



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

TECNOLOGIA DO BROTO/BATATA-SEMENTE: AVALIAÇÃO DO ELISA EM BROTO VERSUS RESPECTIVOS TUBÉRCULOS, NA DETECÇÃO DE QUATRO VÍRUS REGULAMENTADOS

Andressa Barbosa Giusto¹, José Alberto Caram de Souza-Dias²

¹Curso PG/IAC/APTA, Campinas, SP, Bolsista FundAg. ²Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Fitossanidade/Virologia-IAC/APTA, Campinas, SP. jcaram@iac.gov.br

RESUMO - A produção e certificação de batata-semente no Brasil são regulamentadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), atualmente sob a Instrução Normativa IN 32 de 20-11-2012. Entre os requisitos essenciais, um dos mais limitantes é o atestado fitossanitário de lotes de batata-semente (tubérculo, minitubérculo, bem como material de propagação: plântulas *in vitro*, ou broto), referente a quatro vírus regulamentados: PLRV, PVY, PVX e PVS. Considerando a inovadora tecnologia do aproveitamento de broto destacado de tubérculos/batata-semente, como material de propagação (broto/batata-semente), tornou-se necessário responder se os percentuais desses vírus, determinados por ELISA em tubérculos/batata-semente, correspondem aos dos respectivos brotos/batata-semente. Neste trabalho avaliou-se, comparativamente, a correlação da detecção dos quatro vírus, por DASELISA, em três tecidos correspondentes a cada tubérculo: (1) tubérculo dormente; (2) broto apical destacado; e (3) folhas da planta-progênie (como diagnóstico conclusivo). Foram utilizados nesses testes, realizados conforme os tecidos correspondentes (1; 2 e 3), amostras de lotes de tubérculos dormentes com incidência superior a 50% de cada vírus avaliado, exceto para o PVX, com incidência de 25% e PVS com incidência não pré-determinada. Os resultados obtidos indicaram que houve correspondência significativa ($p < 5\%$) no percentual de detecção dos vírus estudados nos três tecidos comparados. Desse modo, o percentual de cada um dos quatro vírus analisados, via DAS-ELISA, em lotes de tubérculos-dormentes, corresponde significativamente em testes DAS-ELISA de brotos, destacados dos lotes de tubérculos/batatasemente que os originaram.

Palavras-chave: Broto/batata-semente; minitubérculo; folha-ELISA PLRV, PVY, PVX, PVS.

INTRODUÇÃO

No Brasil, apesar da constante e crescente ameaça de viroses transmitidas por mosca branca (*Bemisia tabaci*) a bataticultura (*Solanum tuberosum* L.) continua enfrentando rápida degenerescência da batata-semente, causada particularmente por duas espécies de vírus mais comuns: o *Potato leafroll virus* (PLRV) e o *Potato virus Y* (PVY), os quais podem ser disseminados rapidamente por afídeos vetores: *Myzus persicae*, principalmente. A legislação em vigor: MAPA/IN 32 (20-11-2012) que regulamenta a certificação de batata-semente, estabelece percentuais de tolerâncias para o PLRV e PVY; bem como, para outras duas espécies de vírus:



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

Potato virus X (PVX) e *Potato virus S* (PVS), apesar de geralmente ausente ou rara ocorrência, respectivamente, sendo de transmissão principalmente via contato (SOUZA DIAS et al., 2016).

Assim como no Brasil, outros países, com condições climáticas semelhantes, isto é: inverno não rigoroso e agricultura o ano inteiro, enfrentam dificuldades, não na produção, mas sim, na manutenção da alta sanidade de estoques básicos de batata-semente livres de vírus (G-0), em campos de aumento: geralmente mais de 10% de viroses na G-3; inviável à continuidade de uso da produção como semente (HAYASHI, 2017). Esse fato epidemiológico, associado à baixa taxa de multiplicação da batata-semente (1:10), faz com que o Brasil dependa da batata-semente básica importada de países com clima oposto (DUARTE & TELO, 2013), ou de telados anti afídeos, que suprem, de forma restrita, minitubérculos/batata-semente, classe básica (G-0), via cultura de tecido (HAYASHI, 2004; CALORI, et al., 2014).

De forma alternativa e mais acessível, minitubérculos/batata-semente têm sido obtidos, com igual sanidade e produtividade, via tecnologia do broto/batata-semente (SOUZA-DIAS, et al. 2008). Toneladas de brotos, da desbrota de lotes de tubérculos/batata-semente, oriundos de telados ou da importação anual de estoques básicos (G-0), são utilizados como propágulos. A desbrota pode aumentar número de tubérculos/batata-semente (HAYASHI, 2017).

A atual legislação (MAPA, IN 32) incluiu a tecnologia do broto/batata-semente na produção de minitubérculos/batata-semente certificada, elevando-o de “descartável” a “negociável”. Esse inovador segmento da produção de minitubérculos/batata-semente tem demandado avaliação na eficácia da técnica ELISA, que é a usual-oficial para viroses na certificação de batata-semente (SOUZA-DIAS & BETTI, 2003; HAYASHI, 2017), quando aplicada a brotos.

O objetivo deste trabalho foi verificar a correlação do ELISA, aplicado em brotos versus respectivos tubérculos, para a detecção e determinação percentual de quatro vírus regulamentados na produção de batata-semente nacional: PLRV, PVY, PVS e PVX.

MATERIAL E MÉTODOS

As análises através do teste sorológico DAS-ELISA foram conduzidas nas dependências do Laboratório de Viroses da Batata (LVB), CPD-Fitossanidade/IAC/APTA, durante os anos de



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

2005-2006, como parte dos trabalhos de tese no programa PG-IAC (GIUSTO, 2006). Foram utilizados kits de diagnose comerciais (EMBRAPA/CNPH, Brasília-DF ou Agdia (USA) para os vírus PLRV, PVY, PVX e PVS. Tubérculos dormentes e respectivos brotos foram obtidos de amostras submetidas ao LBV por produtores, de várias regiões, para análises de viroses visando obtenção de batata-semente própria (SOUZA-DIAS & BETTI, 2003).

Para os testes de PLRV e PVY, foram selecionadas amostras com detecção próxima de 50% das cvs. Ágata, Asterix, Bintje, Monalisa e Mondial. Para o vírus PVX, devido à ausência de lotes de tubérculos infectados, nos testes de rotina, o inóculo foi obtido de plantas teste de *Datura stramonium*; *Gomphrena globosa* e *Nicotiana tabacum* L, previamente confirmadas positivas para PVX em DAS-ELISA, mantidas como rotina na coleção *in vivo* desse vírus, no LVB. Procedeu-se a inoculação via transmissão mecânica (JEFFRIES, 1998) e por enxertia de haste em plantas de batata cv. Caesar, suscetível ao PVX (BAARVELD et al., 2003), originadas de tubérculos/batata-semente básica, G-0. Assim como no caso do PVX, os testes para detecção do PVS, nos três tecidos analisados, foram efetuados com único genótipo: variedade crioula: IAC Duvira, mantida no LVB, em clones com incidência variável do PVS.

Toda amostra analisada recebeu numeração seqüencial, tanto os tubérculos como seus respectivos brotos e folhas da planta progênie (originada do respectivo tubérculo testado). Os tubérculos foram mantidos até brotação em sacos de papel pardo (20°C, escuro). Os testes (DASELISA) foram realizados em três etapas, envolvendo extração dos seguintes tecidos: (1) Tubérculo dormente: olho apical + estolão; (2) Broto apical destacado: com 1-5 cm de altura, após quebra de dormência natural; e (3) Folhas da planta progênie aos 40 dias do plantio (**diagnose conclusiva**). Os tubérculos (1), depois de testados, foram plantados em vasos contendo 5 litros de substrato, em casa de vegetação, livre de insetos. A metodologia usada para realizar e interpretar os resultados de absorbância (A405nm), do teste DAS-ELISA, foi baseada em SOUZA-DIAS et al. (1999), com adaptação para a extração dos brotos, de tamanho acima de 2 cm. Valores de A405nm duas vezes acima da média dos controles negativos foram considerados positivos; tendo os valores das folhas (3) como definitivos, em comparação aos valores obtidos em tubérculo (1) e broto (2).

Foram adotados dois delineamentos, sendo: (a) para os vírus PLRV e PVY, em blocos casualizados com 15 tratamentos e 25 repetições, com os tratamentos representando arranjo fatorial



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agrônomo - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

de três origens de tecidos correspondentes com cinco variedades de batata; e (b) para os vírus PVX e PVS, sendo inteiramente casualizado, com três tratamentos e 25 repetições; tratamentos representando o arranjo fatorial de três origens de tecidos correspondentes com uma cv. de batata. As amostras para análises, via DAS-ELISA, foram compostas por 18 tubérculos dormentes. Os dados foram analisados através do programa SISVAR (DEX/UFLA), versão 4.6 (Build 6.0), desenvolvido por FERREIRA (1998) e aplicado para o Teste de TUKEY a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da avaliação do percentual de detecção dos vírus PLRV, PVY, PVX e PVS, estão apresentados nas Tabela 1; 2; 3 e 4, respectivamente.

PLRV: na Tabela 1, pode-se verificar que foi possível a detecção do PLRV nos três tecidos correspondentes, bem como em todas as cvs. estudadas. As médias de detecção desse vírus nas folhas (3), dentro de cada variedade, conforme observadas em 25 repetições de 18 amostras (tubérculos), não se mostraram significativamente diferentes, apesar de terem sido consistentemente maiores e seguidas pelas médias (%) do tubérculo (1) e broto (2).

As comparações não foram feitas entre variedades, por não ser permitido mistura varietal na produção. Entretanto, o desvio padrão das médias entre as cvs. Ágata (1,83; 2,35; 2,01) e Mondial (0,82; 0,87; 0,88), para os tecidos 1; 2 e 3, respectivamente, poderiam indicar diferenças significativas em função de uma maior ou menor resistência à infecção pelo PLRV, como nos casos de genótipos resistentes ao PLRV, por restrição na replicação (JEFFRIES, 1998).

Tabela 1. Comparação das médias percentuais* e respectivos desvios padrões do PLRV, detectado em três tecidos correspondentes, analisados através de DAS-ELISA para cinco cultivares de batata.

Tecidos Analisados	Cultivares				
	Ágata**	Asterix**	Bintje**	Monalisa**	Mondial**
Tubérculo dormente	10,68 ± 1,83 a	12,00 ± 1,30 a	12,56 ± 1,69 a	12,56 ± 1,64 a	13,80 ± 0,86 a



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

Broto apical destacado	10,20 ± 2,35 a	11,80 ± 1,77 a	12,20 ± 1,77 a	12,28 ± 1,36 a	13,60 ± 13,60 a
Folhas da planta progênie	11,12 ± 2,01 ^a	12,52 ± 1,79 a	12,92 ± 1,71 a	12,92 ± 1,40 a	14,24 ± 0,88 a

* As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si (Tukey 5%). ** Média de 25 repetições de 18 amostras por tratamento.

PVY: na tabela 2, verifica-se que não houve diferença significativa, entre os tecidos / cv. , pois foi possível a detecção do PVY para os três tecidos correspondentes (1; 2 e 3), bem como em todas as cvs.: Ágata, Atlantic, Aracy IAC 2, Bintje e Asterix. Entretanto, apesar da não significância observada, as médias (%) de detecção do PVY, em tecidos de folhas, (3) foram as maiores, sendo seguidas pelas médias do broto apical destacado (2) e tubérculo dormente (1). Essa mesma seqüência de tipo de tecidos testado na detecção de antígeno do PVY foi observada para todas as cvs. , exceto para a cv. Bintje, onde tubérculos dormentes (1) apresentaram média maior que broto (2). Diferente do que foi observado para o PLRV, nota-se que no caso de detecção de antígenos do PVY, as cinco cvs., cujos níveis de suscetibilidade são variáveis, não apresentaram comportamento de desvio padrão correspondente à suscetibilidade. Esse comportamento foi observado entre cv. Bintje, considerada ‘bastante suscetível’ e cv. Ágata, considerada ‘muito boa resistência’ (BAARVELD et al. 2003). Os desvios padrões dos três tecidos analisados foram: ‘Bintje’, 1,36 (1); 1,72 (2) e 1,48 (3); enquanto que para ‘Ágata’: 1,04 (1); 1,22 (2) e 1,12 (3), portanto com médias relativamente próximas: 1,52 e 1,15, respectivamente.

Tabela 2. Comparação das médias percentuais* e respectivos desvios padrões do PVY detectado em três tecidos correspondentes, analisados através de DAS-ELISA para cinco cultivares de batata.

Tecidos Analisados	Cultivares				
	Ágata**	Atlantic**	Aracy IAC 2**	Bintje**	Asterix**
Tubérculo dormente	9,44 ± 1,04 a	10,36 ± 1,30 a	10,60 ± 1,14 a	11,56 ± 1,72 a	14,20 ± 1,21 a
Broto apical destacado	9,64 ± 1,22 a	10,48 ± 1,49 a	11,00 ± 1,34 a	11,52 ± 1,48 a	14,52 ± 1,21 a
Folhas da planta progênie	9,96 ± 1,12 a	10,88 ± 1,48 a	11,44 ± 1,36 a	11,84 ± 1,62 a	14,76 ± 1,04 a

* As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si (Tukey 5%). ** Média de 25 repetições de 18 amostras por tratamento.



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA
Instituto Agronômico - Campinas, SP
7 a 9 de Fevereiro de 2017

PVX: na Tabela 3, pode-se verificar que foi possível a detecção do PVX nos três tecidos correspondentes. Não ocorreu interação significativa nas médias da detecção entre os tecidos analisados: folhas (3) apresentaram as maiores detecções: 3,68, sendo seguido pela detecção em tubérculos (1): 3,60 e broto (2): 3,36, em 18 amostras com 25 repetições. Sustentam esses resultados o fato de PVX ser de fácil detecção imunológica (JEFFRIES, 1998).

Tabela 3. Comparação das médias percentuais* e respectivos desvios padrões do PVX detectado em três tecidos correspondentes, analisados através de DAS-ELISA (cv. Caesar).

Tecidos Analisados	Cultivar Caesar**
Tubérculo dormente	3,60 ± 1,14 a
Broto apical destacado	3,36 ± 1,25 a
Folhas da planta progênie	3,68 ± 1,35 a

* As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si (Tukey 5%).

** Média de 25 repetições de 18 amostras por tratamento.

PVS: na Tabela 4, verifica-se a detecção do PVS para os três tecidos correspondentes (1; 2 e 3), sem variação significativa entre eles; comportando-se como observado para os outros vírus (PLRV, PVY, e PVX). As médias percentuais/desvio padrão de detecção do PVS, nos três tecidos analisados: extratos de tubérculo dormente, broto apical destacado e folhas da planta progênie, foram próximas: 16,00/ 0,72 - 15,92/ 0,52 - 16,44/ 0,63, respectivamente.

A notável eficiência da detecção do PVS nos diferentes tecidos analisados confirma resultados de outros autores, os quais apontam ser o PVS altamente imunogênico em tecidos de tubérculo e folhas (JEFFRIES, 1998; SOUZA DIAS et al., 2016).

Tabela 4. Comparação das médias percentuais* do PVS detectado em três tecidos correspondentes, analisados através de DAS-ELISA para variedade crioula de batata: IAC Duvira.

Tecidos Analisados	Variedade IAC Duvira**
Tubérculo dormente	16,00 a



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agrônômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

Broto apical destacado	15,92 a
Folhas da planta progênie	16,44 a

* As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si (Tukey 5%). **
Média de 25 repetições com 18 amostras cada.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos via DAS-ELISA, para detecção dos quatro vírus analisados, revelaram homogeneidade no comportamento entre os três tecidos analisados: tubérculo dormente (1); broto apical destacado (2); e folhas da planta progênie (3). Portanto, o percentual determinado por DAS-ELISA, para cada um dos quatro vírus analisados, em lotes de tubérculos dormentes, pode ser considerado como indicador seguro, quanto à incidência desses vírus nos brotos destacados desses lotes.

Torna-se interessante aprofundar essas avaliações (percentagem de viroses brotos x tubérculos), para eventual determinação segura da necessidade ou não de testes dos brotos, quando se tem as avaliações nos tubérculos, dos quais foram destacados; reduzindo custos dessa inovadora tecnologia na produção de minitubérculo/batata-semente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAARVELD, H.R.; PEETEN, H.M.G.; SCHIPPER, E.; SCHIPPER, J.K. & DELLEMAN, J. *Netherlands catalogue of potato varieties*. Den Haag: Published by NIVAP. 2003. 263 p.

CALORI, A. H.; FACTOR, T.L.; FELTRAN, J. C.; PURQUERIO, L. F.V.. Aeroponia pode inovar a produção de minitubérculos de batata no Estado de São Paulo. *O Agrônomo*, v. 64-66: 42-50, 2014.

DUARTE, V. & P.S. TELO. **Batata: Exigências Fitossanitárias**. Cultivar HF, v. Pelotas, MG, Março-Abril, vol. XI (79), p. 23-24, 2013.

FERREIRA, D.N. **Análises estatísticas por meio do SISVAR (Sistema para análise de variância)** software: versão 4.6 (Build 6.0). Lavras: UFLA/DEX/SISVAR. 1998. 175 p.



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA
Instituto Agronômico - Campinas, SP
7 a 9 de Fevereiro de 2017

GIUSTO, A.B. Tecnologia do broto como propágulo na produção de minitubérculos de batatasemente: avaliação do ELISA na detecção de quatro vírus regulamentados. PG-IAC. **CDD 616.9**, 142p., 2006.

HAYASHI, P. Produção de minitubérculos em cultivo hidropônico com substrato. **Revista Batata Show** v. 4, n. 9, 24-25, 2004.

HAYASHI, P.. Saiba mais sobre a produtividade da batata semente no Brasil. **Agrolavoura Negócios Rurais**. <http://agrolavoura.com/blog-posts/saiba-mais-sobre-a-producao-de-batatasemente-no-brasil/?mode=grid>. 5-01-2017.

JEFFRIES, C. FAO/IPGRI Technical Guidelines for Safe Movement of germplasm. Potato Food Agric. Org. United Nations, Rome/Inter. **Plant Genetic Resources Institute**, Rome, n. 19: 177, 1998.

SOUZA-DIAS J.A.C. ; DANIELS-LAKE B. ; CAMPBLELL W.L.; MEO C.M.; BORGES, S.M; RODRIGUES, L.; SILVA, I. L. The sprout/Seed-potato Technology: A Review on the innovative idea of exporting/importing sprouts for sanitary movement of virus-free "seed-potato" stocks, EAPR-2008, Brasov, Romenia, [http://www.potato.ro/publicatii_files/EAPRABSTRACTS_BOOK](http://www.potato.ro/publicatii_files/EAPRABSTRACTS_BOOK.pdf). pdf pags.184-187, 2008.

SOUZA DIAS, J.A.C.; Iamauti, M.T; FISHER, I.H. Doenças da Batateira. In. L. Amorim et al. (Eds), 5ª. Ed. **Manual de Fitopatologia**. v. 2, 125-147, 2016.

SOUZA-DIAS, J.A.C.; RUSSO, P.; BETTI, J.A.; MILLER, L. SLACK, S.A. Simplified extraction method for ELISA and PCR detection of potato leafroll luteovirus primary infection in dormant potato tubers. **American Journal of Potato Research**, 76: 209-213, 1999.

SOUZA-DIAS, J.A.C.; BETTI, J.A. A 12-Year Review of ELISA Monitoring of Major Potato Viruses in Dormant Seed-tubers in Brazil. *Proc. XXVI IHC- Potatoes-Healthy Food for Humanity*. (Ed.). R.Y. Yada. **Acta Hort**. 619, ISHS 3003: 153-159, 2003.