

LEVANTAMENTO DA DIVERSIDADE DE VÍRUS EM BATATA-DOCE NO CAMPO EXPERIMENTAL DA EMBRAPA HORTALIÇAS

Jamile Mendes de Souza¹; Karen Fernanda Oliveira e Silva¹; Fernanda Rausch Fernandes²

¹ Universidade Católica de Brasília, 71966-700, Brasília-DF; ² Embrapa Hortaliças, C. Postal 218, 70359-970 Brasília-DF; jamilemendes.s@gmail.com; karen_egk@hotmail.com; fernanda.rausch@embrapa.br.

RESUMO

A identificação das espécies de vírus que ocorrem em batata-doce no Brasil é de grande importância para o delineamento de estratégias de manejo das lavouras e para a indexação de matrizes nos programas de produção de batata-doce livres de vírus. O presente trabalho teve o objetivo de realizar um levantamento de vírus no Campo Experimental de Batata-doce da Embrapa Hortaliças. Foram amostrados 153 genótipos de batata-doce para a análise, que consistiu inicialmente na enxertia na planta indicadora *Ipomoea setosa* e posterior detecção viral pela técnica NCM-Elisa para dez vírus que infectam a batata-doce: *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV), *Sweet potato latent virus* (SPLV), *Sweet potato mild speckling virus* (SPMSV), *Sweet potato virus G* (SPVG), *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV), *Sweet potato chlorotic fleck virus* (SPCFV), *Sweet potato C-6 virus* (C-6), *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV), *Sweet potato collusive virus* (SPCV) e *Cucumber mosaic virus* (CMV). Oito antissoros foram adquiridos no Centro Internacional de la Papa (Lima, Peru) e os outros dois (para o SPFMV e CMV) foram produzidos na Embrapa Hortaliças. Infecções simples e mistas foram identificadas nas amostras submetidas à análise. Foram observadas plantas infectadas por apenas uma espécie de vírus (4,57%), duas (7,2%), três (4,57%), quatro (5,23%), cinco (11,8%), seis (11,11%), sete (9,15%), oito (15,03%), nove (13,72%) e dez espécies de vírus (17,64%).

PALAVRAS-CHAVE: *diagnose viral, batata-doce, indexação, vírus.*

ABSTRACT

Sweet potato virus survey on Embrapa Vegetables experimental field

The identification of virus species that occur in Brazil is of great importance for the design of management strategies for crops and for indexing arrays of sweet potato virus-free production programs. This work presents a survey of viruses in the experimental sweet potato field at Embrapa Vegetables. We sampled 153 genotypes of sweet potato for the analysis, which originally consisted of grafting on indicator plant *Ipomoea*

setosa and subsequent viral detection in NCM-ELISA for ten viruses infecting sweet potato: *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV), *Sweet potato latent virus* (SPLV), *Sweet potato mild speckling virus* (SPMSV), *Sweet potato virus G* (SPVG), *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV), *Sweet potato chlorotic fleck virus* (SPCFV), *Sweet potato C-6 virus* (C-6), *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV), *Sweet potato collusive virus* (SPCV) and *Cucumber mosaic virus* (CMV). Eight antisera were purchased from the Centre International de la Papa (Lima, Peru) and the other two (for SPFMV and CMV) were produced in Embrapa Vegetables. Simple and mixed infections were identified in the samples submitted for analysis. Infected plants were observed for only one species of virus (4.57%), two (7.2%), three (4.57%), four (5.23%), five (11.8%), six (11.11%), seven (9.15%), eight (15.03%), nine patients (13.72%) and ten species of viruses (17.64%).

Keywords: *viral diagnostics, sweet potato, indexing and virus*

INTRODUÇÃO

Mais de 30 vírus que infectam a cultura da batata-doce, distribuídos em nove famílias taxonômicas, foram identificados: *Bromoviridae* (1 vírus), *Bunyaviridae* (1), *Caulimoviridae* (3), *Closteroviridae* (1), *Comoviridae* (1), *Flexiviridae* (1), *Geminiviridae* (15), *Luteoviridae* (1), e *Potyviridae* (9). Metade deles são vírus de DNA recentemente descritos pertencentes às famílias *Geminiviridae* e *Caulimoviridae*. A maioria desses vírus está associada com infecções assintomáticas em batata-doce e, em alguns casos, até mesmo na planta indicadora *Ipomoea setosa*. Alguns são sinergizados pelo SPCSV, o mediador de doenças virais severas em batata-doce, enquanto outros aparentemente não são. A infecção simultânea de SPCSV e *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) caracterizam a doença SPVD (“Sweet potato virus disease”), responsável por perdas consideráveis na produção de batata-doce (Scheafers & Terry, 1976; Ngeve & Bouwkamp, 1991; Gibson et al., 1998; Valverde et al., 2007). Essa doença é caracterizada por clorose, deformação e diminuição do tamanho das folhas, além de enfezamento da planta, podendo reduzir a produtividade das plantas infectadas até 80% (Hahn, 1976; Mukiibi, 1977). A detecção rápida e precisa dos vírus é essencial para o seu correto manejo. No entanto, a diagnose dos vírus de batata-doce é dificultada devido à ocorrência de infecções mistas, diversas estirpes virais, e a distribuição desigual do vírus no interior da planta (Valverde et al., 2007; Clark et al., 2012). Devido

à grande variabilidade de sintomas em função do genótipo e idade da planta, condições ambientais e presença de complexos virais, os sintomas na batata-doce, inclusive a ausência de sintomas, têm pequeno valor no diagnóstico viral. Nos anos recentes, os vírus têm sido detectados por meio de uma combinação de ensaios sorológicos e baseados em ácido nucléico, mas em muitos casos, os títulos virais são tão baixos que esses métodos devem ser combinados com a enxertia prévia em *I. setosa* ou outros hospedeiros (Pozzer et al., 1995). Quando se promove a enxertia combinada com os métodos de detecção sorológica, verifica-se que a eficiência de detecção pode ser altamente incrementada. Os métodos sorológicos mais conhecidos, tais como o ELISA em membrana de nitrocelulose (NCM-Elisa) ou em microplaca são amplamente utilizados para a detecção de vírus de batata-doce. O CIP (Centro Internacional de La Papa, Lima – Peru) fornece um kit diagnóstico para a detecção sorológica de um número dos mais comuns vírus de RNA de batata-doce. O objetivo do presente trabalho foi realizar um levantamento de vírus no Campo Experimental de Batata-doce da Embrapa Hortaliças. Foram amostrados genótipos de batata-doce (variedades locais, cultivares e clones em fase de avaliação) para a análise, que constituiu inicialmente na enxertia na planta indicadora *Ipomoea setosa* e posterior detecção viral em NCM-Elisa para dez vírus que infectam a batata-doce: *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV), *Sweet potato latent virus* (SPLV), *Sweet potato mild speckling virus* (SPMSV), *Sweet potato virus G* (SPVG), *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV), *Sweet potato chlorotic fleck virus* (SPCFV), *Sweet potato C-6 virus* (C-6), *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV), *Sweet potato collusive virus* (SPCV) e *Cucumber mosaic virus* (CMV). A identificação das espécies de vírus que ocorrem no Brasil é de grande importância para o delineamento de estratégias de manejo das lavouras e para a indexação de matrizes de batata-doce nos programas de produção de batata-doce livres de vírus.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho de levantamento de vírus foi realizado no campo experimental da Embrapa Hortaliças. Um total de 153 genótipos - variedades locais, cultivares e clones em fase de avaliação - foram submetidos à detecção viral. Foram coletadas ramas de batata-doce com três nós e levadas para a casa-de-vegetação onde foi realizada a enxertia em *Ipomoea setosa*. Para tal, foram realizadas sementeiras da planta indicadora de modo

que houvesse a disponibilização de plantas em ponto de enxertia de forma escalonada para a avaliação. Para cada amostra, realizou-se a enxertia em três plantas de *Ipomoea setosa*, tomando o cuidado para evitar contaminação por enxerto como a utilização de lâminas individuais para cada genótipo enxertado e a lavagem das mãos com sabão em água corrente a cada mudança de genótipo. O procedimento de enxertia consistiu em utilizar excisões de aproximadamente 3 cm de comprimento de caules de batata-doce coletadas como enxerto em *I. setosa*. As excisões foram cortadas em bisel e enxertadas lateralmente na região do hipocótilo das plantas-teste (*I. setosa*) que tiveram suas folhas e ápice destacados. Enxerto e porta-enxerto foram unidos por meio de uma presilha. As plantas foram cobertas por plástico umedecido por um período de dois dias e foram identificadas com o registro do BAG utilizadas como enxerto e a data de realização da enxertia. Adicionalmente, as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação e continuamente observadas quanto á manifestação de sintomas nas novas folhas emergentes de *I. setosa* por um período de 30 dias. Posteriormente, três folhas de *I. setosa* foram coletadas (uma de cada planta que recebeu enxerto do mesmo acesso de batata-doce do BAG), formando uma amostra composta, e foram levadas ao Laboratório de Virologia Vegetal da Embrapa Hortaliças para a diagnose viral. Oito antissoros foram adquiridos no Centro Internacional de la Papa (Lima, Peru) e os outros dois (para o SPFMV e CMV) foram produzidos na Embrapa Hortaliças. As amostras foram processadas por meio de maceração manual com um rolinho na presença do tampão de extração 0,5 PBS (0,07M NaCl + 1mM KH₂PO₄ + 4mM Na₂HPO₄. 12H₂O + 1mM KCl). Foram aplicadas em membrana de nitrocelulose (Millipore 0,45 µM) alíquotas de 6µL de cada amostra, assim como os controles de planta sadia (negativo) e controles positivos que acompanham o kit de antissoros do CIP. As membranas foram deixadas para secar por um período de 1 hora em temperatura ambiente para a fixação do extrato vegetal aplicado na membrana. Em seguida, as membranas foram mergulhadas em solução bloqueadora composta pelo tampão 0,5 PBS, acrescido de 2% de leite em pó desnatado, permanecendo por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação de 60 rpm. Após o bloqueio, colocou-se as membranas no IgG (imunoglobulina) antissoro na diluição 1:1000 sob agitação constate de 60 rpm em *overnight*. No dia seguinte as membranas foram submetidas à tríplice lavagem em tampão 0,5 PBS, em intervalos de 3 minutos, sob agitação a 100 rpm e seguida incubadas numa solução de tampão 0,5

PBS diluiu-se o anti-IgG (imunoglobulina) geral para todos os vírus testados (SPFMV, SPMSV, SPCFV, SPMMV, SPLV, SPVG, SPCSV, SPCV, C-6 e CMV) na diluição 1:1000 por 4 horas com agitação de 60 rpm. Após as 3 horas de agitação, as membranas foram submetidas à tríplice lavagem em tampão 0,5 PBS, em intervalos de 3 minutos, sob agitação a 100 rpm. Seguindo de uma fase de revelação onde a detecção do complexo antígeno-anticorpo foi detectado adicionando-se 10mL de tampão de revelação (100mM NaCl + 100mM Tris-base + 5mM MgCl₂) acrescido de 30μL BCIP e 60μL NBT. A interpretação dos resultados foi feita visualmente, considerando-se positivas as amostras que resultaram no aparecimento de manchas de coloração púrpura na membrana de nitrocelulose e negativa quando mantidas a coloração de clorofila verde.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 153 plantas foram submetidas às análises por meio da enxertia em *I. setosa* e posterior diagnose por NCM-Elisa. Um maior percentual de amostras de batata-doce mostrou-se infectado pelo SPCV (83%) que é o mais comum, seguindo pelo SPMMV (80,4%), SPFMV (77,8%), SPMSV (75,2%), CMV (69,3%), SPCFV (64,05%), SPVG (62,09%), SPCSV (61,4%), C-6 (56,2%) e SPLV (28,1%). Infecções simples e mistas foram identificadas nas amostras submetidas à análise. Foram observadas plantas infectadas por apenas uma espécie de vírus (4,57%), duas (7,2%), três (4,57%), quatro (5,23%), cinco (11,8%), seis (11,11%), sete (9,15%), oito (15,03%), nove (13,72%) e dez espécies de vírus (17,64%) (Tabelas 1 e 2). Ou seja, grande parte das plantas de batata-doce está infectada por complexos virais (compostos por diferentes combinações de vírus) acima de 5 vírus diferentes. Um total de 144 acessos do campo experimental analisados foram provenientes do Centro-Oeste, 5 da região Nordeste, 3 da região Sul e 1 da região Sudeste. Ao se considerar as diferentes regiões geográficas brasileiras de onde os acessos foram provenientes, verifica-se grande diferença na distribuição dos vírus associados a essas plantas. Os materiais analisados apresentam diferentes características de coloração de polpa e pele da raiz tuberosa, porte, ciclo, entre outros descritores morfológicos. É de se esperar uma tolerância/resistência à infecção viral diferenciada entre os genótipos, haja vista que apresentam diferentes constituições genéticas. Os resultados obtidos indicam elevada diversidade viral associada à cultura da batata-doce em condições brasileiras, em materiais provenientes de diferentes

unidades da federação. As informações geradas serão de grande importância no processo de indexação de matrizes de batata-doce após o processo de limpeza clonal.

REFERÊNCIAS

- CLARK, CA; DAVIS, JA; ABAD, JA; CUELLAR, WJ; FUENTES, S; KREUZE, JF; GIBSON, RW; MUKASA, SB; TUGUME, AK; TAIRO, FD; VALKONEN, JPT. Sweetpotato Viruses: 15 Years of Progress on Understanding and Managing Complex Diseases. *Plant Disease*, v. 96, n. 2, p. 168-185, 2012.
- GIBSON, RW; MPEMBE, I; ALICAI, T; CAREY, EE; MWANGA, RO. M; SEAL, SE; VETTEN, HJ. Symptoms, aetiology and serological analysis of sweet potato virus disease in Uganda. *Plant Pathol*, v. 47, p. 95-102, 1998.
- HHAHN, SK. Effects of viruses (SPVD) on growth and yield of sweet potato. *Experimental Agriculture*, v. 15, p. 253-256, 1976.
- MUKIIBI, J. Effects of mosaic on the yield of sweet potatoes. *Proceedings of the 4th International Society for Tropical Root Crops. International Center of Tropical Agriculture (CIAT), Cali, Colombia*, p. 169-170, 1977.
- NNGEVE, JM; BOUWKAMP, JC. Effect of Sweet potato virus disease" (SPVD) on the yield of sweet potato genotypes un Cameroon. *Experimental Agriculture*. v. 27, p. 221-225, 1991
- P POZZER, L; DUSI, AN; LIMA, MI; KITAJIMA, EW. Caracterização de um isolado brasileiro do Sweet potato feathery mottle virus infectando batata-doce. *Fitopatologia Brasileira*, v. 20, n. 1, p. 65-71 *Fitopatologia Brasileira*, 1995.
- S SCHAEFERS, GA; TERRY, ER. Insect transmission of sweet potato disease agents in Nigeria. *Phytopathology*, v. 66, p. 642-645, 1976.
- VALVERDE, RA; CLARK, CA; AND VALKONEN, JPT. 2007. Viruses and virus disease complexes of sweetpotato. *Plant Viruses*, v. 1, p. 116-126.

1 **Tabela 1.** Distribuição das amostras de batata-doce analisadas quanto ao número de espécies virais associadas por região geográfica.

Amostras	0 vírus	0 vírus (%)	1 vírus	1 vírus (%)	2 vírus	2 vírus (%)	3 vírus	3 vírus (%)	4 vírus	4 vírus (%)	5 vírus	5 vírus (%)	6 vírus	6 vírus (%)	7 vírus	7 vírus (%)	8 vírus	8 vírus (%)	9 vírus	9 vírus (%)	10 vírus	10 vírus (%)	Total
Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	100	3
Sudeste	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	100	1
Centro-Oeste	0	0	7	4,86	11	7,64	7	4,86	8	5,55	18	12,5	17	11,8	14	9,72	23	15,97	21	14,6	18	12,5	144
Nordeste	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	100	5
Total	0		7		11		7		8		18		17		14		23		21		27		153

2
3 **Tabela 2.** Distribuição das amostras de batata-doce analisadas quanto às espécies virais associadas por região geográfica.

Amostras	SPFMV	SPFMV (%)	SPLV	SPLV (%)	SPMSV	SPMSV (%)	SPVG	SPVG (%)	SPMMV	SPMMV (%)	SPCFV	SPCFV (%)	C-6	C-6 (%)	SPCSV	SPCSV (%)	SPCV	SPCV (%)	CMV	CMV (%)	Total
Sul	3	100	3	100	3	100	3	100	3	100	3	100	3	100	3	100	3	100	3	100	3
Sudeste	1	100	1	100	1	100	1	100	1	100	1	100	1	100	1	100	1	100	1	100	1
Centro-Oeste	110	76,4	34	23,61	106	73,61	86	59,72	114	79,17	89	61,8	74	51,38	85	59,03	120	83,33	107	74,3	144
Nordeste	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5
Total	119	77,78	43	28,10	115	75,16	95	62,09	123	80,39	98	64,05	86	56,21	94	61,44	127	83,01	106	69,28	153

4