

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**OCORRÊNCIA DE VIROSES EM MANDIOQUINHA-SALSA (*Arracacia
xanthorrhiza* Brancroft) NAS PRINCIPAIS REGIÕES PRODUTORAS DO
BRASIL**

CRISTIANE MELO DE SOUSA

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP - Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP

ABRIL/2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**OCORRÊNCIA DE VIROSES EM MANDIOQUINHA-SALSA (*Arracacia
xanthorrhiza* Brancroft) NAS PRINCIPAIS REGIÕES PRODUTORAS DO
BRASIL**

CRISTIANE MELO DE SOUSA

Orientador: Prof^o Dr. Marcelo Agenor Pavan

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Renate Krause-Sakate

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP

ABRIL/2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

S725o Sousa, Cristiane Melo de, 1984-
Ocorrência de viroses em mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorriza* Brancroft) nas principais regiões produtoras do Brasil / Cristiane Melo de Sousa. - Botucatu : [s.n.], 2014
vii, 42 f. : tabs., ils. color., fots. color.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2014

Orientador: Marcelo Agenor Pavan

Coorientador: Renate Krause-Sakate

Inclui bibliografia

1. Batata baroa - Doenças e pragas - Brasil. 2. Teste imunoenzimático. 3. Reação em cadeia de polimerase. 4. Viroses das plantas. I. Pavan, Marcelo Agenor. II. Krause-Sakate, Renate. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: “OCORRÊNCIA DE VIROSES EM MANDIOQUINHA-SALSA
(*Arracacia xanthorrhiza Brancroft*) NAS PRINCIPAIS REGIÕES PRODUTORAS
DO BRASIL”**

ALUNA: CRISTIANE MELO DE SOUSA

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN

COORIENTADORA: PROF. DRA. RENATE KRAUSE SAKATE

Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN



PROF. DR. JULIO MASSAHARU MARUBAYASHI



PROFA. DRA. RUMY GOTO

Data da Realização: 07 de abril de 2014.

*CompreendiQue ter amigos é necessário... Que lutar é manter-se vivo...
Aprendi que o tempo cura... Compreendi que podemos chorar sem derramar
lágrimas... Que os verdadeiros amigos permanecem... Que a dor fortalece...
Que vencer engrandece... Que pra sorrir tem que fazer alguém sorrir...
Que a beleza não está no que vemos, e sim no que sentimos...
Que o valor está na força da conquista... Compreendi que as palavras tem
força... Que viver é aprender com os erros...
Aprendi que tudo depende da vontade... Que o melhor é ser nós mesmos...
Que o SEGREDO da vida é VIVER!!!”*

(Clarice Lispector)

"De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos apenas começando,

A certeza de que é preciso continuar

E a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar.

Fazer da interrupção um caminho novo,

Fazer da queda um passo de dança,

Fazer do medo uma escada,

Fazer do sonho a ponte.”

(Fernando Sabino)

*À meu pai Paulo Sérgio de Sousa,
Por todo amor, incentivo, confiança e dedicação.
Sei o quanto você queria ver esse sonho realizado,
Mas infelizmente não pôde acompanhar o final dessa história.
Te agradeço pelo pai maravilhoso que sempre foi.
Te amo!
(in memoriam)*

Dedico

*À minha mãe rainha Deusimar,
À minhas irmãs, Cláudia, Cleudiane, Cirlene e
Maria de Nazaré e a meu irmão Paulo Sérgio
Pelas alegrias e apoio incondicional.
E pelo amor, união e força
no momento mais difícil de nossas vidas.*

Dedico

*À Deus, por ter me dado forças e coragem
no momento em que mais precisei.
E por me permitir concluir mais esta etapa
da minha vida profissional.*

Ofereço

Você nunca sabe a força que tem, até que a sua única alternativa é ser forte.

Johnny Depp

À meu namorado Robson Barbosa

Pelo amor, paciência, compreensão

e por sempre apoiar as minhas decisões.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP, Câmpus de Botucatu, pelo suporte e oportunidade para realizar esse trabalho.

À toda a minha família, por todo incentivo, compreensão e pela criação maravilhosa que recebi de minha mãe Deusimar e meu pai Paulo Sérgio (in memorian).

Às minhas avós Maria de Nazaré e Tereza, pelo amor e valores transmitidos.

À minha orientadora da graduação, Dr^a. Alessandra Boari pelos primeiros ensinamentos transmitidos.

À Capes, pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador Marcelo Agenor Pavan pelo acolhimento, orientação e ensinamentos durante a condução desse trabalho.

À minha coorientadora prof^a. Dr^a. Renate Krause-Sakate, pela ajuda, ensinamentos e sugestões para o desenvolvimento desse trabalho.

À empresa TECNOPLANTA, pelo fornecimento dos materiais para o desenvolvimento do experimento.

À minha tia Natalina, pelo incentivo e contribuições para minha formação.

Às amigas de longa data, Meyre Lane e Rozângela pelo companheirismo mesmo distantes, força e amizade durante todos esses anos.

Aos amigos da graduação, Diego, Josiane, Caroline, Tamiris, Rafaele e Hellen pela amizade e por compartilharem comigo momentos de alegrias e tristezas.

Às amigas que conquistei em Botucatu, Leysimar Pitzr, Daiana e Evelynne, pela ajuda e conversas descontraídas.

Agradeço especialmente à querida Tatiana Mituti, pela paciência, disposição em ajudar sempre, idéias, em fim... por toda a contribuição no trabalho.

Aos colegas e companheiros do laboratório de Virologia Vegetal, Kelly Rocha (obrigada por toda a ajuda no começo dessa etapa), Bruno de Marchi, Letícia Moraes, Júlio Marubayashi, Mônica Fecury, Milena Leite, Marcelo Soman, Gerson Suzuki e em especial aos queridos David Spadotti e Leonardo Barbosa, pela companhia e conversas nas horas de intervalo. Obrigada, lembrarei sempre com carinho e saudades de cada um de vocês.

Ao Funcionário do departamento de Proteção de Plantas, Sr. Paulinho pela ajuda prestada e simpatia.

Meu agradecimento especial a minha grande amiga e companheira nesses dois anos de convivência Késsia Pantoja, pelas alegrias, tristezas e dificuldades compartilhadas durante esse percurso. Saiba que seu apoio e incentivo foram de fundamental importância, e sua presença em minha vida durante a minha estadia em Botucatu, tornaram meus dias mais alegres, pois formamos uma verdadeira família. Te amo minha amiga, sentirei saudades das nossas conversas e de todos os momentos de descontração compartilhados.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma especial contribuíram para o desenvolvimento e andamento do trabalho.

SUMÁRIO

1. RESUMO	1
2. SUMMARY	3
3. INTRODUÇÃO	5
4. REVISÃO DE LITERATURA	7
4.1. A cultura da mandioquinha-salsa e sua situação no Brasil.....	7
4.2. Principais viroses em mandioquinha-salsa.....	11
4.2.1. Gênero <i>Nepovirus</i>	11
4.2.2. Gênero <i>Cheravirus</i>	12
4.2.3. Gênero <i>Carlavirus</i>	12
4.2.4. Gênero <i>Potyvirus</i>	13
5. MATERIAL E MÉTODOS	17
5.1. Levantamento.....	17
5.1.1. Coleta das amostras.....	17
5.2. Análise das amostras	18
5.2.1. Microscopia eletrônica	18
5.2.2. Identificação Sorológica.....	19
5.2.3. Caracterização Biológica.....	20
5.2.4. Extração de RNA total	20
5.2.5. Caracterização Molecular.....	22
5.3. Análise do PCR em gel de agarose	24
5.4. Purificação do Produto de PCR.....	24
5.5. Sequenciamento do fragmento viral amplificado.....	24
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
6.1. Análise por Microscopia Eletrônica.....	26
6.2. Teste de gama de hospedeiras	27
6.3. Teste para o gênero <i>Nepovirus</i>	28
6.4. Teste dos oligonucleotídeos obtidos para o gênero <i>Cheravirus</i>	29
6.5. Testes para detecção de potyvirus por RT-PCR e ELISA Indireto.....	30
6.5.1. Análise da variabilidade genética para potyvirus.....	33
7. CONCLUSÕES.....	35
8. REFERÊNCIAS	36
9. APÊNDICE I.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Descrição das partes da planta de mandioquinha-salsa.	8
Figura 2. Representação esquemática da organização e expressão do genoma de um potyvirus.....	14
Figura 3. A, B, C e D. Plantas de mandioquinha-salsa mantidas em casa de vegetação, cultivares Comum e Amarela de Senador Amaral, enviadas para microscopia eletrônica de transmissão.....	19
Figura 4. A e B. Plantas de mandioquinha-salsa com sintomas causados por virose.	26
Figura 5. A - <i>C. amaranticolor</i> , B - <i>C. quinoa</i> e C - <i>N. benthamiana</i> , apresentando sintomas. 28	28
Figura 6. Gel de agarose a 0,8% obtido a partir do teste para Nepovirus. M: Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder; 1 a 6, amostras e mandioquinha-salsa.....	29
Figura 7. Gel de agarose obtido a partir do teste para cheravirus. Um fragmento de aproximadamente 750 bp foi obtido. M: Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder; 1 a 6, amostras e mandioquinha-salsa.	30
Figura 8. Análise em gel de agarose a 0,8% para o teste de potyvirus. M: Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder; 1: controle positivo; 2: controle negativo e 3: amostra de <i>N. benthamiana</i> infectada com potyvirus.	32
Figura 9. Árvore filogenética obtida pelo programa Mega 4.0 da sequência de nucleotídeos da porção da proteína capsidial de diferentes isolados de AMoV. A árvore foi construída utilizando neighbor joining, com valor de Bootstrap de 2000. <i>Potato virus V</i> foi utilizado como outgroup.	33

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1. Levantamento de potyvirus nas regiões de Piraquara/PR, Brasília/DF, Campo Alegre/GO e Senador Amaral/MG.....	31
Quadro 2. Porcentagem de identidade de nucleotídeos correspondente a região parcial da proteína capsial de AMoV.....	34
Tabela 1. Número de mandioquinha-salsa analisadas, períodos de coleta e localidade.	18
Tabela 2. Primers utilizados para a tentativa de amplificação de cheravirus em mandioquinha-salsa, com suas respectivas sequências e tamanho esperado do fragmento amplificado.....	24
Tabela 3. Espécies indicadoras testadas e os respectivos sintomas causados.	27

1. RESUMO

OCORRÊNCIA DE VIROSES EM MANDIOQUINHA-SALSA (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) NAS PRINCIPAIS REGIÕES PRODUTORAS DO BRASIL. Botucatu, 2014. 53 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: CRISTIANE MELO DE SOUSA

Adviser: MARCELO AGENOR PAVAN

Co-adviser: RENATE KRAUSE-SAKATE

A mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) é uma hortaliça originária da região andina, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia. A família das apiáceas compreende também outras hortaliças importantes, como cenoura, salsa, coentro, aipo, dentre outras. A mandioquinha-salsa é propagada de forma vegetativa através dos propágulos, e isso pode favorecer a ocorrência de um número considerável de patógenos que causam degenerescência, principalmente os vírus. Está comprovado que alguns vírus são fator limitante em culturas de propagação vegetativa. Portanto, o presente trabalho teve como objetivos avaliar por meio de métodos sorológico e molecular 241 amostras oriundas de diferentes localidades, a fim de fazer um estudo de ocorrência e predominância das espécies virais e verificar a variabilidade biológica dos isolados encontrados por meio de transmissão por extratos vegetais. A detecção foi realizada através de *Enzyme linked immunossorbent assay* (ELISA) utilizando antissoro comercial anti-poty para o gênero *Potyvirus*. Para a análise da variabilidade, foram desenhados

oligonucleotídeos para amplificar a região codificadora da proteína capsidial para o gênero *Cheravirus*, e para a detecção de potyvirus e nepovirus, oligonucleotídeos foram obtidos da literatura. No estudo foi possível detectar a espécie *Arracacha motlle virus* do gênero *Potyvirus*, coletadas nos estados de Goiás, Minas Gerais, Brasília e Paraná. Os demais vírus testados não foram identificados em nenhuma das amostras analisadas. Além desses testes de identificação, ainda foi realizada microscopia eletrônica de transmissão em seis amostras, das quais duas foi possível a identificação de potyvirus. O teste de gama de hospedeiras foi realizado e mostrou que o AMoV tem gama de hospedeiras bastante restrita, sendo possível infectar somente três de nove espécies testadas. A identidade de nucleotídeos variou de 96% a 99% comparados entre os isolados coletados e o depositado no Genbank (DQ925486), mostrando baixa variabilidade genética entre os isolados coletados.

Palavras-chaves: *Arracacha motlle virus*, potyvirus, apiáceas

2. SUMMARY

OCCURRENCE OF VIRUSES IN ARRACACHA (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) IN THE MAIN PRODUCERS REGIONS OF BRAZIL. Botucatu, 2014. 53 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: CRISTIANE MELO DE SOUSA

Adviser: MARCELO AGENOR PAVAN

Co-adviser: RENATE KRAUSE-SAKATE

Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) is a vegetable crop of the Andean region, formed by Venezuela, Colombia, Ecuador, Peru and Bolivia. The Apiacea family also have other important vegetable crops such as carrots, parsley, cilantro, celery, among others. Arracacha is propagated vegetatively and this can favor the occurrence of a considerable number of pathogens that cause degeneration, especially viruses. Some viruses are a limiting factor in vegetatively propagated crops. Therefore, the present study aimed to evaluate by serological and molecular methods 241 samples from different localities in order to verify the occurrence and predominance of the viruses species and verify the biological variability by sap inoculation. The detection was performed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique, using commercial antiserum against-potyvirus. For variability analysis, primers were designed to amplify the coding region of the coat protein for the

genus *Cheravirus*, and oligonucleotides were obtained from literature for the detection of the genus potyvirus and nepovirus, . It was possible to detect *Arracacha mottle virus*, from genus *Potyvirus*, in the states of Goiás, Minas Gerais, Brasília and Paraná. The others viruses tested were not identified in the collected samples. Six samples were analysed by electron microscopy, and the potyvirus were identified only in two samples. The host range was restricted, infecting only three species of nine tested. The nucleotide identity ranged from 96% to 99%, between collected samples and sequence from GenBank (access DQ925486), showing low genetic variability among them.

Keywords: *Arracacha mottle virus*, potyvirus, apiacea.

3. INTRODUÇÃO

A mandioquinha salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) tem como centro de origem a região andina da Colômbia, Venezuela, Equador, Peru e Bolívia, onde até hoje faz parte da cultura local, onde é cultivada e consumida pelas comunidades. Essa cultura apresenta um mercado crescente por ser um produto saudável, e é uma ótima alternativa para pequenos e médios produtores, especialmente dentro dos conceitos de agricultura familiar por demandar muita mão-de-obra nas fases de plantio e colheita e também pelo seu elevado valor de mercado (MADEIRA, et al., 2008). O cultivo de mandioquinha-salsa se restringe a poucas cultivares com uniformidade genética, principalmente por ser uma cultura de propagação vegetativa e isso torna a expansão do cultivo limitante em regiões com condições climáticas diferentes das tradicionais, elevando os riscos de incidência de pragas de doenças, especialmente às causadas por vírus (GIORDANO et al., 1995; SANTOS, 1997).

Os principais estados produtores de mandioquinha-salsa são Minas Gerais e Paraná, com áreas estimadas em 6 mil hectares cada um. Logo em seguida vem Santa Catarina, com cerca de 3 mil ha, Espírito Santo com aproximadamente 800 ha e São Paulo, em torno de 400 ha. Existem também outros estados que são produtores dessa cultura, porém em menor escala (menos de 20 ha), como Rio Grande do Sul, Goiás, Bahia, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal (MADEIRA; CARVALHO, 2013).

Assim como outras hortaliças, a mandioquinha-salsa está sujeita às doenças provocadas por bactérias, fungos, nematóides e vírus. A mandioquinha-salsa é considerada uma espécie relativamente rústica e que apresenta boa tolerância às doenças, sendo poucas consideradas limitantes no Brasil. Por outro lado, o ciclo relativamente longo para uma hortaliça, variando de 8 a 11 meses, expõe a cultura a períodos de clima muito favoráveis à incidência de doenças, como verões quentes e chuvosos (HENZ, et al., 2008).

A mandioquinha-salsa é propagada de forma vegetativa através dos propágulos, e isso pode favorecer a ocorrência de um número considerável de patógenos que causam degenerescência, principalmente os vírus. Após alguns anos de cultivo em regiões tradicionais, o incremento produtivo da cultivar Amarela de Senador Amaral, observado nos primeiros anos após seu lançamento, vem decaindo (informação pessoal, Nuno Rodrigo Madeira). Isso possivelmente deve ter ocorrido, devido essa cultivar ter sido originada a partir de sementes botânicas, o material deveria estar isento de infecção por vírus, no entanto, com o passar do tempo é provável que tenha havido infestações sucessivas por vírus distintos, degenerando a qualidade sanitária do material de propagação (ORÍLIO, et al., 2009).

Há relatos de ocorrência de sete vírus infectando mandioquinha-salsa nos países de origem e apenas uma espécie descrita no Brasil. Duas espécies pertencentes ao gênero *Nepovirus*, o *Arracacha virus A* (AVA), descrito por Jones e Kenten (1978) e *Potato black ringspot virus - arracacha* (PBRSV-A), descrito por Lizárraga et al. (1994); *Arracacha virus B* (AVB) pertencente ao gênero *Cheravirus* descrito por Kenten; Jones (1979), *Arracacha virus Y* (AVY) e *Arracacha latent virus* (ALV) descritos por Brunt et al. (1996), espécies tentativas dos gêneros *Potyvirus* e *Carlavirus* respectivamente. Lizárraga (2000) cita mais dois vírus tentativa em mandioquinha-salsa: *Arracacha potyvirus 1* (AP-1) (*Potyvirus*) e *Arracacha carlavirus 3* (AV-3) (*Carlavirus*) que poderiam estar relacionados com AVY e ALV, respectivamente. No Brasil há relato de apenas um vírus em mandioquinha-salsa pertencente ao gênero *Potyvirus*, o *Arracacha motlle virus* (AMoV), descrito por Orílio (2007).

Portanto, o presente trabalho teve como objetivos realizar levantamentos nas regiões produtoras de mandioquinha-salsa, a fim de fazer um estudo de ocorrência e predominância das espécies virais, realizando a caracterização molecular e sorológica, e verificando a variabilidade biológica dos isolados encontrados por meio de transmissão por extratos vegetais.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. A cultura da mandioquinha-salsa e sua situação no Brasil

A mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) é uma planta dicotiledônea, da ordem Umbellales, família *Apiaceae* (Umbelliferae), gênero *Arracacia*, espécie *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. A família das apiáceas compreende também outras hortaliças importantes, como cenoura, salsa, coentro, aipo, dentre outras. Em 1825, a partir de plantas coletadas na Jamaica, Bancroft a classificou taxonomicamente estabelecendo o gênero e a espécie (SANTOS, 1993).

Foi introduzida no Brasil no início do século passado (BALBINO et al. 1990; SANTOS; SILVA, 1998). Bukasov (1981) afirma que é a planta cultivada mais antiga da América do Sul e seu cultivo entre os Chibchas de Bogotá pode ter antecedido o da batata e o do milho. Na Colômbia é onde se encontra a maior variabilidade de clones do gênero *Arracacia*, o que tem levado a concluir que lá seja seu verdadeiro centro de origem (LEÓN, 1964). Essa cultura tem grande importância social e econômica (MADEIRA; SOUZA, 2004).

A mandioquinha-salsa é descrita como de ciclo anual, bi-anual ou perene. Raras vezes ela completa seu ciclo, pois a colheita é realizada antes do florescimento, ao final do estágio vegetativo (HERMANN, 1997). O caule compõe-se de uma cepa ou coroa, de cuja parte superior saem as ramificações curtas, os rebentos, filhotes ou propágulos, de onde nascem as folhas, sendo que o conjunto dessas folhas forma a coroa, também chamada de touça ou touceira (ZANIN; CASALI, 1984). Da parte inferior da cepa saem as raízes tuberosas, que constituem a parte comercializável, com coloração variando de branco a amarelo intenso ou púrpura-escuro, de acordo com o clone. Estas raízes são produzidas em número de seis ou mais por planta (FILGUEIRA, 2000). O mercado brasileiro apresenta preferência por raízes de formato cônico alongado e de coloração amarela (SANTOS et al., 1991).

Na parte superior, saem ramificações conhecidas como rebentos, filhotes, brotos ou propágulos, em número variável de 10 a 30, de onde nascem as folhas. Estes rebentos são utilizados para propagação vegetativa (Figura 1). Além disso, os rebentos são mais nutritivos que as raízes em minerais, proteínas e no balanço de aminoácidos (CASALI, 1994). A parte subterrânea é constituída principalmente pelas raízes tuberosas, em número geralmente de quatro a dez, que saem da parte inferior da coroa. As raízes são ovóides, cônicas ou fusiformes, com 5 a 25 cm de comprimento e de 3 a 8 cm de diâmetro (Figura 1).

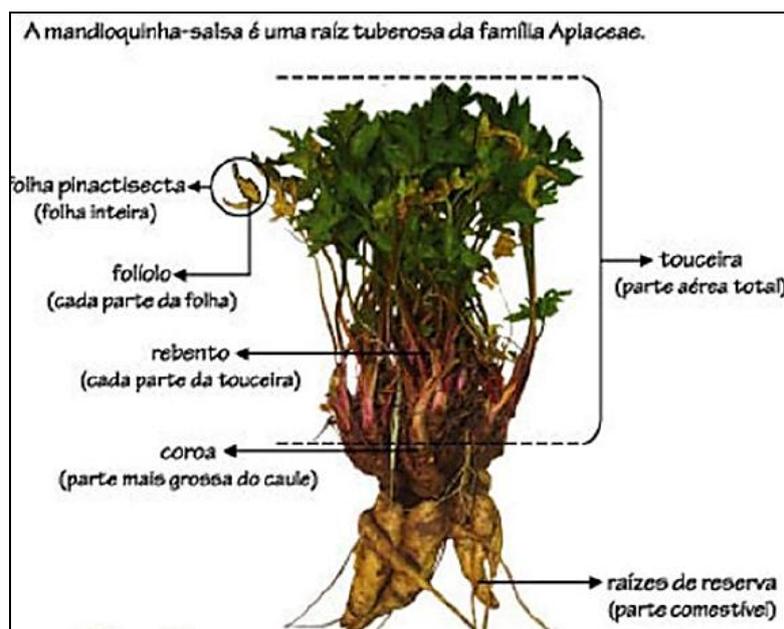


Figura 1. Descrição das partes da planta de mandioquinha-salsa (Adaptado de Normas, 2002).

Em razão de ter como centro de origem os vales situados na parte norte da Cordilheira dos Andes, onde a altitude varia de 1.700 a 2.500 m e as temperaturas oscilam entre 15 e 18 °C, a cultura se estabeleceu em regiões cujo clima se assemelha àquele de seu habitat, mas várias tentativas de aclimação em países de clima temperado fracassaram, porque a planta não chegou a formar raízes comestíveis (CASALI; SEDIYAMA, 1997).

Essa hortaliça recebe várias denominações de acordo com a região onde ela é cultivada, como as seguintes: baroa ou batata-baroa (Rio de Janeiro, Espírito Santo, Zona da Mata mineira), mandioquinha ou mandioquinha-salsa (São Paulo), fiuza ou batata-fiuza (Lavras e região), batata-salsa (Paraná e Santa Catarina), cenoura-amarela (Barbacena e região), dentre outras. No meio científico, tenta-se uniformizar a denominação para mandioquinha-salsa (SANTOS et al., 1991; CARMO et al., 1996).

Pereira (1997) afirma que a mandioquinha-salsa é um alimento essencialmente energético, e em relação aos demais nutrientes, os teores de carboidratos (amido e açúcares totais) se destacam. Destes, cerca de 80 % correspondem a amido e 6 % a açúcares totais. As proteínas são incompletas, como ocorre em outras raízes e tubérculos, devido à deficiência da maioria dos aminoácidos essenciais. Das vitaminas presentes, a niacina e a vitamina A são as mais importantes, mas também suas raízes são ricas em vitaminas do complexo B (riboflavina e piridoxina) (MONTEIRO et al., 1993). Dos carotenóides, o betacaroteno corresponde à maior fração. É excelente fonte de cálcio, fósforo e ferro. Comparando-se os teores desses minerais com as necessidades diárias de consumo de crianças, adultos, gestantes e nutrízes, Pereira (1997) conclui que o consumo diário de 100 g de mandioquinha-salsa seria o suficiente para suprir as necessidades desses minerais. Devido a estes fatores, a sua alta digestibilidade (baixo teores de amilopectina e ausência total de fatores antinutricionais) e propriedades diuréticas, é especialmente recomendada na alimentação de crianças, pessoas idosas e convalescentes (AVELAR FILHO, 1989).

A mandioquinha-salsa é muito apreciada pelas características organolépticas que confere às sopas que com ela se faz, sendo assim muito utilizada no inverno, na forma de sopas e cremes, mas é utilizada em outras inúmeras formas, como

fritas fatiadas, com frango caipira, purê, pães doces e salgados (MONTEIRO et al., 1993).

A produção concentra-se na América do Sul, especialmente no Brasil, Colômbia, Venezuela e Equador, e em menor escala, no Peru e Bolívia, sendo também esporadicamente cultivada na América Central (HERMANN, 1997).

Não há informações precisas sobre a produção brasileira de mandioquinha-salsa em virtude do sistema de comercialização empregado, sem passar pelas centrais atacadistas em sua maioria. Estima-se que a produção brasileira seja de aproximadamente 200 mil toneladas em uma área próxima de 16 mil hectares. Entretanto, com os elevados preços nos últimos meses, tem-se observado aumento muito significativo nos plantios ou na intenção de plantio para início do próximo ano, em que vários produtores tem previsão de dobrar a área atual (MADEIRA; CARVALHO, 2013).

A mandioquinha-salsa é uma hortaliça considerada como alternativa, não convencional, e seu produto mais valioso são as raízes (VIEIRA; CASALI, 1997). De acordo com Henz (2002), esta cultura apresenta mercado cativo e crescente, por ser um produto saudável, condição que deve ser preservada e melhor explorada, adequando facilmente a sistemas orgânicos de produção em função de sua rusticidade. Apesar da rusticidade, perdas economicamente significativas podem ocorrer quando cuidados básicos de manejo da cultura não são tomados, dentre eles, os mais críticos são o cultivo repetido no mesmo terreno, utilização de mudas de má qualidade, cultivo em condições climáticas desfavoráveis para a cultura, preparo do solo/adubação inadequados e irrigação feita sem controle, principalmente com excesso de água (LOPES; HENZ, 1997).

Segundo Orílio (2007), uma das principais medidas para se recuperar a produtividade em campo é a utilização de mudas originárias de matrizes livres de vírus, e isso também contribuiria para a redução da pressão de inóculo ao longo do tempo. Assim, o produtor passaria a ter um maior incremento produtivo, melhorando o custo/benefício, havendo também a melhoria da qualidade das raízes comerciais.

4.2. Principais viroses em mandioquinha-salsa

Está comprovado que alguns vírus são fator limitante em culturas de propagação vegetativa. O controle de viroses é realizado através de sua erradicação no material que servirá para sua propagação e mediante o uso de variedades resistentes (LIZÁRRAGA, 2000).

Há relatos de ocorrência de sete vírus infectando mandioquinha-salsa nos países de origem e apenas uma espécie descrita no Brasil. Duas espécies pertencentes ao gênero *Nepovirus*, o *Arracacha virus A* (AVA), descrito por Jones e Kenten (1978) e *Potato black ringspot virus - arracacha* (PBRSV-A), descrito por Lizárraga et al. (1994); *Arracacha virus B* (AVB) pertencente ao gênero *Cheravirus* descrito por Kenten; Jones (1979), *Arracacha virus Y* (AVY) e *Arracacha latent virus* (ALV) descritos por Brunt et al. (1996), espécies tentativas dos gêneros *Potyvirus* e *Carlavirus* respectivamente. Lizárraga (2000) cita mais dois vírus tentativa em mandioquinha-salsa: *Arracacha potyvirus 1* (AP-1) (*Potyvirus*) e *Arracacha carlavirus 3* (AV-3) (*Carlavirus*) que poderiam estar relacionados com AVY e ALV, respectivamente. No Brasil há relato de apenas um vírus em mandioquinha-salsa pertencente ao gênero *Potyvirus*, o *Arracacha motlle virus* (AMoV), descrito por Orílio (2007).

4.2.1. Gênero *Nepovirus*

Arracacha virus A (AVA) foi naturalmente encontrado infectando mandioquinha-salsa na região dos Andes peruanos. É um vírus pertencente ao gênero *Nepovirus* e que possui partículas isométricas de 26 nm de diâmetro, com um perfil hexagonal. Estudos realizados mostraram que o AVA não foi transmitido pelo afídeo *Myzus persicae*, a exemplo do que ocorre com membros do gênero *Nepovirus*, provavelmente sua transmissão ocorra por meio de algum nematóide. Mas pode ser facilmente transmitido através de extratos vegetais para uma ampla gama de hospedeiras, as quais as melhores transmissões observadas foram para *Chenopodium quinoa* e *Chenopodium clevelandii*, causando sintomas de necrose apical (JONES; KENTEN, 1978).

Um outro vírus isométrico pertencente também ao gênero *Nepovirus* é uma variante do *Potato black ringspot virus* e foi isolado de mandioquinha-salsa na região andina. Os sintomas na mandioquinha-salsa se apresentam na forma de deformação foliar e mosaico. Sua transmissão ocorre via sementes e por extratos vegetais, principalmente para *Chenopodium quinoa*, causando lesões necróticas locais e sistêmicas (LIZÁRRAGA, 2000).

4.2.2. Gênero *Cheravirus*

Arracacha virus B (AVB), pertence ao gênero *Cheravirus*. Foi isolado pela primeira vez a partir de mandioquinha salsa no Peru, (KENTEN; JONES, 1979). Uma diferente cepa foi encontrada posteriormente em Oca (*Oxalis tuberosa*) (Jones; Kenten, 1981) e batata (*Solanum tuberosum*) e foi nomeado estirpe de Oca (JONES, 1981). Devido a sua capacidade de infectar a batata, através de sementes, pólen e tubérculos, em 1984 a estirpe de oca de AVB foi incluído na lista de quarentena A1 (EPPO, 1984), embora não seja considerado de grande risco para a produção.

AVB é um vírus de RNA de fita simples, constituído por partículas isométricas de aproximadamente 26nm de diâmetro. Pode ser transmitido por extratos vegetais para uma ampla gama de hospedeiras, como *Chenopodium amaranticolor*, causando lesões cloróticas locais. Sua transmissão ocorre também por sementes e a transmissão por vetor ainda é desconhecida (KENTEN; JONES, 1979).

4.2.3. Gênero *Carlavirus*

Arracacha latent virus (ALV) é uma espécie tentativa do gênero *Carlavirus* e ocorre em mandioquinha-salsa, no entanto sem causar sintomas, ou seja, ocorre de forma latente. É um vírus não envelopado, com simetria helicoidal, partícula viral com 650 nm de comprimento, genoma monopartido com uma molécula de RNA fita simples. Esse vírus pode se transmitido por extratos vegetais para uma ampla gama de hospedeiras, como *Nicotiana clevelandii*, *Gomphrena globosa*, *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana megalosiphon*, etc., causando sintomas que variam entre lesões locais e cloroses sistêmicas. Está distribuído na Bolívia e no Peru (ICTVdB Management, 2006b).

Arracacha carlavirus 3 também é uma espécie tentativa desse gênero, e os sintomas em mandioquinha-salsa, ocorrem na forma de um suave mosaico. Sua transmissão é feita por afídeo e através de extratos vegetais, principalmente para a espécie *Chenopodium quinoa*, causando lesões cloróticas locais e sistêmicas (LIZÁRRAGA, 2000).

4.2.4. Gênero *Potyvirus*

O gênero *Potyvirus* pertence a família *Potyviridae*, e é o mais estudado da família, tendo 146 espécies já caracterizadas. São vírus compostos de RNA de fita simples, sentido positivo (KING et al., 2012). A família *Potyviridae*, constitui a maior e economicamente mais importante família de vírus de plantas, com uma ampla gama de hospedeiros que englobam dicotiledôneas e monocotiledôneas (HULL, 2002; KING et al., 2012).

Essa família é formada por vírus que têm partículas alongadas e flexuosas, não envelopadas, medindo de 11 a 15 nm de largura. Os comprimentos das partículas virais variam entre os gêneros. Espécies com genoma monopartido variam de 650 a 900 nm de comprimento e espécies com genoma bipartido, possuem partículas de tamanhos 250 a 300 nm e 500 a 600 nm de comprimento (SHUKLA et al., 1994; FAUQUET et al., 2005). O genoma é envolvido pelo capsídeo, de formato alongado e flexuoso, constituído por aproximadamente 2200 cópias de uma proteína capsidial com massa molecular em torno de 34 kDa. A proteína capsidial dos potyvirus apresenta uma extremidade amínica altamente variável em tamanho e sequência, uma região central altamente conservada, contendo de 215 a 227 aminoácidos e uma extremidade carboxílica de 18 a 20 aminoácidos. As duas extremidades, amino-e-carboxi-terminal, estão expostas para o exterior da partícula viral e são responsáveis pelas propriedades antigênicas da proteína e conseqüentemente, da partícula viral (SHUKLA et al., 1991).

O genoma viral é constituído por uma molécula de RNA de fita simples, em torno de 10.080 nucleotídeos, senso positivo, apresentando uma única fase aberta de leitura (Open Reading Frame, ORF) que dá origem a uma poliproteína com aproximadamente 350 kDa. A partir da poliproteína, pelo menos 8 proteínas (P1, HC-Pro, P3, CI, 6K2, NIa, NIb e CP) (Figura 2) são produzidas através da atividade enzimática de 3 proteinases contidas na própria poliproteína (P1, HC-Pro, e NIa) e uma

proteína incorporada na região codificadora para a proteína P3, denominada PIPO (Pretty Interesting Potyviridae ORF), que também está relacionada ao movimento do vírus (CHUNG et al., 2008; KING et al., 2012). A ORF é traduzida na fase +2 e sua expressão ocorre pela fusão da proteína P3 na região N-terminal (P3N-PIPO). Essas proteínas incluem a replicase viral, proteínas de movimento célula-a-célula e a longa distância, proteínas responsáveis pela transmissão por afídeos e a proteína capsidial (PRUSS et al., 1997; SHUKLA et al., 1994; VERCHOT; CARRINGTON, 1995b). A proteína CI forma inclusões cilíndricas denominadas “cata-vento”, que é uma característica taxonômica importante de espécies classificadas do gênero *Potyvirus* (MURPHY et al., 1991). Já a proteína Nib (Nuclear inclusion b), forma inclusões nucleares, assim como a proteína Nia (Nuclear inclusion a - VPg-Pro) (URCUQUI-INCHIMA et al, 2001).

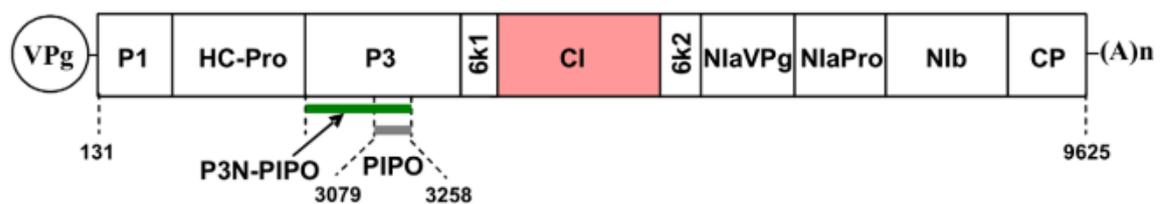


Figura 2. Representação esquemática da organização e expressão do genoma de um potyvirus. A proteína viral VPg se liga a extremidade 5' e a cauda poli-A se liga na extremidade 3'. A ORF dá origem a uma poliproteína que ao sofrer clivagem gera diferentes proteínas (P1, HC-Pro, P3, CI, 6K2, NIa, Nib e CP) e mais as proteínas PIPO e P3N-PIPO. A proteína NIa ainda pode sofrer uma clivagem adicional, gerando as proteínas VPg e Pro, isso depende da espécie viral. (Adaptado de Wei, et al., 2010).

Arracacha virus Y (AVY) espécie tentativa do gênero *Potyvirus*, possui partícula flexuosa de 750 nm de comprimento e 12 nm de diâmetro. Plantas de mandioquinha-salsa infectadas com este vírus apresentam sintoma de clorose nas folhas. Possui uma ampla gama de hospedeiros, sendo transmitido por extratos vegetais para plantas das famílias *Chenopodiaceae*, *Solanaceae*, *Tetragoniaceae* e *Umbelliferae*, causando uma variedade de sintomas. Sua transmissão também se dar por meio do vetor afídeo, *Myzus persicae* e *Aphis gossypii*, de maneira não persistente. Este vírus ocorre no Peru (ICTVdB Management, 2006a).

Arracacha potyvirus 1 (AP-1), membro tentativa do gênero *Potyvirus*, infecta mandioquinha-salsa, onde os sintomas ocorrem na forma de clorose foliar. É um vírus filamentosso, não envelopado, geralmente flexuoso, medindo 750 nm de comprimento e 12 nm de largura. Pode ser transmitido pelo vetor afídeo, *Myzus persicae* e *Aphis gossypii* e por extratos vegetais para várias espécies vegetais, como *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *N. clevelandii*, *N. benthamiana*, etc. Ocorre no Peru (BRUNT et al., 1996).

O único relato de uma espécie de vírus infectando mandioquinha-salsa no Brasil é o *Arracacha mottle virus* (AMoV), um distinto membro pertencente ao gênero *Potyvirus*. O isolado AMoV C17 tem um genoma de RNA de sentido positivo, com 9630 nucleotídeos (nt), excluindo a cauda poli A. A sua organização genômica é típica de potyvirus, contendo uma fase de leitura aberta (ORF) e a proteína P3N-PIPO. Esse vírus foi isolado de mandioquinha-salsa e sua morfologia, propriedades biológicas, sorológicas e sequências 3' terminal foram determinadas através do isolado C17, provenientes de plantas de mandioquinha-salsa com sintomas de viroses em Brasília, DF. Pode ser transmitido por afídeo (*Hyadaphis foeniculi*) e através de extratos vegetais para as indicadoras *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Nicotiana benthamiana* e *Apium graveolens* causando sintomas que variam entre deformação foliar, bolhosidades, lesão local, mosaico e clareamento de nervuras (ORÍLIO, 2007; ORÍLIO et al., 2013).

Alguns fatores podem afetar o padrão de disseminação e a severidade da doença nas culturas. Dentre esses fatores, a proximidade de fontes contendo vírus, o número, a atividade e a ocorrência de vetores de forma alada são os mais importantes. Os potyvirus não sobrevivem em folhas mortas ou em hospedeiros debilitados, nem por longos períodos no vetor (HOLLINGS; BRUNT, 1981a).

As transmissões realizadas por afídeos às espécies virais pertencentes ao gênero *Potyvirus*, ocorrem de forma natural e de maneira não-persistente (não-circulativa). Isto implica em um período de aquisição curto de alguns segundos a poucos minutos, um curto período de retenção inferior a uma hora e ausência de um período de latência. Nesse tipo de transmissão, um período de jejum para pré-aquisição aumenta a eficiência de transmissão. Um período de aquisição superior a cinco minutos diminui esta eficiência (DELGADO-SANCHEZ; GROGAN, 1970; HOLLINGS; BRUNT, 1981b).

Características como gama de hospedeiros, sintomatologia, morfologia de inclusões citoplasmáticas e sorologia constituíram durante vários anos os principais critérios para a classificação de espécies e estirpes de potyvirus. Apesar destas características terem desempenhado papel significativo na disseminação do relacionamento taxonômico entre muitos potyvirus, elas por si só não fornecem uma solução adequada para a identificação de espécies e estirpes no gênero como um todo, devido à intensa variação biológica e antigênica observada entre membros do gênero (SHUKLA et al., 1994).

Um dos principais critérios adotados pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) para a designação de novas espécies para o gênero *Potyvirus* é a comparação da sequência de aminoácidos da capa proteica inferior a 80%, identidade da sequência de nucleotídeos inferior a 76% na sequência completa da proteína capsidial ou em relação ao genoma viral; presença de diferentes sítios de clivagem na poliproteína; análise da gama de hospedeiros e o modo de transmissão (KING et al., 2012; BERGUER, et al., 2005).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Levantamento

5.1.1. Coleta das amostras

Amostras de tecido foliar sintomáticas e assintomáticas de mandioquinha-salsa foram coletadas, acondicionadas em embalagens individuais, identificadas e enviadas ao Laboratório de Virologia do Departamento de Proteção de Plantas da Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP de Botucatu, no qual foram analisadas por testes moleculares e sorológicos. As amostras são provenientes dos estados de Goiás, Minas Gerais e Paraná, dos municípios de Campo Alegre, Senador Amaral e Piraquara, respectivamente. Ainda foi nos enviada amostras pela Empresa Tecnoplanta (Paraná) provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa/Brasília. Foram realizadas coletas em diferentes épocas (Tabela 1). Seis amostras de mandioquinha-salsa cultivares Comum e Amarela de Senador Amaral provenientes de Senador Amaral, foram plantadas em vasos e mantidas em casa de vegetação para preservação do isolado.

Tabela 1. Número de amostras de mandioquinha-salsa analisadas, períodos de coleta e localidade.

Coletas	N° de amostras	Período das coletas	Local
1	45	03/2012	Piraquara/PR
2	60	05/2012	Brasília/ DF
3	6	07/2012	Campo Alegre/GO
4	73	12/2012	Piraquara/PR
5	6	02/2013	Senador Amaral/MG
6	41	05/2013	Piraquara/PR
7	10	10/2013	Senador Amaral/MG
Total	241		

5.2. Análise das amostras

5.2.1. Microscopia eletrônica

Essa técnica foi utilizada para a detecção de potyvirus e na tentativa de encontrar partículas diferentes de outros vírus. Inicialmente folhas novas e frescas de mandioquinha-salsa preservadas em casa de vegetação (6 amostras) com sintomas de mosaico (Figura 3) foram cortadas em pedaços finos e pequenos com lâmina previamente esterilizada, e imersos em fixador (Karnovisk) e então levados para o Departamento de Microscopia Eletrônica da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” Instituto de Biociências (IB) para o preparo das telinhas. Posteriormente essas amostras foram levadas ao Departamento de Microscopia Eletrônica da Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) para análise em microscópio eletrônico de transmissão.

Fotos: Sousa, C. M. 2014



Figura 3. A, B, C e D. Plantas de mandioquinha-salsa com sintomas de mosaico mantidas em casa de vegetação, (A) cultivar Amarela de Senador Amaral, (B) cv. Comum, (C) cv. Amarela de Senador Amaral e (D) cv. Comum, enviadas para microscopia eletrônica de transmissão.

5.2.2. Identificação Sorológica

5.2.2.1. Análise para potyvirus pelo teste de ELISA-Indireto

Para auxiliar na detecção de potyvirus nas amostras coletadas, foi utilizado o teste de ELISA-indireto, através do uso de um antissoro policlonal universal anti-potyvirus (Agdia). Inicialmente as amostras foram maceradas em tampão de extração Indirect Sample Extraction (1,59g de Na_2CO_3 , 2,93g de NaHCO_3 , 0,2g de NaN_3 , 20g de polyvinylpyrrolidona (PVP) dissolvidos em 1000 mL de água destilada). Cem microlitros do macerado foi adicionado às cavidades das placas e incubados por 2 horas em temperatura ambiente. Após esse período a placa foi então lavada por 7 vezes em tampão PBS-Tween (NaCl (8,0g), Na_2HPO_4 (1,5g), KH_2PO_4 (0,2g), KCl (0,2g), Tween 20 (500 μL) dissolvidos em 1000 mL de água destilada obtendo uma solução final com pH 7.4). Em seguida foi adicionado o anticorpo, na diluição (1:200) em ECI

Buffer (20g de Polyvinylpyrrolidona (PVP), 2,0g de albumina bovina, 0,2g de NaN₃) e incubado por 16 horas à 4°C, seguido de lavagem por 7 vezes com tampão PBS-Tween. Posteriormente foi adicionado o conjugado, diluído em ECI Buffer (1:200), e incubou-se por 2 horas, seguido de lavagem por 7 vezes em tampão PBS-Tween. A revelação foi feita utilizando a enzima p-nitrofenilfosfato (1,0 mg/mL) diluída em 5 mL de tampão Tris 0,2 M (Sigma). Após 60 minutos, a leitura da placa foi efetuada em leitor automático de microplaca, em absorvância de 405 nm. Amostras foram consideradas positivas quando o valor de absorvância foi de pelo menos duas vezes maior do obtido para as plantas sadias.

5.2.3. Caracterização Biológica

5.2.3.1. Teste de gama de hospedeiras

A caracterização biológica foi feita utilizando plantas de *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *N. benthamiana*, *N. tabacum* (TNN), *N. occidentalis*, *N. rustica*, *N. clevelandii*, *Capsicum* spp. e *Daucus carota*. Dezenove isolados já positivos em ELISA para potyvirus foram inoculados utilizando-se extrato vegetal.

O tecido foi macerado com o auxílio do tampão Fosfato de Potássio 0,05M pH 7,0 e com o abrasivo carborundum (600 mesh). Após a inoculação as plantas foram imediatamente lavadas com água corrente e mantidas em casa-de-vegetação para a observação dos sintomas.

A avaliação dos sintomas foi realizada a cada sete dias, durante 30 dias. Esse teste foi repetido por três vezes. As plantas positivas no teste Elisa foram submetidas ao teste molecular.

5.2.4. Extração de RNA total

As amostras de mandioquinha-salsa foram testadas por dois métodos de extração.

O primeiro método foi descrito por Bertheau et al., (1998), onde as folhas foram maceradas (1:5 p/v) em tampão PBS-Tween contendo PVP K25 a 2 %

(p/v) e Na-DIECA 20 mM, e submetidas a centrifugação em tubos de microcentrífuga por 10 minutos a 13.000 rpm (Centrífuga Eppendorf 5804 R). Duzentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, acrescentando-se SDS a 1 %, seguido de incubação por 15 minutos a 55°C. Após isso, foram adicionados 100 µL de solução de acetato de potássio a 3M e seguiu-se a agitação da solução. Posteriormente as amostras foram incubadas em gelo por 5 minutos e em seguida centrifugadas por 5 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionando-se 700 µL de NaI 6 M e 5 µL de uma solução contendo silício. Agitou-se bem a solução e foi mantida durante 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida a solução foi centrifugada por um minuto a 5.000 rpm, o sobrenadante descartado e o 'pellet' lavado duas vezes com 500 µL de Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM e igual volume de etanol absoluto. Após centrifugação por 1 minuto a 5.000 rpm, o 'pellet' foi seco a vácuo (Speed Vacum Eppendorf Concentrator 5301) e o RNA ressuspendido em 400 µL de água Milli-Q tratada com DEPC, seguido de incubação por 5 minutos a 55°C e centrifugação por 5 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante (300 µL) foi então transferido para um novo tubo e armazenado a -20°C. Uma alíquota de 5 µL foi utilizada para a RT-PCR.

O outro método utilizado para a extração do RNA viral foi pelo kit de extração Total RNA Purification, da marca Norgen. Transferiu-se aproximadamente 50 mg de tecido vegetal para um cadinho e adicionou-se nitrogênio líquido para a trituração das folhas. Após a evaporação do nitrogênio, adicionou-se 600 microlitros de Lysis Solution e prosseguiu a mistura. A solução foi então transferida para um microtubo RNase-free, seguida de centrifugação por 2 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo RNase-free e foi adicionado igual volume de etanol 70%, seguido de agitação. A coluna então foi montada e 600 mL do lisado com o etanol foi adicionado, seguindo a centrifugação por 1 minuto a 13.000 rpm. O líquido que passou pela coluna foi descartado e a coluna foi montada novamente, onde foi adicionado 400 µL de Wash Solution à coluna seguido de centrifugação por 1 minuto a 13.000 rpm (esse passo foi repetido por três vezes). O líquido que passou foi descartado, a coluna foi remontada e posta para centrifugar por 2 minutos a 13.000 rpm para secar a resina. Posteriormente a coluna foi colocada em tubo de 1.7 mL fornecido pelo kit, onde para eluir adicionou-se 50 µL de Elution Solution à coluna, onde foi centrifugado por 2 minutos a 2.000 rpm, seguido de centrifugação por

1 minuto a 14.000 rpm. O RNA foi armazenado a -20°C. Uma alíquota de 5 µL foi utilizada para a RT-PCR.

5.2.5. Caracterização Molecular

5.2.5.1. Análise Molecular para o gênero *Potyvirus*

Para a detecção de potyvirus foram utilizados os pares de oligonucleotídeos W-CIEN (5' ATG GTT TGG TGY ATY GAR AAT 3') e PV-1 (5' GAT TTA GGT GAC ACT ATA GTT TTT TTT TTT TTT TTT 3') que amplificam parcialmente a proteína CP, descritos por Pappu et al. (1993) e Gibbs; Mackenzie (1997), respectivamente.

A reação de RT-PCR foi realizada em somente uma etapa, utilizando kit de PCR Master Mix da marca PROMEGA. Para um volume de 25 µL adicionou-se: 12,5 µL de tampão Master Mix, 1 µM de cada oligonucleotídeo, 0,05 µL da enzima transcriptase reversa AMV (*Avian myeloblastosis virus*, marca Promega a 15 unidades/ µL), 3,5 de RNA e 8,45 µL de água livre de RNAses.

O ciclo utilizado para o par de primer WCIEN e PV1 consistiu em 30 minutos a 42 °C, 95 °C durante 5 minutos, 94 °C por 2 minutos, 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 45 segundos, 72 °C por 55 segundos, 94 °C por 30 segundos, 57 °C por 45 segundos, 72 °C por 55 segundos, 94 °C por 30 segundos, 54 °C por 45 segundos, 72 °C por 55 segundos, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 54 °C por 45 segundos, 72 °C/55 segundos, seguido de extensão final de 68 °C durante 7 minutos.

5.2.5.2. Análise molecular para o gênero *Nepovirus*

Foi realizado teste molecular para nepovirus, utilizando os oligonucleotídeos, ComF1 (5'-ACI WSI GAR GGI TWY CC-3'), ComR2 (5'-AVR TTR TCR TCI CCR TA, ComNeF3 (5'-TAC GWS GGA RGG GTW YCC-3'), ComNeR5 (5'- AVR TTR TCR TCG CCR TAI AC-3') , ComNeR4 (5'-ARR TTR TCR TCG CCR TAI AC-3'), descritos por Maliogka et al. (2004).

Para a reação foram utilizados os kits de PCR Master Mix das marcas PROMEGA e AMPLIQON. Primeiramente foi realizado RT-PCR para um

volume total de 25 μL , com 12,5 μL do master mix, 1 μM de cada primer (ComF1 e ComR2), 0,05 μL de AMV, 9,45 μL de água e 2,5 μL de RNA. A reação foi então levada ao termociclador, utilizando os seguintes ciclos: 30 minutos a 42°C, 2 minutos a 94°C, 5 ciclos de 95°C por 30 segundos, 40°C por 10 segundos, 37°C por 5 segundos, 72°C por 30 segundos, 35 repetições a 95°C por 50 segundos, 42°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, e extensão final de 72°C por 10 minutos. Com o produto da RT-PCR, foi realizado o Nested-PCR para melhorar a especificidade, utilizando três primers, com 12,5 μL do Master Mix, 1 μM de cada primer (ComNeF3, ComNeR5 e ComNeR4), 1 μL do DNA e 10,75 μL de água para completar um volume de 25 μL . A reação consistiu de um ciclo a 94°C/ 2 minutos, 3 ciclos de 95°C/30 segundos, 48°C/30 segundos, 72°C/20 segundos, 35 ciclos de 95°C/50 segundos, 50°C/1 minuto, 72°C/1minuto, seguido de extensão final de 72°C por 10 minutos.

5.2.5.3. Obtenção de oligonucleotídeos específicos para o gênero *Cheravirus*

Foram desenhados primers específicos para a espécie Arracacha virus B, através de um alinhamento múltiplo de espécies disponíveis no Genbank, utilizando o programa MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). A construção desses primers foi baseada na região codificadora para a capa protéica do vírus. Os oligonucleotídeos desenhados para cheravirus foram: ACHER1S, ACHER1A, obtendo um fragmento esperado de 450pb, e o par ACHER2S e ACHER2A, amplificando um fragmento de aproximadamente 750 pb. As sequências dos oligonucleotídeos estão descritas na Tabela 2.

Para a reação de RT-PCR foram testados os kits PCR Master Mix das marcas Promega e Ampliqon. Para uma reação com volume final de 25 μL , foram utilizados 12,5 μL do Master mix, 1 μM de cada primer, 0,05 de AMV, 2,5 μL do RNA e 9,45 μL de água para completar o volume final.

Para a RT-PCR foi utilizado os seguintes ciclos: 42°C por 30 minutos, 94°C por 2 minutos, 39 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, seguido de polimerização de 72°C por 10 minutos.

Tabela 2. Primers utilizados para a tentativa de amplificação de chervirus em mandioquinha-salsa, com suas respectivas sequências e tamanho esperado do fragmento amplificado.

Oligonucleotídeo	Sequência	Tamanho do fragmento
ACHER1S (Senso)	5'-GGA GGT ATA CCT GGC GAC TGG-3'	450 pb
ACHER1A (Anti-senso)	5'-CCC TGT GCC TCA TCC TGCC-3'	450 pb
ACHER2S (Senso)	5'-CCT GAG TGG GGC TTA TAC GCG-3'	750 pb
ACHER2A (Anti-senso)	5'-GCG CCT ATG GCG CAT GAA CTG-3'	750 pb

5.3. Análise do PCR em gel de agarose

Foram retirados 5 µL da reação de RT-PCR ou PCR para análise em gel de agarose a 1% em tampão TBE (0,1 M de ácido bórico, 0,02 mM EDTA pH 8,3). Utilizou-se o marcador 1Kb Ladder Plus da Invitrogen. O gel foi corado com GelRed™ (Biotium) e assim, visualizado em transiluminador.

5.4. Purificação do Produto de PCR

Fragments virais amplificados pelos primers WCIEN e PV1 foram selecionados para sequenciamento. Para isso, os fragmentos foram purificados a partir do gel de agarose com os Kits Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) ou pelo QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen). Após a purificação os produtos foram quantificados utilizando-se o marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) e enviados para sequenciamento.

5.5. Sequenciamento do fragmento viral amplificado

Os produtos obtidos foram enviados para sequenciamento para a empresa MacroGen (Seoul, Korea) ou Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências (IB).

As amostras sequenciadas foram analisadas pelo programa ‘NCBI BLAST’ ([http:// http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) e Clustal W (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) e a construção da árvore filogenética foi realizada no programa MEGA 4.0.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. Análise por Microscopia Eletrônica

Para o teste de microscopia eletrônica, das seis amostras que foram analisadas, em pelo menos duas foi possível observar partículas alongadas típicas de potyvirus. Não foi possível observar partículas diferentes de possíveis outros vírus. Vale salientar que das plantas analisadas, todas apresentavam sintomas típicos causados por vírus (Figura 4A e 4B).



Figura 4. A e B. Plantas de mandioquinha-salsa com sintomas de mosaico.

6.2. Teste de gama de hospedeiras

Para o teste de gama de hospedeiras foram testadas nove espécies de plantas para cada amostra. Foram selecionadas dezenove amostras já positivas em ELISA para potyvirus e cada uma foi inoculada via extrato vegetal em cada uma das nove espécies.

Das nove espécies testadas, foram observados sintomas somente em *C. amaranticolor* (Figura 5A), *C. quinoa* (Figura 5B), e *N. benthamiana* (Figura 5C) (Tabela 3). Essas plantas foram submetidas ao teste de ELISA Indireto, onde foi confirmada a infecção por potyvirus. No entanto, as mesmas também foram submetidas a RT-PCR para o mesmo vírus, e apenas a *N. benthamiana* reagiu positivamente, a qual foi sequenciada e confirmado a identidade de nucleotídeos de 97% com o *Arracacha mottle virus* (AMoV), descrito por Orílio, 2007.

Tabela 3. Espécies indicadoras testadas e os respectivos sintomas causados.

Plantas Indicadoras	Sintomas observados nas indicadoras testadas
<i>C. amaranticolor</i>	Lesões cloróticas sistêmicas (LCS)
<i>C. quinoa</i>	Lesão local clorótica (LLC)
<i>N. benthamiana</i>	Deformação foliar, mosaico e bolhosidade (DF, Mo, B)
<i>N. occidentalis</i>	Sem sintoma (SS)
<i>N. clevelandii</i>	Sem sintoma (SS)
<i>N. tabacum</i> (TNN)	Sem sintoma (SS)
<i>N. rustica</i>	Sem sintoma (SS)
<i>Daucus carota</i>	Sem sintoma (SS)
<i>Capsicum spp.</i>	Sem sintoma (SS)

Fotos: Sousa, C. M. 2014

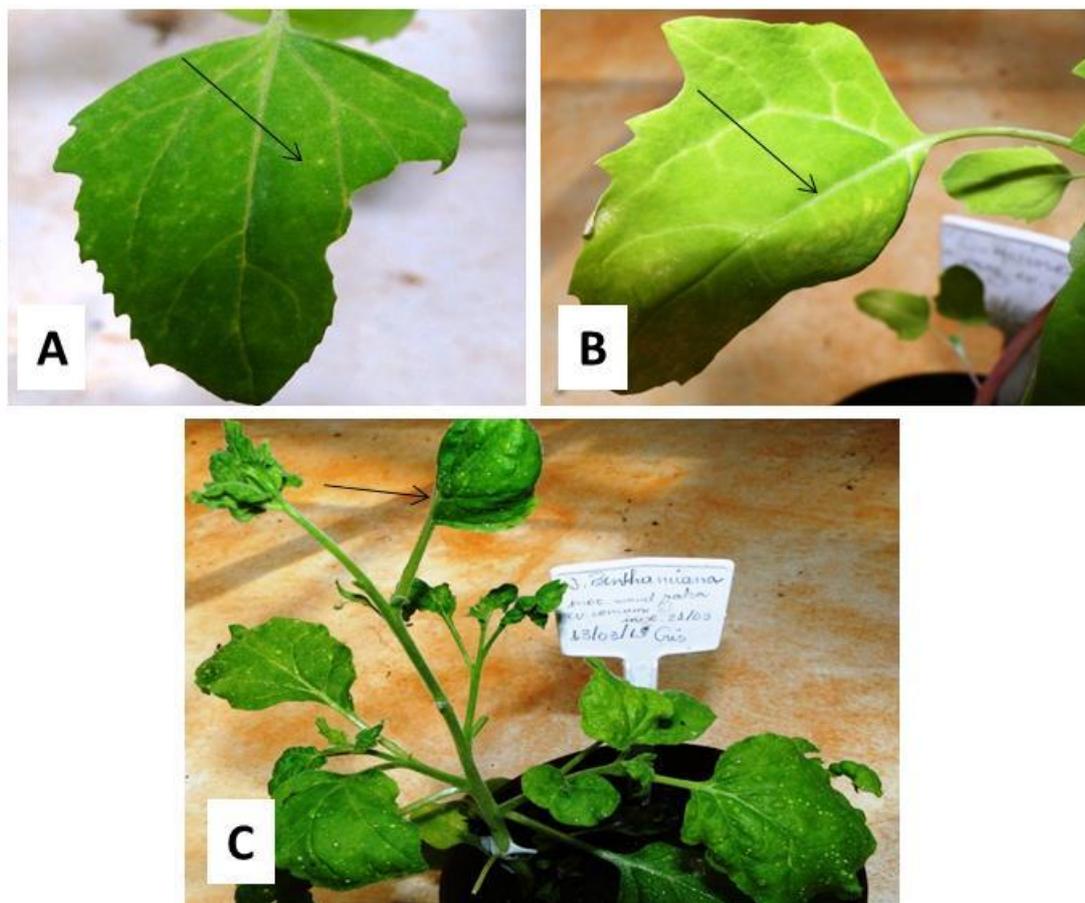


Figura 5. Sintomas apresentados nas plantas indicadoras inoculadas. (A) *C. amaranticolor*, apresentando sintomas de lesões cloróticas sistêmicas (B) *C. quinoa* com lesão local clorótica e (C) *N. benthamiana* com deformação foliar, mosaico e bolhosidade.

Segundo Orílio (2007), o AMoV tem gama de hospedeira bastante restrita, verificando-se infecção em apenas quatro hospedeiras (*C. amaranticolor*, *N. benthamiana*, *C. quinoa* e *Apium graveolens*) de 17 espécies testadas. Os sintomas foram similares aos observados neste trabalho.

6.3. Teste para o gênero *Nepovirus*

O teste de RT-PCR para nepovirus, apesar de ter gerado um fragmento de 750pb (Figura 6) de tamanho esperado, não se tratava de fragmento viral e sim genoma da planta.

Em trabalho realizado por Maliogka et al., (2004), com a utilização desses primers usados nesse trabalho, que são degenerados para três gêneros, *Fabavirus*, *Comovirus* e *Nepovirus*, foi possível fazer a detecção de seis vírus (*Arabidopsis mosaic virus*

(ArMV), *Potato black ringspot virus* (PBRSV), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Cherry leafroll virus* (CLRV), *Broad bean wilt virus 2* (BBWV-2), *Squash mosaic virus* (SqMV) e um vírus tentativa, *Arracacha virus B* (AVB), ainda classificado dentro do gênero *Nepovirus*, hoje pertencente ao gênero *Cheravirus*.

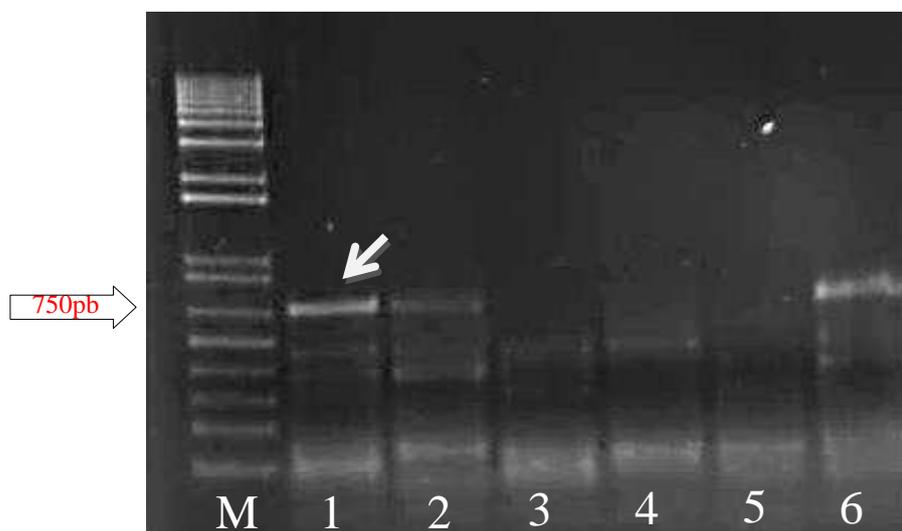


Figura 6. Gel de agarose a 0,8% obtido a partir do teste para nepovirus. M: Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder; 1 a 6, amostras e mandioquinha-salsa.

6.4. Teste dos oligonucleotídeos obtidos para o gênero *Cheravirus*

A exemplo do que ocorreu com o teste para nepovirus, após os testes com os dois pares de primers desenhados para esse vírus, o par de primer ACHER1S e ACHER1A, amplificaram um fragmento de aproximadamente 450pb como esperado (Figura 7), o que não aconteceu com o par de primers ACHER2S e ACHER2A. Fragmentos foram selecionados e sequenciados, no entanto também foi amplificado cloroplasto da planta.



Figura 7. Gel de agarose obtido a partir do teste para chervirus. Um fragmento de aproximadamente 450 bp foi obtido. M: Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder; 1 a 6, amostras de mandioquinha-salsa.

6.5. Testes para detecção de potyvirus por RT-PCR e ELISA Indireto

Foram testados dois métodos diferentes de extração de RNA para mandioquinha-salsa (vide item 5.2.4) e o que se mostrou mais eficiente foi o kit de extração Total RNA Purification, da Norgen, que possibilitou amplificação de fragmentos de potyvirus, enquanto que pelo método de Bertheau et al., (1998) plantas positivas foram consideradas falso negativas.

Foram analisadas um total de 241 amostras, das quais 175 foram submetidas ao teste de Elisa Indireto, num total de 32 amostras positivas e 145 foram analisadas por RT-PCR, das quais 30 foram positivas (Quadro 1). O quadro demonstra o número de amostras analisadas pelo número de amostras positivas. Vale ressaltar que, houve amostras que foram testadas pelas duas técnicas (ELISA e PCR) e em algumas vezes apenas as amostras positivas em teste sorológico, foram submetidas ao teste molecular.

Quadro 1. Levantamento de potyvirus nas regiões de Piraquara/PR, Brasília/DF, Campo Alegre/GO e Senador Amaral/MG.

Local da coleta	Período	Microscopia eletrônica	ELISA Indireto	RT-PCR
Piraquara/PR	Março/2012	0/0	45/6	45/11
Brasília/DF	Maio/2012	0/0	0/0	60/7
Campo Alegre/GO	Julho/2012	0/0	0/0	6/4
Piraquara/PR	Dezembro/2012	0/0	73/16	16/4
Senador Amara/MG	Fevereiro/2013	6/2	6/6	6/3
Piraquara/PR	Maio/2013	0/0	41/2	2/1
Senador Amaral/MG	Outubro/2013	0/0	10/2	10/0
Total		6/2	175/32	145/30

Durante a condução do trabalho foi observado que algumas amostras positivas no teste de ELISA, não possibilitaram amplificação de nenhum fragmento em RT-PCR com os primers WCIEN e PV1, indicando que provavelmente deve ter ocorrido reações inespecíficas com o antissoro ou falha na detecção por esses primers. No teste sorológico amostras foram consideradas positivas quando apresentaram um valor de absorbância de 405 nm, duas vezes maior que o controle negativo.

As combinações de primers (WCIEN e PV1) detectaram potyvirus tanto em mandioquinha-salsa quanto em *N. benthamiana*, possibilitando a amplificação de fragmento de aproximadamente 800 pb (Figura 8).

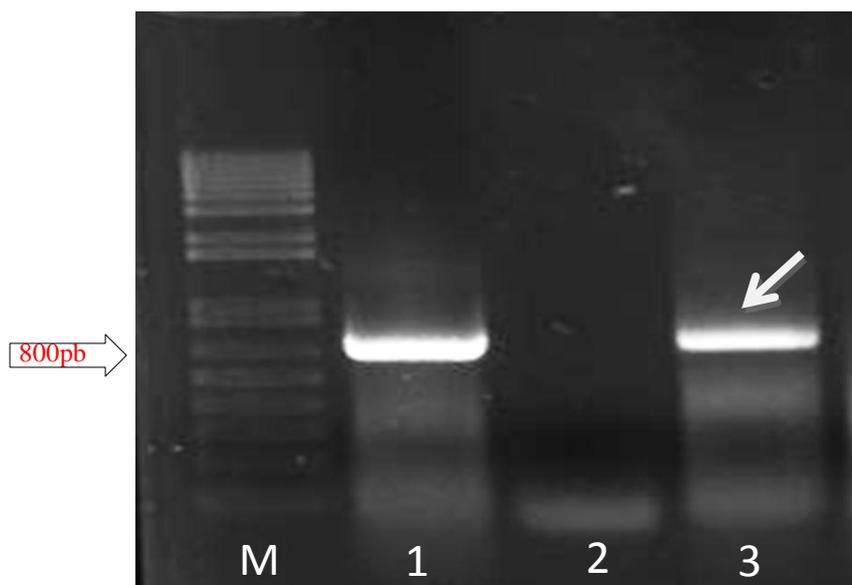


Figura 8. Análise em gel de agarose a 0,8% para o teste de potyvirus. M: Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder; 1: controle positivo; 2: controle negativo e 3: amostra de *N. benthamiana* infectada com potyvirus.

O AMoV foi descrito pela primeira vez no Brasil por Orílio em 2007, em Brasília/DF, sendo classificado como um distinto membro do gênero *Potyvirus*. Foi observado que 93% das amostras provenientes de campo do banco ativo de Germoplasma de mandioquinha-salsa da Embrapa Hortaliças estavam infectadas com esse vírus, revelando sensibilidade também para esse teste. Não se sabe ao certo como esse vírus pôde ter sido introduzido no Brasil, suspeita-se que plantas de mandioquinha-salsa provenientes do centro de origem, região andina, possa já ter vindo infectadas com esse vírus, ou outra hipótese seria que poderiam ter sido infectadas com espécies silvestres ou ervas daninhas já infectadas com esse vírus (ORÍLIO et al., 2013).

O presente estudo detectou a presença do AMoV em pelo menos mais três estados brasileiros (Goiás, Minas Gerais e Paraná), indicando que esse vírus pode estar disseminado pelas regiões produtoras de mandioquinha-salsa no Brasil. A propagação vegetativa dessa planta pode ter facilitado essa disseminação.

6.5.1. Análise da variabilidade genética para potyvirus

Das amostras positivas em RT-PCR, fragmentos de 10 amostras foram selecionados e sequenciados. Foram selecionadas as quatro melhores sequências de nucleotídeos para construção da árvore filogenética. A maior identidade de nucleotídeos (96 a 99%) para a região analisada (porção da proteína capsidial e 3'URT) foi verificada para a espécie *Arracacha mottle virus* isolado C17 (Acesso:DQ925486.2).

A análise filogenética foi realizada utilizando-se as sequências de nucleotídeos dos isolados (Figura 9), com sequências do AMoV e do *Potato virus V* utilizado como outgroup. Pôde-se observar um mesmo padrão filogenético, utilizando-se a sequência de nucleotídeos da região para a proteína capsidial, ou seja, indicando que não houve variabilidade genética entre os isolados, ficando agrupados em um mesmo ramo filogenético.

Foi verificado um alto grau de identidade de nucleotídeos do AMoV com *Zucchini yellow mosaic virus* (78%), *Onion yellow dwarf virus* (78%), *Chickpea yellow mosaic virus* (73%), *Araujia mosaic virus* (69%), *Cataranthus mosaic virus* (73%), *Peru tomato virus* e *Potato virus y* com 71% de identidade cada um.

A análise da identidade de sequência de nucleotídeos apresentou porcentagem de identidade que variou entre 96% e 99% entre os isolados coletados e quando comparadas ao Acesso DQ925486.2 (Quadro 2), Apêndice I.

Orlío et al., (2013) sugerem que o AMoV provavelmente compartilha de uma origem ancestral comum com outros potyvirus presentes em países da América do Sul, onde muitos dos quais infectam os membros da família *Solanaceae* (Subgrupo PVY), em vez de um grupo constituído de Apiáceas.

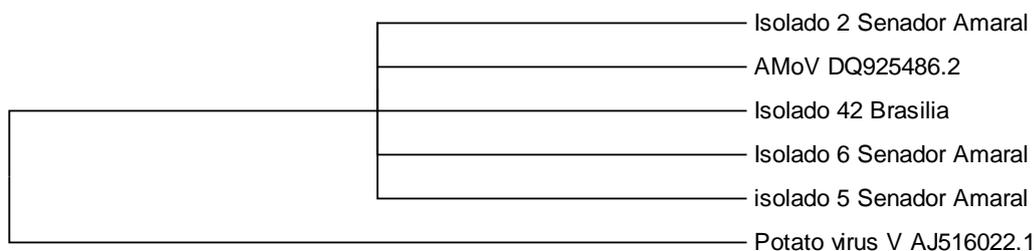


Figura 9. Árvore filogenética obtida pelo programa Mega 4.0 da sequência de nucleotídeos da porção da proteína capsidial de diferentes isolados de AMoV. A árvore foi construída utilizando neighbor joining, com valor de Bootstrap de 2000. *Potato virus V* foi utilizado como outgroup.

Quadro 2. Porcentagem de identidade de nucleotídeos correspondente a região parcial da proteína capsidial de AMoV.

	Isolado 5	Isolado 2	Isolado 42	Isolado 6	DQ925486.2
Isolado 5		96,63%	97,14%	97,98%	97,64%
Isolado 2			98,32%	97,47%	98,82%
Isolado 42				98,15%	99,16%
Isolado 6					98,66%
DQ925486.2					

7. CONCLUSÕES

- No estudo foi verificado que a gama de hospedeiras do AMoV é bastante restrita, onde foi possível transmiti-lo por extratos vegetais para apenas três espécies hospedeiras.
- O AMoV foi encontrado em mandioquinha-salsa nos estados de Goiás, Paraná e Minas Gerais.
- Não foi possível identificar vírus dos gêneros *Nepovirus* e *Cheravirus*.

8. REFERÊNCIAS

AVELAR FILHO, J. A. de. **Estudo da conservação pós-colheita da mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft)**. 42 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1989.

BALBINO, J. M. S. et al. Cultura da batata-baroa. **EMCAPA: Manual de Cultura**, Vitória, ES, 27 p. 1990.

BERTHEAU, Y.D. et al. DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). In: PEROMBELON, M.C.M.; VAN DER WOLFF, J.M. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potatoes. **Scottish Crop Research Institute**, Dundee, Scotland, n.10, 1998.

BERGUER, P.H. et al. Family *Potyviridae*, p. 819-841 In: FAUQUET, et al. **Virus Taxonomy**. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Elsevier Academic Press**, Amsterdam, Netherlands, 2005.

BUKASOV, S. M. Las plantas cultivadas de México, Guatemala y Colombia. **CATIE**, Cartago, Costa Rica, 1981.

BRUNT, A. A. et al. **Plant Viruses Online**: Description and Lists from the VIDE Database. Version 20, Isleworth, United Kingdom, 1996.

CARMO, C. A. S.; FORNAZIER, M. J.; SANTOS, F. F. Densidade populacional de plantas de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v.14, n.1, p.78. 1996.

CASALI, V. W. D.; SEDIYAMA, M. A. N. Origem e botânica da mandioquinha-salsa. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, MG, v.19, n.190, p.13-14,1997.

CASALI, V. W. D. Inhame e mandioquinha-salsa: hortaliças alternativas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 12, n. 2, p. 276-277, 1994.

CHUNG, B. Y. W. et al. An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. **PNAS**, Washington, United States, v.105, n.15, p. 5897–5902, 2008.

DELGADO-SANCHEZ, S.; GROGAN, R. G. Potato Virus Y. **CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses**, Wellesbourne, United Kingdom, v.37, 1970.

EPPO. FITCHES informatives OEPP sur les organismes de quarantaine; Potato Viruses (non-European). **EPPO Bulletin**, Chichester, United Kingdom, v.14, p.11-22, 1984.

FAUQUET, C.M. et al. Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Elsevier Academic Pres**, Amsterdam, Netherlands, 1259p, 2005.

FILGUEIRA, F.A.R. Manual de olericultura: cultura e comercialização de hortaliças. **Agronômica Ceres**, São Paulo, 650p, 2000.

GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, Netherlands, v.63, p.9-16, 1997.

GIORDANO, L. B. et al. Avaliação de clones de mandioquinha-salsa no Distrito Federal provenientes de sementes botânicas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v.13, n.2, p.188-191, 1995.

HERMANN, M. Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). In: HERMANN, M.; J. HELLER, editors. Andean roots and tubers: Ahipa, arracacha, maca and yacon. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 21. **Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute**, Rome, Italy. p.75-172, 1997.

HENZ, G. P. Doenças da mandioquinha-salsa e sua situação atual no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 20, n.2, p.135-144, 2002.

HENZ, G. P.; REIS, A.; LOPES, C. A. Mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). **Sistemas de Produção**, Embrapa Hortaliças, Brasília, n. 4. 2008.

HOLLINGS, M.; BRUNT, A. A. Potyvirus group. **CMI/AAB Descriptions of plant viruses**. Wellesbourne, United Kingdom, v.15, n. 245, 1981a.

HOLLINGS, M.; BRUNT, A. A. Potyviruses. In: KURSTAK, E. Hand-book of plant virus infections: comparative diagnosis. **Elsevier**, Amsterdam, Netherlands, p.731-807, 1981b.

HULL, R. Matthews Plant Virology. 4 ed. **Academic Press**, San Diego, United States, 1001p. 2002.

ICTVdB Management, 00.056.0.84.002. Arracacha latent virus. In: ICTVdB – **The Universal Virus Database**, version 4. Büchen-Osmond, C. (ed), Columbia University, New York, United States. 2006b.

ICTVdb management, 00.056.0.84.002. Arracacha latent virus. In: ICTVdb – **The Universal Virus Database**, version 4. Büchen-Osmond, c. (ed), Columbia University, New York, United States. 2006b.

JONES, R. A. C.; KENTEN, R. H. *Arracacha virus A*, a newly recognized virus infecting arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*, Umbelliferae) in Peruvian Andes. **Annals of Applied Biology**, Chichester, United Kingdom, v.90, n.1, p.85-91, 1978.

JONES, R. A. C. OCA strain of *arracacha virus-B* from potato in Peru. **Plant Disease**, United States, v.65, p.753-754, 1981.

JONES, R. A. C.; KENTEN, R. H. A strain of *arracacha virus-B* infecting Oca (*Oxalis tuberosa*) in the Peruvian Andes. *Phytopathologische Zeitschrift: Journal of Phytopathology*, Berlin, Germany, v.100, p.88-95, 1981.

KENTEN, R. H.; JONES, R. A. C. Arracacha virus B: A second isometric virus infecting arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*, Umbelliferae) in Peruvian Andes. **Annals of Applied Biology**, Chichester, United Kingdom, v.93, n.1, p.31-36,1979.

KING, A. M. Q.; LEFKOWITZ, E.; ADAMS, J.M.; CARSTENS, E. B. Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 1327p, 2012.

LEÓN, J. Plantas alimenticias andinas. **Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas**, Lima, Peru, v.6, p.112, 1964.

LIZÁRRAGA, C.; CHUQUILLANQUI, G.; JAYASINGHE, U. Un variante del virus del anillo necrotico de la papa (Potato black ringspot virus, PBRV) isolado de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). **Fitopatología**, Lima, Peru, v.29, n.1, p.144-149,1994.

LIZÁRRAGA, C. Virus en raíces andinas. In: SEMINARIO, J. comp. **Raíces andinas: manual de capacitacion**. Lima, Peru: CIP, 2000.

LOPES, C.; HENZ, G. P. Doenças da mandioca-salsa. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, MG, v.19, n.190, p. 49-51, 1997.

MADEIRA, N. R.; SOUZA, R. J. Mandioca-salsa: alternativa para o pequeno produtor. **Boletim Agropecuário da Universidade Federal de Lavras**, Lavras, MG, n.60, 2004. 72 p.

MADEIRA, N. R. et al. Mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). Sistemas de Produção, Embrapa Hortaliças, Brasília, n. 4. 2008.

MADEIRA, N. R.; CARVALHO, A. Mandioca-salsa: Alternativa de renda garantida. **Revista Campo e Negócios**, Uberlândia, MG, ano VIII, n.103, 2013.

MALIOGKA, V. et al. Detection and Differentiation of Comoviridae Species using a Semi-nested RT-PCR and a Phylogenetic Analysis based on the Polymerase Protein. **Journal of Phytopathology**, Berlin, Germany, n.152, p.404-409, 2004.

MONTEIRO, D. A. et al. Realidade da mandioca-salsa no estado de São Paulo. **O agrônomo**, n.45, v.2/3, p.20-25,1993.

MURPHY, S. F. et al. A tyrosine residue in the small nuclear inclusion protein of tobacco vein mottling virus links the VPg to the viral RNA. **Journal of Virology**, Washington, United States, v. 65, p.511-513, 1991.

NORMAS de classificação da mandioca-salsa. São Roque: Instituto Brasileiro de Qualidade em Horticultura. 2002. Disponível em: <<http://www.hortibrasil.org.br/classificacao/mandioca/arquivos/morfologia.html>>. Acesso em: 12 fevereiro de 2014.

ORÍLIO, A. E. **Caracterização de uma nova espécie de *Potyvirus* infectando mandioca-salsa**. 105 f. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação para obtenção do título de mestre em Fitopatologia) - Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas, Brasília, 2007.

ORÍLIO, A. F. et al. Complete genome sequence of *arracacha mottle virus*. **Archives of Virology**, Vienna, Austria, v. 158, p. 291-295, 2013.

PAPPU, S. S. et al. Polymerase chain reaction method adapted for selective amplification and cloning of 3' sequences of potyviral genomes: application to dasheen mosaic virus. **Journal of Virology**, Washington, United States, v.41, p.9- 20. 1993.

PEREIRA, A. S. Valor nutritivo da mandioca-salsa. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, MG, v.19, n.190, p.11-12, 1997.

PRUSS, G. et al. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. **Plant Cell**, Rockville, United States, v.9, p.859-868, 1997.

SANTOS, F. F. et al. Cultivo da mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). **Instruções Técnicas**, Brasília, DF, n.10, 1991. Não paginado.

SANTOS, F. F. Características sócio-econômicas no processo de produção de mandioquinha-salsa no Brasil. **Horticultura brasileira**, Brasília, DF: SOB, v.11, n.1, p.95, 1993.

SANTOS, F. F. A cultura da mandioquinha-salsa no Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, MG, v.19, n.190, p.35-37, 1997.

SANTOS, F. F.; SILVA, V. V. Curso sobre manejo cultural da mandioquinha-salsa. Brasília, DF, EMBRAPA/CNPH. 56p, 1998.

SHUKLA, D. D.; FRENKEL, M. J.; WARD, C. W. Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Philadelphia, United States, v.13, p.178-191, 1991.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. A. The Potyviridae. **CAB International**, Wallingford, United Kingdom, 516p, 1994.

URCUQUI-INCHIMA, S., HAENNI, A.-L., BERNARDI, F. Potyvirus proteins: a wealth of functions. **Virus Research**, Amsterdam, Netherlands, v.74, p.157-175, 2001.

VERCHOT, J.; CARRINGTON, J. C. Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in *trans* as an accessory factor for genome amplification. **Journal of Virology**, Washington, United States, v.69, p.3668-3674, 1995b.

WEI, T. et al. Formation of Complexes at Plasmodesmata for Potyvirus Intercellular Movement Is Mediated by the Viral Protein P3N-PIPO. **PLoS Pathogens**, San Francisco, United States, v.6, n.6, 2010.

VIEIRA, M. C.; CASALI, V. W. D. Adaptação da cultura da mandioquinha-salsa à adubação orgânica. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, MG, v. 19, n.190, p. 40-42, 1997.

ZANIN, A. C. W. ; CASALI, V. W. D. Origem, Distribuição Geográfica e Botânica da Mandioquinha-Salsa. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, MG, v.10, n.120, p.9-11, 1984.


```
Isolado2      GATGGTAGTGTGGGAACAGTGAGGAGAGTACAGAGAGGCATACTAGTGAGGACGTGAAC 360
DQ925486     GATGGTAGTGTGGGAACAGTGAGGAGAGTACAGAGAGGCATACTAGTGAGGATGTGAAC 360
Isolado42    GATGGTAGTGTGGGAACAGTGAGGAGAGTACAGAGAGGCATACTAGTGAGGACGTGAAC 360
Isolado6     GATGGTAGTGTGGGAACAGTGAGGAGAGTACAGAGAGGCATACTAGTGAGGATGTGAAC 360
isolado5     GATGGTAGTGTGGGAACAGTGAGGAGAGTACAGAGAGGCATACTAGTGAAGATGTGAAC 360
***** ** *****

Isolado2      TCCAATCTGCATAGTCTGATGGGTGTTTCGCAACATGTAAGGGGTAGCCTCCAATATAGTA 420
DQ925486     TCCAATCTGCATAGTCTGATGGGTGTTTCGCAACATGTAAGGGGTAGCCTCCAATATAGTA 420
Isolado42    TCCAATCTGCATAGTCTGATGGGTGTTTCGCAACATGTAAGGGGTAGCCTCCAATATATTA 420
Isolado6     TCCAATCTGCATAGTCTGATGGGTGTTTCGCAACATGTAAGGGGTAGCCTCCAATATAGTA 420
isolado5     TCCAATCTGCATAGTCTGATGGGTGTTTCGCAACATGTAAGGGGTAGCCTCCAATATAGTA 420
***** ** *****

Isolado2      TATTAATATATATTTATATTTCTGTATTTTGAGTTCCGACTATTCGATGCACCTCCAGTGA 480
DQ925486     TATTAATATATATTTATATTTCTGTATTTTGAGTTCCGACTATTCGATGCACCTCCAGTGA 480
Isolado42    TATTAATATATATTTATATTTCTGTATTTTGAGTTCCGACTATTCGATGCACCTCCAGTGA 480
Isolado6     TATTAATATATATTTATATTTCTGTATTTTGAGTTCCGACTATTCGATGCACCTCCAGTGA 480
isolado5     TATTAATATATATTTATATTTCTGTATTTTGAGTTCCGACTATTCGATGCACCTCCAGTGA 480
***** ** *****

Isolado2      GGTATACCTCCTTGTGTAATGCTTTCGTTATAGTTTCAATCTACATGTTGAGAGTGAC 540
DQ925486     GGTATACCTCCTTGTGTAATGCTTTCGTTATAGTTTCAATCTACATGTTGAGAGTGAC 540
Isolado42    GGTATACCTCCTTGTGTAATGCTTTCGTTATAGTTTCAATCTACATGTTGAGAGTGAC 540
Isolado6     GGTATACCTCCTTGTGTAATGCTTTCGTTATAGTTTCAATCTACATGTTGAGAGTGAC 540
isolado5     GGTATACCTCCTTGTGTAATGCTTTCGTTATAGTTTCAATCTACATGTTGAGAGTGAC 540
***** ** *****

Isolado2      CATCTGACCCCTAAATTGGTTCTTCATTTGGGTGATCG-AAATGTGTAGAGGGAG 594
DQ925486     CATCTGACCCCTAAATTGGTTCTTCATTTGGGTGATCGTAAATGTGTAGAGGGAG 595
Isolado42    CATCTGACCCCTAAATTGGTTCTTCATTTGGGTGATCGTAAATGTGTAGAGGGAG 595
Isolado6     CATCTGACCCCTAAATTGGTTCTTCATTTGGGTGATCGTAAATGTGTAGAGGGAG 595
isolado5     CATCTGACCCCTAAATTG-TTCCTCCTTTGGGTGAACCTAAATGTGTAAAAGGAA 594
***** ** *****
```