

1 **Comparação dos métodos sorológico e biológico na detecção de *Potato virus Y*** 2 **(PVY)**

3 **Camila Barriolli¹; Mirtes Freitas Lima²**

4 ¹Universidade Paulista, Brasília-DF, e-mail: camila.barriolli@gmail.com; ²Embrapa Hortaliças,
5 Cx. Postal 218, 70359-970, Brasília-DF, e-mail mirtes.lima@embrapa.br

6 **RESUMO**

7 O *Potato virus Y* (PVY) é um dos principais problemas da cultura da batata, no Brasil, sendo
8 uma das principais causas da degenerescência da batata-semente. Visando comparar a
9 sensibilidade do método sorológico DAS-ELISA (*Double antibody sandwich/Enzyme-linked*
10 *immunosorbent assay*) com o método biológico (inoculação em espécies indicadoras) na
11 detecção do PVY, analisaram-se 47 amostras de plantas de batata, coletadas aleatoriamente, em
12 áreas produtoras do Município de Cristalina, GO e no Gama, DF. O antissoro policlonal contra
13 o PVY assim como também o conjugado, foram empregados na concentração de 1mg/ml. As
14 amostras também foram inoculadas mecanicamente nas espécies indicadoras *Nicotiana*
15 *tabacum* cv. TNN, *N. benthamiana* e *Datura stramonium*. No preparo do extrato, utilizou-se
16 tampão fosfato, pH 7,0 na proporção de 1:10 (p:v). A avaliação foi realizada 20 dias após a
17 inoculação das plantas, pela visualização dos sintomas. Trinta e quatro amostras testaram
18 positivo para PVY, representando 72,34% do total. Treze plantas não reagiram contra o
19 antissoro policlonal do PVY. Observaram-se sintomas em *N. tabacum* TNN e *N. benthamiana*,
20 entretanto, nenhum sintoma em *D. stramonium*. Dezesete isolados induziram sintomas de
21 necrose das nervuras em TNN, sendo classificados como estirpe PVY^N e um isolado foi
22 classificado como PVY⁰ por induzir clareamento de nervuras, mosaico e manchas peroladas. Os
23 resultados biológicos confirmaram os dados obtidos com o teste DAS-ELISA, que na detecção
24 desses isolados não exibiram diferença de sensibilidade.

25 **PALAVRAS-CHAVE:** *Solanum tuberosum*, sorologia, potyvírus

26 27 **ABSTRACT**

28 **Comparison of serological and biological methods in PVY detection**

29 *Potato virus Y* (PVY) is one of the main problems of potato crop in Brazil, being one of the
30 main causes of degenerescence of potato seeds. To compare the sensitivity of serological
31 method, test-ELISA (*Double antibody sandwich - Enzyme-linked immunosorbent assay*) and
32 biological method (inoculation in indicator hosts) in the PVY detection, 47 potato samples were
33 randomly collected in producing areas of the Cristalina County, Goiás State and Gama, Federal
34

35 III Jornada Científica da Embrapa Hortaliças, 10 e 11 de junho, Embrapa Hortaliças 2013.

36 District. For a serological test, polyclonal antiserum against the PVY as well as the conjugate,
37 were used at a concentration of 1 mg/ml. Samples were also mechanically inoculated on
38 indicator species *Nicotiana tabacum* cv. TNN, *N. benthamiana* and *Datura stramonium*. Plant
39 extracts were prepared in phosphate buffer solution, pH 7.0 at 1:10 (p:v). Evaluation was
40 carried out 20 days after plant inoculation, by recording of symptoms. Thirty-four samples
41 tested positive for PVY, representing 72.34% of the total. Thirteen plants do not reacted against
42 the polyclonal antiserum against PVY. Symptoms were observed in *N. tabacum* TNN and *N.*
43 *benthamiana*; however, no symptom occurred in *D. stramonium*. Seventeen isolates induced
44 vein necrosis on TNN, being classified as strain PVY^N and, eighteen isolates induced vein
45 clearing, mosaic and pearl spots and classified as PVY^o. Results of biological test confirmed
46 data obtained with the DAS-ELISA test for detection of PVY isolates that exhibited no
47 difference in sensitivity.

48 **Keywords:** *Solanum tuberosum*, serology, potyvirus

49

50 INTRODUÇÃO

51 O *Potato virus Y* (PVY) é, atualmente, um dos principais problemas em áreas de produção de
52 batata semente do Brasil, podendo resultar em degenerescência do tubérculo e perdas
53 significativas na produção. O vírus pertence ao gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*, sendo
54 transmitido por diversas espécies de maneira não persistente (Bergher *et al.*, 2005). Induz
55 sintomas diversos nas plantas, os quais podem variar segundo a estirpe do PVY infectando a
56 planta, de acordo com a cultivar, fase de desenvolvimento da planta, assim como também
57 depende das condições ambientais, entre outros fatores (SOUZA-DIAS, 2001). Segundo Kus (1995),
58 as perdas podem variar de 30% a 100%.

59 O vírus possui diversas estirpes, PVY^N, PVY^o e PVY^C. As duas primeiras tem sido
60 frequentemente identificadas em áreas produtoras brasileiras (Figueira *et al.*, 1996). Entretanto,
61 a variante necrótica PVY^{NTN} reportada pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento, na
62 segunda metade da década de 90 tem causado sérios prejuízos ao produtor.

63 Os métodos utilizados na detecção do PVY incluem sorologia, inoculação em hospedeiras
64 diferenciais e RT-PCR. O método de detecção mais utilizado é o sorológico, considerando-se
65 que é menos oneroso, rápido e se pode realizar a análise de um grande número de amostras em
66 curto espaço de tempo. Para evitar escapes, procurou-se avaliar métodos diferentes na detecção
67 do PVY. Dessa forma tem-se buscado um método ainda mais sensível e acurado para a análise
68 das amostras em larga escala, visando aumentar a eficiência na detecção do vírus.

69

70 III Jornada Científica da Embrapa Hortaliças, 10 e 11 de junho, Embrapa Hortaliças 2013.

71

72 Este trabalho teve como objetivo comparar a eficiência na utilização de método sorológico e
73 método biológico na detecção de isolados de PVY.

74

75 MATERIAL E MÉTODOS

76 **Coleta de amostras.** Quarenta e sete amostras de plantas de batata foram coletadas
77 aleatoriamente em áreas produtoras, no Município de Cristalina-GO e Gama, DF. O
78 processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Virologia e Biologia Molecular da
79 Embrapa Hortaliças.

80 **Teste sorológico.** As amostras foram analisadas em DAS-Elisa (*Double antibody*
81 *sandwich/Enzyme-linked immunosorbent assay*) (Clark & Adams, 1977) utilizando-se
82 antissoros policlonais contra a capa proteica do PVY. O antissoro, assim como também o
83 conjugado foram empregados na concentração de 1mg/ml. Os antígenos foram preparados a
84 partir de folhas das amostras coletadas em tampão de extração, na proporção de 1:10 (g/ml).
85 Extrato de plantas de batata infectadas, por inoculação mecânica, assim como também extratos
86 de plantas sadias foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente, nos
87 testes de detecção. A amostra foi considerada positiva quando o valor da leitura de sua
88 absorvância foi pelo menos três vezes maior que o valor da absorvância do controle negativo. A
89 absorvância foi lida a 405nm cerca de 30 minutos após a adição do substrato.

90 **Teste biológico.** Cada amostra, positiva ou não para PVY segundo os resultados do teste
91 sorológico, foi mecanicamente inoculada em plantas das espécies indicadoras *Nicotiana*
92 *tabacum* cv. TNN (diferenciação fenotípica de estirpes) e *N. benthamiana* L., suscetíveis ao
93 vírus. Também, inoculou-se em *Datura stramonium* L., imune ao PVY (Shukla *et al.*, 1994),
94 para detecção de possíveis infecções mistas com outros vírus. Plantas previamente pulverizadas
95 com Carborundum 600 mesh foram inoculadas com extrato da amostra preparado em tampão
96 fosfato, pH 7,0 na proporção de 1:10 (p:v). A avaliação foi realizada 20 dias após a inoculação
97 das plantas, pela observação visual dos sintomas.

98 **Análise dos resultados.** Os dados obtidos com o teste sorológico foram comparados às
99 informações obtidas com a leitura dos sintomas nas plantas indicadoras, visando comparar a
100 sensibilidade dos dois testes, sorológico e biológico, na detecção de isolados de PVY.

101

102 RESULTADOS E DISCUSSÃO

103 Os resultados dos testes sorológicos indicaram que 72,34% (34) das amostras analisadas

104

105 III Jornada Científica da Embrapa Hortaliças, 10 e 11 de junho, Embrapa Hortaliças 2013.

106 reagiram com o antissoro policlonal produzido contra a capa protéica do PVY, reafirmando a
107 importância desse vírus para a cultura da batata (**Tabela 1**). Treze amostras testaram negativo
108 em DAS-ELISA para o PVY. O controle positivo e o negativo reagiram como esperado, com
109 leituras de absorbância média de 1,443 e 0,011, respectivamente.

110 Na avaliação da expressão de sintomas em plantas indicadoras, observaram-se sintomas nas
111 indicadoras *N. tabacum* TNN (Weidemann, 1988; Singh, 1992) e *N. benthamiana*. Dezesesseis
112 amostras induziram sintomas de necrose das nervuras em TNN, indicando a presença da estirpe
113 PVY^N (**Figura 1A**) nessas plantas, enquanto que sintomas de clareamento de nervuras, mosaico
114 e manchas peroladas (**Figura 1B**) no limbo foliar de plantas de TNN foram verificados para
115 dezoito amostras, indicando a existência de infecção pela estirpe comum PVY^o.

116 Esses resultados confirmam os resultados obtidos com os testes sorológicos, onde todas as
117 amostras que reagiram contra o antissoro do PVY, também induziram sintomas em TNN,
118 propiciando a diferenciação fenotípica das estirpes de PVY. Em *N. benthamiana* observou-se
119 mosaico, redução do tamanho das folhas e deformação foliar para a maioria dos isolados.
120 Nenhum sintoma foi observado em *D. stramonium*.

121 Esses resultados confirmam a presença do PVY^N nas amostras coletadas, tendo sido a estirpe
122 predominante na maioria das plantas analisadas no ano de 2013. Houve correspondência entre
123 os resultados obtidos com a sorologia e a inoculação mecânica, considerando-se que as treze
124 amostras negativas em DAS-ELISA não produziram sintomas em nenhuma das espécies
125 indicadoras. As amostras que testaram positivo em DAS-ELISA induziram sintomas em *N.*
126 *tabacum*, após a inoculação mecânica.

127

128

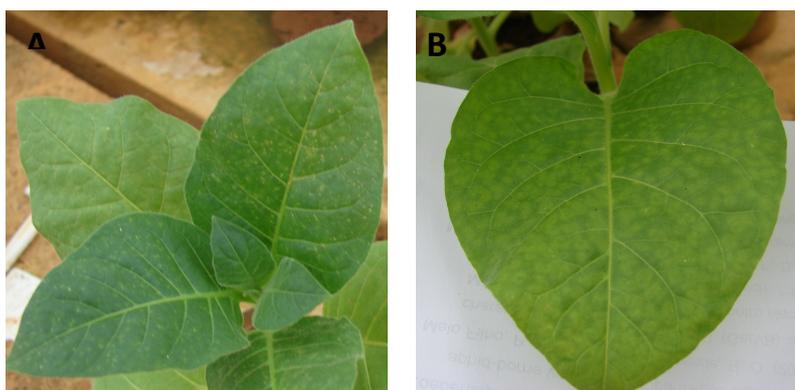
129

130

131

132

133



134 **Figura 1.** Sintomas de necrose (**A**) e manchas peroladas (**B**) em *Nicotiana tabacum* TNN, após
135 inoculação mecânica.

136

137 III Jornada Científica da Embrapa Hortaliças, 10 e 11 de junho, Embrapa Hortaliças 2013.

138 **Tabela 1.** Resultados de análise sorológica e reação em espécies indicadoras após inoculação
 139 mecânica de amostras de batata. Embrapa Hortaliças, 2012-2013.

Isolado (N°)	Local	Idade (dias)	Coleta	Cultivar	PVY ^{1/}	Sintomas		
						N. <i>tabacum</i>	N. <i>benthamiana</i>	D. <i>stramonium</i>
CNPH 27	Cristalina, GO	43	2013	Cupido	+ ^{2/}	NN ^{3/}	Mo; DF	SS
CNPH 46	Cristalina, GO	43	2013	Cupido	+	NN	Mo; DF	SS
CNPH 49	Cristalina, GO	43	2013	Cupido	+	NN	Mo; DF	SS
CNPH 52	Cristalina, GO	43	2013	Cupido	+	NN	Mo; DF	SS
CNPH 55	Cristalina, GO	43	2013	Cupido	+	NN	Mo; DF	SS
CNPH 59	Cristalina, GO	43	2013	Cupido	+	NN	Mo; DF	SS
CNPH 64	Cristalina, GO	43	2013	Cupido	+	NN	Mo; DF	SS
CNPH 65	Cristalina, GO	43	2013	Cupido	+	NN	Mo; DF	SS
CNPH 66	Cristalina, GO	43	2013	Cupido	+	CN; MP	Mo; DF	SS
CNPH 68	Cristalina, GO	43	2013	Cupido	+	NN	Mo; DF	SS
CNPH 70	Cristalina, GO	43	2013	Cupido	+	NN	Mo; DF	SS
CNPH 71	Cristalina, GO	43	2013	Cupido	+	NN	Mo; DF	SS
CNPH 21	Cristalina, GO	43	2013	Cupido	-	SS	SS	SS
CNPH 28	Cristalina, GO	43	2013	Cupido	-	SS	SS	SS
CNPH 30	Cristalina, GO	43	2013	Cupido	-	SS	SS	SS
CNPH 47	Cristalina, GO	43	2013	Cupido	-	SS	SS	SS
CNPH 60	Cristalina, GO	43	2013	Cupido	-	SS	SS	SS
CNPH 1	Gama, DF	55	2012	Asterix	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 2	Gama, DF	55	2012	Asterix	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 3	Gama, DF	55	2012	Asterix	+	CN; MP	SS	SS
CNPH 4	Gama, DF	55	2012	Asterix	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 5	Gama, DF	50	2012	Bintje	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 6	Gama, DF	60	2012	Agata	+	CN; MP	SS	SS
CNPH 7	Gama, DF	60	2012	Agata	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 8	Gama, DF	60	2012	Agata	+	NN	Mo;DF	SS
CNPH 9	Gama, DF	55	2012	Asterix	+	NN	Mo;DF	SS
CNPH 10	Gama, DF	55	2012	Asterix	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 11	Gama, DF	50	2012	Monalisa	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 12	Gama, DF	50	2012	Monalisa	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 13	Gama, DF	50	2012	Monalisa	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 14	Gama, DF	50	2012	Monalisa	+	CN; MP	SS	SS
CNPH 15	Gama, DF	50	2012	Monalisa	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 16	Gama, DF	50	2012	Monalisa	+	NN	Mo;DF	SS
CNPH 17	Gama, DF	50	2012	Monalisa	+	NN	Mo;DF	SS
CNPH 18	Gama, DF	50	2012	Monalisa	+	NN	SS	SS
CNPH 19	Gama, DF	55	2012	Asterix	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 20	Gama, DF	55	2012	Asterix	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 21	Gama, DF	50	2012	Monalisa	+	CN; MP	Mo;DF	SS
CNPH 22	Gama, DF	50	2012	RM9846-01	-	SS	SS	SS
CNPH 23	Gama, DF	50	2012	RM9823-05	-	SS	SS	SS
CNPH 24	Gama, DF	50	2012	RM9823-05	-	SS	SS	SS
CNPH 25	Gama, DF	50	2012	RM9823-05	-	SS	SS	SS
CNPH 26	Gama, DF	50	2012	RM9823-05	-	SS	SS	SS
CNPH 27	Gama, DF	50	2012	RM9823-05	-	SS	SS	SS
CNPH 28	Gama, DF	50	2012	RM9823-05	-	SS	SS	SS
CNPH 29	Gama, DF	50	2012	RM9823-05	-	SS	SS	SS
CNPH 30	Gama, DF	60	2012	Agata	+	CN; MP	Mo;DF	SS

140 ^{1/}PVY= *Potato virus Y*;

141 ^{2/}Resultados do teste sorológico DAS-ELISA: (+)= amostra positiva; (-)=amostra negativa.

142 ^{3/} NN=necrose das nervuras; Mo=mosaico; DF=deformação foliar; SS=sem sintomas; CN=clareamento de nervuras;

143 MP=manchas peroladas.

144

145

147 **REFERÊNCIAS**

- 148 CLARK, M.F.; ADAMS, A, N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked
149 immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, 34, 475-
150 483, 1977.
- 151 BERGER, P.H.; ADAMS, M.J.; BARNETT, O.W.; BRUNT, A.A.; HAMOND, J.; HILL, J.H.;
152 JORDAN, R.I.; KASHIWAZAKI, S.; RYBICKI, E.; SPENCE, N.; STENGER, D.C.; OHKI,
153 S.T.; UYEDA, I.; Van ZAAYEN, A.; VALKONEM, J.; VETTEN, H.J. Family *Potiviridae*. In:
154 FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. eds.
155 **Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses: Eighth Report of the**
156 **International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier Academic Press, San Diego.
157 2005. p.819-841.
- 158 FIGUEIRA, A.R.; PINTO, A.C.S. Estirpe necrótica do vírus Y da batata em sementes
159 importadas está causando problemas ao bataticultor mineiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.20,
160 p.299, 1995. Suplemento.
- 161 KUS, M. The epidemic of the tuber necrotic ringspot strain of *Potato virus Y* (PVYNTN) and its
162 effect on potato crops in Slovenia. In: European Association for Potato Research Meeting,
163 Virology Section. 9. **Proceedings...**Bled: EAPR. p.159-160, 1995.
- 164 SHUKLA, D.D.; WARD, C.W.; BRUNT, A.A. **The Potyviridae**. Cambridge, University Press,
165 p.1-500, 1994.
- 166 SINGH, R.P. Incidence of tobacco vein necrotic strain of potato virus Y (PVY^N) in Canada in
167 1990 and 1991 and scientific basis for eradication of the disease. **Canadian Plant Disease**
168 **Survey**, 72:113-119, 1992.
- 169 SOUZA-DIAS, J.A.C.; TRISTÃO, J.F.; MIRANDA, H.S. Vírus Y da batata-semente cv.
170 Atlantic: alteração na epidemiologia da virose em São Paulo e no Paraná. **Fitopatologia**
171 **Brasileira**, 20:320, 1995.
- 172 WEIDEMANN, H.L. Importance and control of potato virus YN (PVY^N) in seed potato
173 production. **Potato Research**, 31:85-94, 1998.
- 174
175
176
177
178
179
180
181 III Jornada Científica da Embrapa Hortaliças, 10 e 11 de junho, Embrapa Hortaliças 2013.