **Crop Protection** v.30, p.1117–1123, 2011.

WEBSTER, C. G.; FRANTZ, G.; REITZ, S. R.; FUNDERBURK, J. E.; MELLINGER, H. C.; McAVOY, E.; TURECHEK, W. W.; MARSHALL, S. H.; TANTIWANICH, Y.; MCGRATH, M. T.; DAUGHTREY, M. L.; ADKINS, S. Emergence of *Groundnut ringspot virus* and *Tomato chlorotic spot virus* in vegetables in Florida and the southeastern United States. **Phytopathology**, v.105, p.388-398, 2015.

WEBSTER, C.; TURECHEK, W.; MELLINGER, H.; FRANTZ, G.; ROE, N.; YONCE, H.; VALLAD, G.; ADKINS, S. Expansion of *Groundnut ringspot virus* host and geographic ranges in solanaceous vegetables in peninsular Florida. **Plant Health**

Progress. 2011. doi: 10.1094/PHP-2011-0725-01-BR.

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

WINTERMANTEL, W. M.; WISLER, G. C. Vector specificity, host range, and genetic diversity of Tomato chlorosis virus. **Plant Disease**. v.90, p.814-819, 2006.

WISLER, G. C.; LI, R. H.; LIU, H.-Y.; LOWRY, D. S.; DUFFUS, J. E. Tomato chlorosis virus: A new whitefly-transmitted, phloem-limited, bipartite closterovirus of tomato. **Phytopathology**, v.88, p.402-409, 1998.

Exemplares desta publicação
podem ser adquiridos na:

Embrapa Hortaliças
Rodovia BR-060,
trecho Brasília-Anápolis, km 9
Caixa Postal 218
Brasília-DF
CEP 70.275-970
Fone: (61) 3385.9000
Fax: (61) 3556.5744
www.embrapa.br/fale-conosco/sac
www.embrapa.br

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Hortaliças

Presidente
Henrique Martins Gianvecchio Carvalho

Editora Técnica
Flávia M. V. T. Clemente

Secretária
Clidineia Inez do Nascimento

Membros
Geovani Bernardo Amaro
Lucimeire Pilon
Raphael Augusto de Castro e Melo
Carlos Alberto Lopes
Marçal Henrique Amici Jorge
Alexandre Augusto de Morais
Giovani Olegário da Silva
Francisco Herbeth Costa dos Santos
Caroline Jacome Costa
Iriani Rodrigues Maldonade
Francisco Vilela Resende
Italo Morais Rocha Guedes

Normalização Bibliográfica
Antonia Veras de Souza

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
André L. Garcia

Fotos da capa
Mirtes Freitas Lima



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



CGPE 017065