

COMPORTAMENTO DE *Myzus persicae* (SULZER) (HEMIPTERA:  
APHIDIDAE) E TRANSMISSÃO DE ESTIRPES DE *Potato virus Y*  
(PVY) EM DIFERENTES CULTIVARES DE BATATA

FERNANDO JAVIER SANHUEZA SALAS

Biólogo

Orientador: Prof. Dr. JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES

Tese apresentada à Escola Superior  
de Agricultura “Luiz de Queiroz”,  
Universidade de São Paulo, para  
obtenção do título de Doutor em  
Ciências, Área de Concentração:  
Entomologia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo – Brasil

Janeiro - 2004

**AUTOR: FERNANDO JAVIER SANHUEZA SALAS**  
**TÍTULO DA TESE: COMPORTAMENTO DE *Myzus persicae* (SULZER)**  
**(HEMIPTERA: APHIDIDAE) E TRANSMISSÃO DE ESTIRPES DE**  
***Potato virus Y* (PVY) EM DIFERENTES CULTIVARES DE BATATA**

p.	item	linha	onde se lê	leia-se
5	2.1	17ª linha	Os <i>Potyvirus</i> ...	Os <i>Potyviriidae</i> ...
5	2.1	27ª linha	... vírus da família Potyviridae são: ...	... vírus do Gênero Potyvirus são: ...
8	2.2	15ª linha	...diferenciação, os isolados...	...diferenciação, as estirpes...
20	2.5	sétima linha	... de acordo com Garzo (2002) ...	... de acordo com Edwards & Wratten (1981)...
22	2.5	quinta linha	... secreção intracelular...	... secreção intercelular...
23	2.6	22ª linha	... Fereres et al., 1993 ...	... Fereres & Collar, 1999 ...
26	2.6	12ª linha	...ingestão e egestão...	...ingestão e salivação...
50	3.1.1	1ª linha	... no período de março de 2001...	... em março de 2001...
51	3.1.2	2ª linha	...inoculadas 6 espécies de...	...inoculadas 6 espécies diferenciadoras de...
52	3.1.3	1ª linha	Caracterização...	Identificação... (em todos os subitens)
52	3.1.4.1	2ª linha	As amostras cujos isolados não puderam ser identificados por ELISA ...	As amostras com resultados negativos em ELISA...
56	3.2.2	Tabela 4	...Isolado* e Variedade de origem (no cabeçalho)...	...Estirpe e Isolado (no cabeçalho)...
60	3.2.5.3	1ª linha	...Os níveis de resistência de...	... A reação de ...
69	3.4.2	21ª linha	...potencial registra o rompimento...	...potencial registra a penetração...
69	3.4.2	24ª linha	...picada de prova (ou pd)...	...picada de prova (ou 1ª C)...
70	3.4.2	5ª linha	d) Número total de pd e ...	d) Número total de provas e ...
72	3.5	12 e 13ª linhas	...(Marca Novotex Agro®, Fitesa S.A., Santa Catarina, Brasil)...	...(Marca Novotex Agro®, Fitesa S.A., Gravataí, Rio Grande do Sul, Brasil)...
90	4.1.4	2ª linha	... <i>Solanum tuberosum</i> L e <i>Nicotiana tabacum</i> L. conservaram...	... <i>Solanum tuberosum</i> L e <i>Nicotiana tabacum</i> L. conservaram...
96	4.2.3	7ª linha	... O cultivar espanhol Santè...	... O cultivar dinamarques Santè...

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Sanhueza Salas, Fernando Javier

Comportamento de *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera : Aphidae) e transmissão de estirpes de *Potato virus Y* (PVY) em diferentes cultivares de batata / Fernando Javier Sanhueza Salas. - - Piracicaba, 2004.

145 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.  
Bibliografia.

1. Batata 2. Controle de insetos 3. Hábito alimentar animal 4. Insetos vetores  
5. Pulgão-verde 6. Vírus de planta I. Título

CDD 633.491

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

“ Deus quer, o homem sonha, a obra nasce.  
Deus quis que a terra fosse toda uma,  
Que o mar unisse, já não separasse.  
Sagrou-te, e foste desvendando a espuma...”

O Infante – Fernando Pessoa

“Valeu a pena? Tudo vale a pena  
Se a alma não é pequena.  
Quem quer passar além do Bojador  
Tem que passar além da dor.  
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,  
Mas nele é que espelhou o céu.”

Mar Português – Fernando Pessoa

"Hay hombres que luchan un día y son buenos,  
Hay otros que luchan un año y son mejores,  
Hay quienes luchan muchos años y son muy buenos,  
Pero hay los que luchan toda la vida,  
esos son los imprescindibles"

Bertolt Brecht.

A minha avó Orfilia *in memoriam*  
uma mulher que me ensinou o valor  
em ser do campo e pertencer a terra.  
Promessa cumprida.  
Ofereço.

A meus pais Gina e Fernando,  
meus irmãos Rossana e Mauricio,  
a minha sobrinha Natalia,  
que sempre souberam me apoiar  
e auxiliar no momento exato,  
mas principalmente pela compreensão  
em todos os momentos,  
fossem estes alegres ou difíceis.  
Dedico com amor e carinho.

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. João Roberto Spotti Lopes, pela amizade, orientação e conhecimentos transmitidos no decorrer deste trabalho.

Ao Pesquisador Científico Dr. Aberto Fereres Castiel, pela amizade, atenção e auxílio oferecidos nos trabalhos realizados junto ao Centro de Ciências Medioambientales (CCMA) do Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) em Madri, Espanha.

A colega Dra. Maria Mércia Barradas, pelo apoio, amizade e ensinamentos divididos.

Ao Instituto Biológico de São Paulo, nas pessoas de seus dirigentes, que permitiram minhas viagens e cederam veículos para o deslocamento, imprescindíveis para o desenvolvimento do trabalho.

Aos professores do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola – Setor Entomologia da escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pelo conhecimento e apoio transmitido.

Aos Pesquisadores Científicos do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia, em especial a Addolorata Colariccio, Alexandre Chaves, Marcelo Eiras e Marcos

Gonçalves, pelo apoio na execução dos trabalhos de caracterização e pela amizade e sugestões constantes.

Ao Técnico Agrícola José Aparecido Pereira da Rocha indispensável nos trabalhos de campo, pelo auxílio, companhia e amizade.

À FITESA S.A. na figura do amigo Cláudio Guedes pela atenção, auxílio operacional, material fornecido e principalmente pela parceria positiva.

À Cooperativa Agrícola de Capão Bonito, nas figuras dos Eng<sup>os</sup> Agrônomos Luis Carlos Marriotto e Éder Marriotto pela doação dos mini-tubérculos certificados empregados nos ensaios no exterior.

À Associação Brasileira da Batata na figura do Eng<sup>o</sup>. Agrônomo Natalino Shimoyama pela atenção, apoio e confiança oferecidas no início do trabalho e pelas sementes fornecidas quando necessário.

Ao Grupo de Produtores de Itapetininga – GPI pelo interesse e fornecimento da área experimental em Paranapanema.

Ao Grupo de Entomologia do Departamento de Proteção Vegetal do CCMA, pela empréstimo da área e apoio constante.

Aos amigos Miguel Nebreda, Diego Escrig, Ainhoa Polo, Aranzazu Moreno, Montserrat Duque, Itziar Palácios, Elisa Garzo, Beatriz Dias e Maria Garcia pelos bons momentos e por amenizar a distancia e me fazer sentir em casa.

Aos colegas do Laboratório de Insetos Vetores: Érica, Fernanda, Eduardo, Flávio, Helen, Maria Teresa, Miguel, Rodrigo, Simone, Teresinha e Daniele pelo apoio despendido para a concretização deste trabalho.

**Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa (SDW) concedida.**

**Ao Sr. Sérgio Viana, Chefe da Seção de Fotomicrografia do Instituto Biológico, pelos registros fotográficos e pela amizade.**

**Aos meus amigos de sempre Charles Martins de Oliveira (“Mineiro”); Cláudio Marcelo G. de Oliveira (“Louva”); Patrick Jack Spencer (“França”); Vanessa Kitassaua (“Tum”); Fábio Carneiro Lima (“Biulo”); João Ezequiel (“Jhonny”); Clemente Coelho Jr. (“Cleb’s”); Rosângela de Gaetano (“Rô”) Moacir Carnelós Filho (“Moa).**

**Aos estagiários do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia do Instituto Biológico, em especial a Jessica Bergmann, pelo auxílio e amizade.**

**Às bibliotecárias Eliana M. Garcia e Silvia M. Zinsly, pela correção das referências bibliográficas e normas da tese.**

**Aos amigos da Pós-graduação em Entomologia, pelo companheirismo e momentos de descontração em especial a Ricardo Polanski..**

**Aos funcionários do Setor de Entomologia da ESALQ/USP, pela amizade e apoio na condução dos trabalhos de campo.**



## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xii
RESUMEN.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 A Família <i>Potyviridae</i> .....	4
2.2 Vírus Y da batata (" <i>Potato Y virus</i> " –PVY).....	7
2.3 Transmissão de vírus do gênero <i>Potyvirus</i> .....	8
2.4 Comportamento alimentar de afídeos – escolha de hospedeira.....	10
2.4.1 Resposta a diferentes ondas (curtas e longas) que compõem a luz visível.....	12
2.4.2 Resposta aos odores da planta hospedeira.....	14
2.4.3 Resposta a feromônios.....	17
2.5 Comportamento alimentar de afídeos – alimentação intracelular.....	18
2.6 Técnica de EPG ("electrical penetration graph") e seu emprego no estudo da transmissão de fitovírus por afídeos.....	22
2.6.1 Breve descrição do aparelho de EPG.....	27
2.6.2 Mecanismos de resistência de batata e outras solanáceas a insetos e sua interferência com o processo de transmissão de fitovírus.....	28
2.7.Mecanismos de resistência de batata aos seus principais	

fitovírus.....	33
<b>2.8 Epidemiologia e controle dos principais vetores de vírus na cultura de batata.....</b>	<b>34</b>
2.8.1 Virus envolvidos.....	37
2.8.2 Afídeos como vetores de vírus.....	38
2.8.2.1 Espécies de afídeos e intensidade vetorial.....	38
2.8.2.2..O papel das espécies de afídeos “migratórios” na disseminação de vírus não-persistentes.....	38
2.8.2.3 Tipos de dinâmica de populações de afídeos.....	39
2.8.3 O papel das plantas na epidemiologia de vírus em batata....	40
2.9 Exemplos de modelos.....	42
2.10 Emprego de métodos físicos de controle.....	44
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
3.1 Levantamento das estirpes do vírus Y da batata (PVY) .....	49
3.1.1 Coleta de material infectado.....	50
3.1.2 Inoculação mecânica em plantas indicadoras.....	51
3.1.3 Caracterização serológica dos isolados.....	52
3.1.4 Caracterização molecular dos isolados.....	52
3.1.4.1 Extração de RNA.....	52
3.1.4.2 RT – PCR.....	53
3.1.5 Armazenamento de material.....	53
3.2 Material entomológico.....	54
3.2.1 Obtenção e manutenção do clone de <i>Myzus persicae</i> e <i>Aphis gossypii</i> .....	54
3.2.2 Fontes de vírus e manutenção.....	55
3.2.3 Obtenção de plantas-teste.....	56
3.2.4 Detecção sorológica dos vírus por ELISA.....	57
3.2.5 Ensaio de transmissão de três isolados de vírus Y da batata.....	58
3.2.5.1 Comprovação da infectividade dos isolados obtidos.....	58

3.2.5.2 Eficiência de transmissão dos isolados de PVY por <i>M. persicae</i> e <i>A. gossypii</i> – eficiência vetorial.....	59
3.2.5.3 Avaliação da transmissão de PVY por <i>Myzus persicae</i> em cinco cultivares – resistência à transmissão.....	60
3.3 Ensaios de preferência e de desenvolvimento de <i>M. persicae</i> em cultivares de batata.....	61
3.3.1 Ensaios de preferência (antixenose).....	61
3.3.2 Ensaio de desenvolvimento (antibiose).....	63
3.3.3 Delineamento e análise estatística dos ensaios de preferência e desenvolvimento.....	63
3.4 Monitoramento da atividade alimentar de <i>M. persicae</i> em diferentes cultivares de batata.....	65
3.4.1 Obtenção de registros EPG .....	66
3.4.2 Interpretação e análise dos registros EPG.....	67
3.4.3 Análise estatística dos registros EPG.....	72
3.5 Avaliação de barreiras físicas para controle de afídeos vetores em plantio de batata.....	72
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
4.1 Levantamento de estirpes do vírus Y da batata (PVY).....	77
4.1.1 Indexação biológica dos isolados de campo .....	76
4.1.2 Caracterização dos isolados por ELISA .....	85
4.1.3 Caracterização dos isolados por RT-PCR .....	87
4.1.4 Infectividade de material foliar armazenado .....	90
4.2 Transmissão de três estirpes de PVY por afídeos .....	91
4.2.1 Comprovação da infectividade e transmissibilidade dos isolados espanhóis obtidos.....	91
4.2.2 Eficiência da transmissão dos isolados de PVY por <i>M. persicae</i> e <i>Aphis gossypii</i> .....	93

<b>4.2.3 Transmissão de estirpes do PVY em cinco cultivares de batata - resistência ao vírus.....</b>	<b>96</b>
<b>4.3 Ensaio de preferência e desenvolvimento de <i>M. persicae</i> em diferentes cultivares de batata .....</b>	<b>102</b>
<b>4.3.1 Ensaio de preferência antixenose .....</b>	<b>102</b>
<b>4.3.2 Ensaio de desenvolvimento (antibiose) de <i>M. persicae</i> em diferentes cultivares de batata.....</b>	<b>104</b>
<b>4.4 Monitoramento da atividade alimentar de <i>M. persicae</i> em diferentes cultivares de batata .....</b>	<b>105</b>
<b>4.5 Avaliação de métodos físicos de controle de insetos vetores de fitovírus.....</b>	<b>119</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>126</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>128</b>

**COMPORTAMENTO DE *Myzus persicae* (SULZER) (HEMIPTERA:  
APHIDIDAE) E TRANSMISSÃO DE ESTIRPES DE *Potato virus Y*  
(PVY) EM DIFERENTES CULTIVARES DE BATATA**

**Autor: FERNANDO JAVIER SANHUEZA SALAS  
Orientador: PROF. DR. JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES**

**RESUMO**

Na cultura de batata (*Solanum tuberosum* L.), os afídeos se destacam pela transmissão de muitos vírus, sendo fundamental o estudo da interação planta-vírus-vetor para o estabelecimento de medidas adequadas de manejo. Este trabalho teve como principais objetivos identificar estirpes do vírus Y da batata (*Potato virus Y* – PVY) presentes em três áreas produtoras do Estado de São Paulo (Capão Bonito, Itapetininga e Paranapanema), estudar a sua transmissão por afídeos para cultivares de batata e caracterizar o comportamento alimentar do vetor *Myzus persicae* (Sulzer) nesses cultivares. Para tal, realizaram-se testes com os cultivares Ágata, Jaette Bintje, Mondial, Monalisa (Brasil) e Santè (Espanha) buscando-se avaliar a resistência à transmissão de PVY, o efeito sobre o desenvolvimento

(antibiose) e a não-preferência (antixenose) por afídeos, além de um ensaio comparando a eficiência de transmissão por *M. persicae* e *Aphis gossypii*. O comportamento alimentar de *M. persicae* no interior do tecido vegetal foi caracterizado pela técnica de “Electrical Penetration Graph” (EPG), visando a identificação de possíveis fatores de resistência a este inseto. A caracterização biológica, sorológica e molecular dos isolados de PVY indicou a ocorrência das estirpes PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup> e PVY<sup>N</sup> e PVY<sup>NTN</sup> na região sudoeste do Estado de São Paulo. As estirpes PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N</sup> e PVY<sup>NTN</sup> são transmitidas por *A. gossypii* e *M. persicae*, porém com maior eficiência pelo último. Quanto à transmissão das estirpes de PVY por *M. persicae* para diferentes cultivares de batata, observou-se uma variação na porcentagem de infecção de acordo com a estirpe testada, indicando diferentes níveis de resistência. O cultivar espanhol Santè foi resistente a todas as estirpes, enquanto que os demais foram suscetíveis ou apresentaram apenas resistência moderada. Os ensaios de livre escolha mostraram preferência de *M. persicae* pelo cv. Mondial, e nenhuma diferença significativa entre os demais cultivares. O estudo de antibiose indicou menor crescimento populacional (antibiose) deste afídeo no cv. Monalisa em relação aos outros dois cultivares avaliados, Ágata e Jaette Bintje. O monitoramento alimentar de *M. persicae* por EPG indicou que o cultivar Santè inibe o início da alimentação sobre a planta, enquanto que em ‘Monalisa’ observou-se um comportamento que sugere resistência física à alimentação. O cultivar Mondial mostrou valores intermediários para todas as variáveis de EPG analisadas, com altas taxas de ingestão floemática, e um indício de resistência ao nível de

**floema. O comportamento alimentar em 'Jaette Bintje' mostra que este cultivar é um ótimo hospedeiro para alimentação e colonização. Em caráter complementar, avaliou-se o impacto de barreiras físicas (telado, plantas de soja e cobertura flutuante) sobre a incidência de afídeos em plantio de batata em Paranapanema, SP, observando-se um menor número de afídeos em plantas protegidas pela cobertura flutuante até os primeiros 57 dias após o plantio (45 após a cobertura).**

**BEHAVIOR OF *Myzus persicae* (SULZER) (HEMIPTERA:  
APHIDIDAE) AND TRANSMISSION OF *Potato virus Y* (PVY)  
STRAINS ON DIFERENT POTATO CULTIVARS**

**Author: FERNANDO JAVIER SANHUEZA SALAS  
Adviser: Prof. Dr. JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES**

**SUMMARY**

Because aphids are important virus vectors in potato (*Solanum tuberosum* L.) crops, studies on aphid-plant-virus interactions are necessary for establishment of proper management strategies. This research was carried out to study transmission of *Potato virus Y* (PVY) strains to potato cultivars and to characterize the behavior of the aphid vector *Myzus persicae* (Sulzer) on these cultivars. Five potato cultivars (Ágata, Jaette Bintje, Mondial, Monalisa e Santè) were tested regarding their resistance to PVY transmission and effects on aphid development (antibiosis) and preference (antixenosis). The probing behavior of *M. persicae* inside the plant tissue was monitored and characterized by the Electrical Penetration Graph (EPG) technique, in order to identify possible resistance factors to this aphid. In addition, a survey of PVY strains was carried out in three production areas of southwestern State of



São Paulo: Capão Bonito, Itapetininga and Paranapanema. Four PVY strains (PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup> e PVY<sup>C</sup> e PVY<sup>NTN</sup>) were detected in samples of diseased plants from these areas based on symptomatology (indicator plants) as well as serological and molecular assays. The strains PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N</sup> e PVY<sup>NTN</sup> were transmitted more efficiently by *M. persicae* compared with *Aphis gossypii* Glover. Transmission rates of PVY strains by *M. persicae* were variable depending on the potato cultivar, indicating various resistance levels among the cultivars. The spanish cultivar Santè was resistant to all strains tested, whereas the others were either susceptible or moderately resistant. The choice tests showed preference of *M. persicae* for cv. Mondial; no significant differences were found among the other cultivars. The antibiosis study indicated lower population increase of this aphid on cv. Monalisa than on the other two cultivars tested, Ágata e Jaette Bintje. The electronic feeding monitoring by EPG indicated that cv. Santè inhibited aphid probing, whereas cv. Monalisa induces a behavior that suggests physical resistance against feeding. Intermediate values for all EPG variables were observed on cv. Mondial, showing evidence of resistance at the epidermis and mesophyll level, but with long periods of phloem ingestion. The feeding behavior on cv. Jaette Bintje shows that it is an excellent host for aphid feeding and colonization. Finally, a field study was carried out to evaluate the effect of physical barriers (screen, soybean plants and floating row cover) on the incidence of aphids on a potato planting in Paranapanema, SP. A lower number of aphids was observed on plants protected by

**the floating cover during the first 57 days after planting (45 days after covering).**

**COMPORTAMIENTO DE *Myzus persicae* (SULZER) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) Y TRANSMISIÓN DE DIFERENTES ESTIRPES DEL *Potato virus Y* (PVY) EN DIFERENTES CULTIVARES DE PATATA**

**Autor: FERNANDO JAVIER SANHUEZA SALAS**

**Director: PROF. DR. JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES**

**RESUMEN**

En el cultivo de la patata (*Solanum tuberosum* L.), los afideos se destacan por la transmisión de diversos virus, siendo importantes los estudios de interacción entre planta-virus-vector para el establecimiento de medidas adecuadas de control. En el presente trabajo se identificaron algunos aislados del virus Y de la patata (*Potato virus Y* – PVY) presentes en tres áreas productoras del Estado de São Paulo (Capão Bonito, Itapetininga e Paranapanema) en Brasil, también se estudio la transmisión por afideos en cultivares comerciales de patata así como el comportamiento alimenticio del vector *Myzus persicae* en estos cultivares. Para esto, se realizaron ensayos en los cultivares Ágata, Jaette Bintje, Mundial, Monalisa (Brasil) e Santè (Espanha) donde se evaluó la resistencia al proceso de transmisión de PVY, el

desenvolvimiento (antibiosis) y la no-preferencia por afídeos, y también, un experimento donde se comparó la eficiencia de transmisión por *M. persicae* e *Aphis gossypii*. El comportamiento alimenticio de *M. persicae*, en el interior del tejido vegetal, fue caracterizado a través de la técnica de “Electrical Penetration Graph” (EPG), visando identificar posibles factores de resistencia al insecto. La caracterización por síntomas en plantas indicadoras, serología y molecular de los aislados del PVY indico la ocurrencia de las estirpes PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>N</sup> e PVY<sup>NTN</sup> en el Sudoeste del Estado de São Paulo. Las estirpes PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N</sup> e PVY<sup>NTN</sup> se transmiten por *A. gossypii* y por *M. persicae*, sin embargo el último tiene mayor eficiencia. Cuanto a la transmisión de las estirpes de PVY por *M. persicae* para los diferentes cultivares de patata se observó una variación en el porcentaje de infección de acuerdo con el aislado evaluado, lo que indica diferentes niveles de resistencia. El cultivar español Santè fue resistente a todas las estirpes, mientras que los demás fueron susceptibles o presentaron apenas una resistencia moderada. En los experimentos de libre elección se detectó una preferencia de *M. persicae* por el cultivar Mundial, y ninguna diferencia significativa entre los demás cultivares. El estudio de la antibiosis indico un menor desenvolvimiento de este afídeo en el cultivar Monalisa frente a los otros dos cultivares evaluados, Ágata y Jaette Bintje. Los estudios empleando la técnica de gráficos de penetración electrónica (EPG) indicaron que el cultivar Santè inhibe el inicio de la alimentación sobre la planta, mientras que en ‘Monalisa’ se observó un comportamiento que sugiere resistencia física a la

alimentación. La variedad 'Mondial' mostró valores con altas tasas de ingestión floemática y un indicio de resistencia a nivel de epiderme y mesófilo. El comportamiento alimentar en 'Jaette Bintje' muestra que este cultivar es una optima planta huésped para alimentación y colonización. En carácter complementario, se evaluó el impacto sobre las barreras físicas (telado, plantas de soja y cubiertas flotantes) sobre la incidencia de afídeos en el plantío de patata en Paranapanema, SP. Se observó un menor número de afídeos en plantas protegidas con las cubiertas flotantes hasta los primeros 57 días después del plantío (45 días después de cubrir). El PVY fue detectado en la cultura, con algunas variaciones en la tasa de infección de las muestras colectadas.

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura de batata, batata inglesa ou batatinha (*Solanum tuberosum* L.) tem seu ponto de origem nas regiões andinas da América do Sul, sendo oriunda de países como Peru, Bolívia e Chile. Esta se destaca por ser uma das hortaliças mais cultivadas e consumidas no mundo. No Brasil, os Estados responsáveis pelas maiores produções são: Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, responsáveis por mais de 95% da produção do país. O cultivo de batata é acometido por aproximadamente 70 doenças causadas por diferentes patógenos, sendo que cerca de 23 são de etiologia viral (Moraes et al., 1997).

No Brasil, as principais doenças causadas por fitovírus que ocorrem na cultura de batata são: o enrolamento da folha da batata ("Potato leafroll *luteovirus*" - PLRV), o vírus Y da batata ("Potato Y *Potyviridae*" - PVY) e, ocasionalmente os vírus A ("Potato A *Potyviridae*" - PVA) e os latentes vírus X ("Potato X *Potexvirus*" - PVX), vírus M ("Potato M *Carlavirus*" - PVM) e vírus S ("Potato S *Carlavirus*" - PVS).

Na década de 30, Silberschmidt (1937; 1939a; 1939b) realizou estudos sobre a degenerescência da batatinha, problema que na época ainda não se associava à infecção viral. No entanto, Kramer (1939) discutindo hipóteses formuladas por grupos de cientistas afirmou que a doença era causada por

vírus. Posteriormente Silberschmidt & Kramer (1942) relataram que uma das principais causas desta degenerescência em batata-semente era o PVY, alertando os produtores quanto à importância de empregar medidas de controle adequadas, principalmente no controle do seu inseto vetor (Orlando & Silberschmidt, 1945). Atualmente, a infecção pelo vírus Y da batata vem crescendo em importância nas lavouras de Minas Gerais, Rio Grande do Sul e de São Paulo (Figueira, 1995; Souza Dias, 1995; Daniels, 1996). A predominância de insetos vetores, principalmente dos afídeos *Myzus persicae* Sulzer (Cupertino et al., 1992) e *M. nicotianae* Blackman (Cupertino et al., 1993) na forma alada, durante o ano todo e a presença de inúmeras plantas alternativas que servem como hospedeiras tanto para o inseto vetor quanto para os fitovírus favorecem a disseminação e estabelecimento de viroses nas áreas de produção.

Uma das principais formas de controle envolve o plantio de cultivares resistentes ao PVY (Daniels, 2000) ou então ao seu inseto vetor (Stein, 1998; La Pointe & Tinguey, 1984), no entanto, poucos são os trabalhos que relacionam o trinômio vírus – vetor – planta hospedeira. A técnica de monitoramento eletrônico de atividade estiletar de insetos, denominada “Electrical Penetration Graph” (EPG), vem sendo utilizada para selecionar variedades de batata resistentes a afídeos e tem auxiliando na compreensão do mecanismo de transmissão de fitovírus, baseando-se em estudos do comportamento alimentar desses insetos (Powell et al., 1995; Prado, 1997).

Sendo assim, estudos relacionados com a caracterização das estirpes e isolados de vírus, principalmente os que se constituem em fator limitante à cultura da batata, e sobre a sua

associação com os insetos vetores são de grande importância para se determinar métodos de controle mais apropriados.

No presente trabalho, realizou-se um levantamento de estirpes de PVY em batata nos municípios paulistas de Capão Bonito, Itapetininga e Paranapanema e determinou-se a eficiência dessas estirpes por afídeos vetores encontrados na cultura. Em seguida, estudou-se o comportamento alimentar do vetor mais eficiente, *M. persicae*, em cultivares de batata com graus variáveis de resistência a afídeos e ao processo de transmissão, através de testes de livre escolha e da técnica de EPG. Finalmente avaliou-se o efeito de medidas físicas de controle sobre a incidência de afídeos vetores em plantio de batata.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A Família *Potyviridae*

A família *Potyviridae* é a maior entre os fitovírus e do ponto de vista econômico a mais importante pois 20% dos vírus de plantas pertencem a esta família (Zerbini & Zambolim, 1999).

O círculo de hospedeiras dos *Potyviridae* é variável pois há membros que infectam um número intermediário de espécies vegetais e outros que infectam um número superior a 30 famílias pertencentes tanto a mono quanto a dicotiledôneas (Van Regenmortel et al., 2000). O primeiro registro de doença relacionada a um *Potyvirus* data do século XVII, quando tulipas variegadas, na verdade infectadas pelo TBV ("*Tulip breaking virus*" - vírus da variação da tulipa), foram intensamente comercializadas na Holanda por valores incrivelmente elevados (Matthews, 2001).

Estas espécies de vírus são, atualmente, agrupadas em 6 gêneros (*Potyvirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus* e *Bymovirus*) (Van Regenmortel et al., 2000), que diferem quanto à organização do genoma e no tipo de vetor, além de apresentarem distinta distribuição geográfica ao redor do mundo. Os *Ipomovirus* ocorrem na África, Ásia e América do Sul; já os fitovírus dos gêneros *Bymovirus*, *Rymovirus* e *Macluravirus* se restringem às zonas temperadas da América do norte, Europa e Japão; os *Tritimovirus* foram descritos na

América do Norte e regiões temperadas da Europa (Brunt, 1990).

Quanto às formas de transmissão. Os gêneros *Macluravirus* e *Potyvirus* são transmitidos por afídeos de maneira não-persistente, sendo que neste segundo caso algumas das espécies são transmitidas de maneira ineficiente ou simplesmente não se transmitem. Os vírus do gênero *Ipomovirus* são transmitidos de maneira não persistente por *Bemisia tabaci* (Aleyroidídeo) e não por afídeos. Isto se justifica pela própria conformação da capa protéica, que é incompleta ou simplesmente se perde nas relações com outros vetores. Os vírus classificados nos gêneros *Rymovirus* e *Tritimovirus* são transmitidos por ácaros eriofiídeos, sendo que no segundo gênero a transmissão se dá de forma persistente. O gênero *Bymovirus* se caracteriza por ser transmitido pelo fungo *Polymyxa graminis* (Van Regenmortel et al., 2000).

Os *Potyvirus*, de uma maneira geral, possuem partículas alongadas, flexuosas, com 690-760 nm de comprimento por 11-16 nm de diâmetro. O material genético é composto por uma ou duas moléculas de RNA de fita simples, sentido positivo. O RNA viral é envolto por cerca de 2.200 cópias de uma proteína capsidial com peso molecular de 34kDa. A formação de corpos de inclusão viral do tipo cata-vento (“pinwheels”) é induzida por todos os membros desta família, sendo uma importante forma de caracterização.

No Brasil os principais gêneros de afídeos vetores de vírus da família *Potyviridae* são: *Aphis* spp., *Hysteroneura* spp., *Metopolophium* spp., *Myzus* spp., *Macrosiphum* spp., *Schizaphis* spp. e *Uroleucon* spp. , como mostra a Tabela 1.

**Tabela 1 - Lista de vírus da família *Potyviridae* descritos no Brasil (Kitajima, 1986; 1995) e seus respectivos insetos vetores (Costa, 1998)**

<b>Vírus</b>	<b>Inseto vetor</b>
<i>Aphid-borne cowpea mosaic</i>	<i>Aphis craccivora</i>
<i>Artichoke latent</i>	Não descrito
<i>Bean common mosaic</i>	<i>Aphis craccivora</i> , <i>A. fabae</i> , <i>A. gossypii</i> , <i>A. nerii</i> , <i>A. solanella</i> , <i>A. spiraecola</i> , <i>Macrosiphum euphorbiae</i> , <i>Myzus persicae</i> , <i>M. nicotinae</i> , <i>Uroleucon ambrosiae</i>
<i>Bean yellow mosaic</i>	<i>Aphis coreopsidis</i> , <i>A. solanella</i> , <i>Macrosiphum euphorbiae</i>
<i>Bidens mosaic</i>	<i>Aphis coreopsidis</i> , <i>Myzus persicae</i> , <i>Uroleucon sonchii</i>
<i>Blackeye cowpea mosaic</i>	<i>Myzus persicae</i>
<i>Canavalia mosaic</i>	<i>Aphis gossypii</i> , <i>A. solanella</i> , <i>Myzus persicae</i> , <i>Toxoptera aurantii</i> , <i>T. citricidus</i> , <i>Uroleucon ambrosiae</i>
<i>Carrot mottle</i>	Não descrito
<i>Cassia hoffmanseggi mosaic</i>	Não descrito
<i>Celery yellow mosaic</i>	<i>Myzus persicae</i>
<i>Cowpea green veinbanding</i>	Não descrito
<i>Cowpea rugose mosaic</i>	<i>Myzus persicae</i> , <i>Aphis spiraecola</i>
<i>Cowpea severe mottle</i>	<i>Myzus persicae</i>
<i>Dasheen mosaic</i>	Não descrito
<i>Digitaria vírus</i>	Não descrito
<i>Dioscorea mosaic</i>	Não descrito
<i>Garlic yellow stripe</i>	Não descrito
<i>Lettuce mosaic</i>	<i>Hyperomyzus lactucae</i>
<i>Malva vein clearing</i>	Não descrito
<i>Onion yellow dwarf</i>	<i>A. gossypii</i> , <i>M. persicae</i> , <i>Neotoxoptera oliveri</i> , <i>Uroleucon ambrosiae</i>

**Tabela 1 - Lista de vírus da família *Potyviridae* descritos no Brasil (Kitajima, 1986; 1995) e seus respectivos insetos vetores(Costa, 1998)**

<b>Vírus</b>	<b>Inseto vetor</b>
<b>Papaya ringspot – W</b>	<i>Aphis craccivora</i> , <i>A. gossypii</i> , <i>A. solanella</i> , <i>A. spiraecola</i> , <i>Hyperomyzus carduelinus</i> , <i>Myzus persicae</i> , <i>Schizaphis graminum</i> , <i>Uroleucon ambrosiae</i>
<b>Papaya ringspot – P</b>	<i>Toxoptera citricidus</i>
<b>Passionfruit woodiness</b>	<i>Myzus nicotinae</i> , <i>M. persicae</i> , <i>Aphis fabae</i> , <i>A. nerii</i> ,
<b>Patchuli mosaica</b>	Não descrito
<b>Peanut mottle</b>	Não descrito
<b>Potato virus A</b>	Não descrito
<b>Potato virus Y</b>	<i>Aphis solanella</i> , <i>Chaetosiphon fragaefolii</i> , <i>Macrosiphum euphorbiae</i> , <i>Myzus nicotianae</i> , <i>M. persicae</i>
<b>Soybean mosaica</b>	<i>Aphis gossypii</i> , <i>A. solanella</i> , <i>Hysteroneura setariae</i> , <i>Metopolophium dirhodum</i> , <i>Myzus nicotinae</i> , <i>M. persicae</i> , <i>Macrosiphum euphorbiae</i> , <i>Schizaphis graminum</i> , <i>Uroleucon ambrosiae</i>
<b>Soybean yellow top</b>	Não descrito
<b>Sugarcane mosaica</b>	<i>Ropalosiphum maidis</i>
<b>Sweet potato mosaica</b>	Não descrito
<b>Tradescantia mosaica</b>	Não descrito
<b>Tropaeolum mosaica</b>	Não descrito
<b>Turnip mosaica</b>	<i>Brevicoryne brassicae</i> , <i>Lipaphis erysimi</i> , <i>Myzus persicae</i>

## 2.2 Vírus Y da batata ("*Potato Y virus*" - PVY)

O gênero *Potyvirus* possui uma ampla distribuição, principalmente nos países tropicais e subtropicais. Os vírus do gênero *Potyvirus*, mais especificamente o vírus Y da batata ("*Potato Y virus*" - PVY) foi descrito pela primeira vez no Reino Unido em plantas de *Solanum tuberosum* – batata e entre as hospedeiras naturais destacam-se as espécies: *S. tuberosum*; *Capsicum* spp.; *Nicotiana* spp. e *Lycopersicon esculentum*.

A grande maioria de vírus pertencentes a este gênero induz sintomas de mosaico nas folhas das plantas infectadas que podem ser evidenciados nas flores, frutos e sementes. Além deste tipo de sintoma outros freqüentemente observados são: pontos cloróticos, faixa-das-nervuras, mosaico, mosqueado, deformação foliar e necrose (Hollings & Brunt, 1981).

Quanto à diferenciação, os isolados de PVY são divididos em três subgrupos com base nas suas propriedades biológicas, principalmente na sintomatologia induzida em suas plantas hospedeiras. O PVY<sup>O</sup> (ordinário - "ordinary") causa sintomas de mosaico em plantas de *Nicotiana tabacum* e sintomas de bolhosidades em folhas de batata (*S. tuberosum*). O PVY<sup>C</sup>(clorótico - "chlorotic") causa mosqueado em plantas de *N. tabacum* e mosaico e estriado em *S. tuberosum*. No entanto, a forma mais severa dos três subgrupos é sem dúvida a forma necrótica ("necrotic"), o PVY<sup>N</sup> causa necrose de nervuras em *N. tabacum* e mosqueado leve em *S. tuberosum*.

### 2.3 Transmissão de vírus do gênero *Potyvirus*

Entre os processos de transmissão um dos mais estudados quanto aos compostos e ao próprio modelo envolvido encontram-se os *Potyvirus*. Os primeiros trabalhos relevantes que envolvem estudos do processo de transmissão deste grupo datam do século passado, onde inicialmente Kennedy et al. (1962) sugeriam o termo *carreado no estilete* ou *transmissão estiletar* ("stylet-borne") para os vírus vegetais pertencentes a este gênero. A partir deste, inúmeros trabalhos abordando o tema foram desenvolvidos e, até o presente momento os *Potyvirus* se constituem em um requisitado alvo de estudos (Costa, 1998)

A seqüência completa de nucleotídeos para diversos membros deste grupo já é conhecida, possuem uma partícula flexuosa de cerca de 9800 nucleotídeos, o RNA compreende cerca de 5,4 - 6,4% do total da massa da partícula. O genoma viral apresenta uma única fase aberta de leitura (ORF . open reading frame) que traduz uma poliproteína, a qual sofre processamento pós-traducional originando as nove proteínas (virais) com diferentes funções (Zerbini & Zambolim, 1999), no entanto, entre as informações das proteínas produzidas pelo mecanismo de tradução e replicação envolvido, destaca-se pela importância no processo de transmissão, a segunda região a partir do terminal 5' da fase aberta de leitura, responsável pela codificação dos componentes auxiliares ("helper component"-HC), denominada HC-Pro.

Para que o HC possa mediar o processo de transmissão, este necessita ser ingerido antes ou junto com o vírus (Grovier & Kassanis, 1974). Segundo Pirone & Wang (1999) as funções

do componente auxiliar (HC) são: a) funcionar como uma "ponte" interagindo tanto com os virions quanto com o canal alimentar dos estiletes e, b) permitir a retenção dos virions no sítio que será inoculado. Grovier & Kassanis (1974) anteriormente já haviam evidenciado esta mesma interação, sendo que para que isto ocorresse era necessário à presença de uma determinada seqüência de aminoácidos próxima do terminal amino da proteína capsidal, exposta na superfície do vírus.

Posteriormente, esta seqüência foi identificada por Pirone & Blanc (1996), como sendo um tripeptídeo: ácido aspártico - alanina - glicina ou DAG no código de uma letra só.

Algumas evidências feitas por estudos envolvendo técnicas de autoradiografia mostraram que a transmissão é associada com a retenção de vírions na porção distal do canal alimentar formado pelos estiletes maxilares (Pirone & Wang, 1999).

#### 2.4 Comportamento alimentar de afídeos – escolha de hospedeira

Os insetos atravessaram um longo e variado período de co-evolução e co-adaptação com as suas plantas hospedeiras. Sendo assim, não é surpreendente que diferentes grupos tenham desenvolvido diferentes modelos de associação com suas correspondentes hospedeiras, utilizando estratégias distintas, sejam estas, no ciclo biológico ou nos mecanismos alimentares necessários para a "exploração" das mesmas. Entre estes grupos destacam-se algumas espécies de afídeos pela sua característica de polifagia na sua alimentação.

Cada espécie de planta tem o seu odor, sabor, cor e forma particular, sendo estas as referências básicas que o inseto utiliza para localizar e reconhecer suas hospedeiras. A seleção da planta-hospedeira tem sido descrita como uma seqüência ou um processo em cadeia que implica em um número de etapas sucessivas que finalmente termina na alimentação ou na oviposição do inseto sobre a planta.

Em cada etapa está implícita uma resposta comportamental a um estímulo específico, e se o inseto percebe que está correto, então este se move em direção à etapa seguinte, contudo, se este estímulo é errado, a seqüência da cadeia se quebra. Uma representação da seqüência comportamental para insetos fitófagos na seleção da hospedeira pode ser observada na Figura 1.

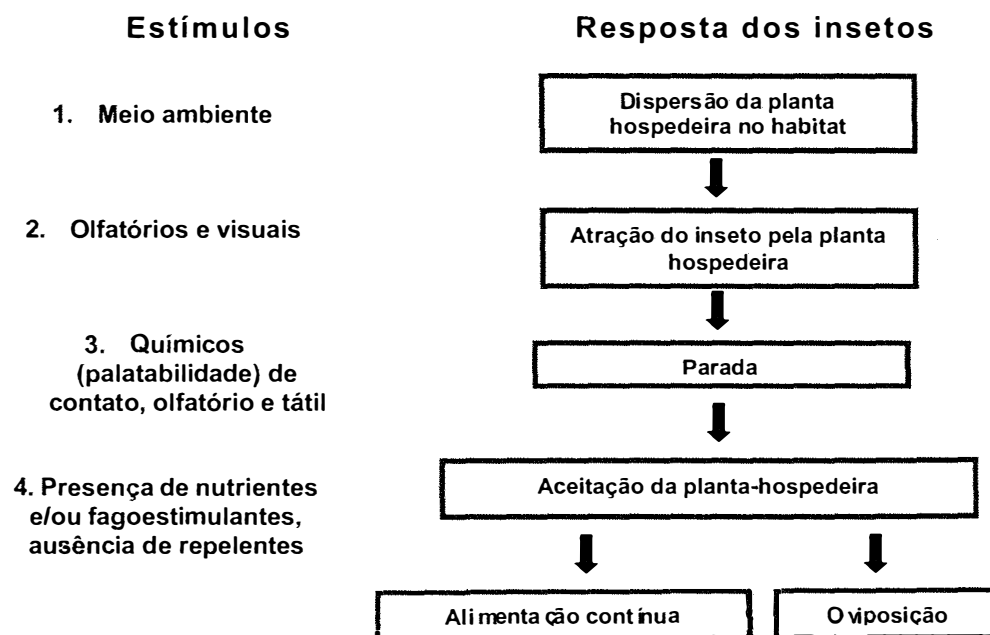


Figura 1 – Representação esquemática da seleção da planta hospedeira por insetos fitófagos (Hodkinson & Hedges, 1993)



Segundo Edwards & Wratten (1981) dos processos envolvidos na busca do hospedeiro pelos insetos, o que diz respeito ao reconhecimento é o mais fácil de simular realisticamente em laboratório, fornecendo a maioria das evidências experimentais de efeitos positivos e/ou negativos das substâncias envolvidas neste evento.

Diversos autores (Kennedy ,1976; Edwards & Wratten, 1981; Klingauf, 1987) afirmam que em alguns pulgões a atração parece ser visual e não específica; resposta a cor verde e amarela da vegetação.

Por outro lado alguns autores (Chapman et al., 1981; La Pointe & Tingey, 1984) afirmam que não há comportamento de encontro específico para o hospedeiro, empregando a percepção por cores, mas que a detecção de substâncias químicas que se segue ao pouso é o processo mais importante na escolha do hospedeiro.

Diversas espécies de afídeos produzem um grande número de migradores alados em resposta à superpopulação ou más condições da planta hospedeira. No caso do afídeo do grão de bico (*Aphis fabae*) esses migradores, quando alçam vôo, respondem a comprimentos de ondas curtas (características ao sol e a luz do céu) e voam para cima (Kennedy & Fosbrooke, 1972).

#### 2.4.1 Resposta a diferentes ondas (curtas e longas) que compõem a luz visível

Os afídeos respondem a diferentes comprimentos de onda da luz, dependendo do seu estágio de desenvolvimento, o

grau de densidade da população, a adequação da planta hospedeira e outras condições do meio, tais como a temperatura e a velocidade do vento (Klingauf, 1989; Robert, 1989).

Após um intervalo de tempo, posterior a última muda, os afídeos adultos (alados) entram em uma fase em que rejeitam a velha planta hospedeira, não respondendo da mesma maneira que no início, pois a sensibilidade aos diferentes comprimentos de ondas cai, sendo atraídos pelas ondas curtas do espectro azul-ultravioleta formado pela luz do céu. Quando isto ocorre e outras condições são favoráveis (vento, umidade, precipitações, temperatura), os afídeos procedem a “decolagem” e entram em sua fase migratória (Robert, 1989).

Os afídeos continuam a subir em direção ao céu, onde após algum tempo entram em um outro tipo de vôo, denominado de “fase de cruzeiro”, onde estes desenvolvem um vôo horizontal, que é o mais freqüente. No entanto, nesta fase de vôo horizontal os pulgões vão sendo atraídos progressivamente pelos comprimentos de onda longos, características ao solo e as plantas. É neste momento que os afídeos são orientados e seguem melhor as cores laranja-amarelo-verde, que são refletidas pelas plantas (Gibson & Rice, 1989; Chapman et al., 1981; Robert, 1989). Sabe-se que estes insetos aterrisam com maior probabilidade em uma planta visível contra o solo descoberto, do que em uma planta que passa despercebida “camuflada” em meio à outra vegetação.

Estas cores quando combinadas com outros impulsos visuais, tais como: tamanho, forma e contraste que a planta ou outros objetos adjacentes possuam, servem como fundo na detecção da hospedeira. Os afídeos preferem objetos largos ou

plantas que se encontrem sozinhas e pequenas, estando facilmente visualizadas (Gibson & Rice, 1989; Dunn, 1969), plantas ou objetos que contrastem com o fundo, preferencialmente que quando misturados e culturas que estejam semeadas de uma maneira mais espaçada, que quando estas culturas se encontram mais adensadas (Heathcote, 1969).

Uma vez que os afídeos migratórios tenham aterrissado em uma planta atrativa no solo estes iniciam a fase de “decisão” e “checagem” do potencial que a nova hospedeira oferece (Kennedy et al., 1961). Normalmente estes insetos dão preferência a objetos que apresentem cor apropriada (principalmente amarelo) e tamanho ideal (principalmente em largura).

Outros pesquisadores alegam que o pulgão tem a necessidade de voar para consumir a energia adquirida nas fases anteriores e posteriormente estabelecer-se em outra planta hospedeira. Após a sua decolagem, sempre sob condições que favoreçam o seu vôo (temperatura, luz e comprimento de onda), estes aterrisam nas novas hospedeiras.

Caso esta interação (inseto/planta hospedeira) não ocorra os insetos realizam novos vôos de reconhecimento, até se atingir a exaustão neurológica e posteriormente a morte no caso deste não conseguir se estabelecer, ou atingir uma planta hospedeira.

#### 2.4.2 Resposta aos odores da planta hospedeira

De acordo com Edwards & Wratten (1981) nos afídeos, a discriminação do hospedeiro ocorre após o pouso. Segundo

Pickett et al. (1992) há evidências que sugerem a idéia de que estes insetos são orientados durante o vôo em direção a sua planta hospedeira devido aos odores inerentes a espécie em questão. Chapman et al. (1981), mostrou que o pulgão da cenoura, *Caraviela aegopodii*, pode ser pego em armadilhas quando se emprega a substância “carvone” um dos odores normalmente encontrados na planta hospedeira.

Quando esta armadilha foi combinada com coloração amarela, se coletou um maior número de afídeos, quando comparado com tratamentos em que se empregaram outras cores. Por outro lado ao se empregar “Linalool”, um outro composto volátil da planta, que possui odor característico, é um repelente, significando uma redução no número de adultos capturados.

Alguns experimentos conduzidos por Nottingham & Hardie (1993) onde se estudou o comportamento de vôo de duas espécies de afídeos: *Aphis fabae*, “o pulgão do feijão preto”; e *Brevicoryne brassicae*, “o pulgão da couve”, nos quais se utilizaram plantas que não apresentavam odores das plantas hospedeiras destes insetos (*Tanacetum vulgare* – “crisântemo” - e *Satureja hortensis* – “seguralha”), mostraram que quando estes odores eram apresentados aos insetos em um olfatômetro não ocorreram falsas respostas para *B. brassicae*, enquanto a espécie *A. fabae* foi repelida. Os resultados mostraram um decréscimo na atração de *A. fabae* pelas suas hospedeiras normais, ou seja, ocorreu uma inibição da atração.

Contudo, nos ensaios realizados em uma câmara de vôo nenhuma das situações acima relatadas quando se misturaram odores de plantas não-hospedeiras com os de plantas

hospedeiras afetaram a direção do vôo. Somente se alteraram os padrões de vôo quando os odores da planta não-hospedeira (*T. vulgare*) se adicionaram os odores de feijão (planta hospedeira) notando-se uma resposta significativa de *A. fabae*, alterando o seu comportamento. Os resultados deste teste mostraram que as plantas não hospedeiras podem alterar o comportamento dos afídeos no seu vôo de reconhecimento, porém dificilmente na escolha da hospedeira onde este se fixará.

Visser & Taanman (1987) conduziram experimentos utilizando adultos alados de *Cryptomyzus korschelti* para determinar as respostas à orientação pelos odores da planta hospedeira. Para tal, os afídeos foram submetidos a quatro tratamentos em um túnel de vento, sendo estes: a) sem vento; b) vento limpo; c) vento carregando partículas de odor de *Stachy sylvatica*, uma erva da família *Labiatae* (planta-hospedeira) e d) vento carregando partículas de odor de *S. tuberosum* (planta não-hospedeira). As trilhas foram registradas. Apenas o tratamento com odor da planta hospedeira resultou em uma orientação positiva acima da influência do vento nos afídeos testados. Todos os outros testes não mostraram mudança de comportamento de vôo nos afídeos.

Os autores interpretaram as respostas acima da corrente de vento pelos afídeos, como se tratando de um fenômeno denominado anemotaxia. Este fenômeno pode ser considerado uma anemotaxia positiva visto que o comportamento é condicionado pelo odor da planta hospedeira.

No entanto há alguns autores que citam que a aceitação final da planta é um fator dependente da natureza da seiva do

floema (Dorschner & Kenny, 1992). Alguns pulgões são altamente específicos quanto à hospedeira, sendo que a seiva possui alguns elementos químicos específicos aos quais os insetos são tolerantes, ou seja, estes indivíduos se alimentam exclusivamente da seiva de uma única espécie ou de um círculo de hospedeiras muito restrito. Não se explicou o motivo do porque estas substâncias eram fagoestimulantes para alguns afídeos e fagodeterrentes para outros.

O número de compostos presentes na superfície da folha e de substâncias secundárias inerentes a planta, influenciam o estabelecimento dos afídeos. Por exemplo, o Phlorizin (um flavonóide glucosídico) presente em macieira provavelmente é o "estimulante de prova" para "o pulgão verde do pessegueiro" (*Aphis pomi*) e para "o pulgão pastador da maçã" (*Rhopalosiphum insertum*). Por outro lado, a mesma substância (Phlorizin) provavelmente é deterrente para os afídeos que não são especializados em maçã, como no caso de *Myzus persicae* e *Amphorophora agathonica* (Pickett et al., 1992). Outra substância secundária que funciona como deterrente de alimentação para *Myzus persicae* é a Azadiractina, extraída das sementes do "neem" (*Azadiracta indica*).

De uma maneira geral podemos observar que a "decisão" de ficar ou partir, em espécies de afídeos, se baseia principalmente na presença ou não de substâncias químicas vegetais secundárias que sem dúvida alguma necessitam obedecer a uma determinada concentração, na planta-hospedeira.

### 2.4.3 Resposta a feromônios

Diversos alomônios têm sido estudados e descritos na literatura mundial. Um exemplo que pode ser citado é a relação entre *S. berthaultii*, um tipo de batata selvagem, e *Myzus persicae*. Esta planta produz uma substância que atua como feromônio de alarme de, dispersando os afídeos que tentam colonizá-la (Gibson & Picket, 1983).

Os feromônios também podem estar envolvidos no processo de seleção da planta pelo inseto. Um exemplo disto é o feromônio de alarme de afídeos ou (E)- $\beta$ -farnesene (EBF). Trata-se de um seqüiterpenóide linear que é produzido por uma grande quantidade de espécies de afídeos e presente, como se observou, em algumas espécies de plantas. Esta substância serve para avisar o ataque de parasitas e parasitóides. Trata-se de substância química produzida nos cornículos destes insetos e secretada fazendo parte do seu mecanismo de defesa, sendo detectada pelas antenas dos afídeos vizinhos. Quando os indivíduos detectam o EBF eles são estimulados a se dispersar, sendo isto feito através de caminhamento ou deixando-se cair ao solo (Herrbach, 1992).

O EBF é facilmente sintetizado quimicamente, no entanto, é uma substância altamente volátil e instável. A sensibilidade ao EBF varia de acordo com a espécie de afídeo, mostrou-se que em algumas espécies, quando se encontram na fase alada estas se tornam particularmente mais sensíveis.

A importância desta substância na seleção é justificada pelo fato deste feromônio também ser encontrado como componente de algumas plantas, como no caso da cevada (*Humulus lupulus*) em *Solanum berthaultii*, e também em

algumas espécies e/ou variedades de batata comercial, *S.tuberosum*, conseguindo assim alterar o comportamento na seleção da hospedeira (Herrbach, 1992; Pickett *et al.*, 1992).

Segundo Costa (1970) pouco existe documentado sobre esta relação entre migração de afídeos e a disseminação de vírus de plantas. Atualmente acredita-se que 70% dos fitovírus transmitidos por insetos vetores são disseminados por afídeos. Normalmente, por questões operacionais, os estudos são feitos com adultos ápteros, no entanto, na natureza, os afídeos que tem maior importância relativa, são os alados, pela possibilidade de vôo a longas distâncias, possibilitando a transmissão dos patógenos.

## 2.5 Comportamento alimentar de afídeos – alimentação intra-celular

Um dos principais requisitos para que um inseto seja considerado um bom vetor se refere ao tipo de alimentação. Dentro da ordem Homoptera o modo de penetração do estilete pode ser dividido em *dilacerador* (Heteroptera) e *portadores de bainha estiletar* (Hemiptera). Muitos foram os estudos realizados quanto à mecânica deste processo para afídeos, assim como a descrição do aparato bucal, as peças envolvidas, o modo de penetração do estilete, modo de penetração na parede da célula, enzimas envolvidas, etc. No entanto, o mais significativo aspecto é que neste processo a célula vegetal envolvida não seja danificada, visto que os vírus, ao serem parasitas intracelulares obrigatórios, necessitam da maquinaria celular para se replicar e assim dar início à infecção (Kimmins & Tjallingii, 1985).



Segundo Dixon (1998) o tipo de alimentação dos afídeos é altamente especializada obtendo todos os nutrientes que se fazem necessários a partir da seiva do floema das suas plantas hospedeiras. Por outro lado esta certa dependência é revertida em limitações no ponto de vista evolutivo da especificidade planta/inseto, na especiação e na sua distribuição geográfica.

De acordo com Garzo (2002) a maioria dos pulgões são monófagos e se alimentam de apenas uma planta hospedeira, porém algumas espécies são polífagas (*Myzus persicae*, *Aphis fabae* e *A. gossypii*) este fato é considerado menos freqüente do que se pensava (Gudelmond et al., 1994), principalmente pelo aparecimento de especiação ou o desenvolvimento de algumas raças geneticamente diferentes especializadas para determinada hospedeira.

O aparelho bucal dos pulgões é do tipo picador-sugador sendo adaptado para a penetração de tecidos e extração de nutrientes. É formado por dois pares de estiletos (mandibulares e maxilares), um labium e um labrum. O labrum é curto, cobrindo a base dos feixes estiletares, possuindo na sua superfície interna um sulco longitudinal que direciona o feixe estiletar. O labium (rosto ou probóscide), é um órgão segmentado em forma de calha e quando não está sendo utilizado na alimentação está posicionado na região ventral do inseto. Nos afídeos este apresenta cinco segmentos, porém quase sempre os segmentos 4 e 5 estão fundidos possuindo estruturas sensoriais na sua extremidade distal.

A probóscide apresenta as maxilas soldadas originando os estiletos maxilares onde se podem diferenciar dois canais: o canal alimentar, presente na região dorsal e medindo entre 1-

2 $\mu$ m de diâmetro e o canal salivar, localizado na região ventral com diâmetro menor (0,2-0,4 $\mu$ m) terminando em uma região terminal comum (Forbes, 1969; Costa, 1998). Os fluidos são succionados através do canal alimentar e a saliva pelo canal salivar.

O sistema salivar é formado por um par de glândulas principais e duas acessórias, enquanto o canal alimentar é formado pelo próprio canal oriundo dos estiletes, a bomba de sucção e do tubo digestivo dividido em estomodeu, mesêntero e proctodeu. O estomodeu se constitui da faringe (curta) e o esôfago (longo), posterior a isto se encontra o mesêntero dividido em estômago (saculiforme) e o estômago (longo e tubular). Finalmente o proctodeu formado pelo reto, constituído por finas paredes e o ânus.

As atividades desenvolvidas depois da escolha da hospedeira pelo pulgão se iniciam na sua chegada com uma exploração da cutícula com a finalidade de localizar um ponto adequado para realizar uma penetração (tanteando). Após a escolha do local o indivíduo deposita uma gota de saliva com o objetivo de dissolver algum de seus componentes e imediatamente inserir o estilete na epiderme da planta controlando a direção da porção distal do estilete. A válvula pré-cibarial esta controlada por dois músculos dorsais (abertura) e outros dois laterais (fechamento), quando relaxada a válvula permanece fechada isolando a faringe da zona do cibário. A bomba cibarial é responsável pela movimentação do líquido desde o canal alimentício até o esôfago.

A atividade estiletar durante a penetração e mesmo a sua salivagem e ingestão de fluídos já foram amplamente estudados

(Prado & Tjallingii, 1994; Prado,1998; Martin et al., 1997) através do monitoramento eletrônico de gráficos mostrando que o pulgão possui pelo menos quatro fases de secreção salivar durante a penetração dos estiletes na planta: secreção intracelular, salivação intracelular, salivação no interior dos vasos crivados do floema e salivação associada a ingestão de seiva do floema. Também se sabe que há dois tipos de saliva envolvidos na fase de secreção intracelular, a *saliva gelificante* que auxilia a bainha salivar, recobre e dá suporte ao estilete, além de lubrificá-lo durante a penetração conferindo a rigidez necessária. Além disto impede a entrada de ar nos tecidos do vaso e evita a saída de líquidos ou fluídos da célula. Esta saliva acaba sendo substituída periodicamente, graças à secreção de gotas no extremo terminal, deixando marcado o caminho seguido pelo estilete. Estas gotículas também são úteis para selar os orifícios de inserção dos estiletes maxilares preservando a viabilidade da célula (Pollard, 1969; Pollard,1977). A *saliva aquosa* é utilizada na digestão dos tecidos e na própria lubrificação dos estiletes, sendo que nas demais fases da secreção salivar esta envolvida no processo de ingestão-egestão onde podem ser trocadas determinadas substâncias entre o inseto e a planta hospedeira, inclusive fitovírus. Apesar de no início das pesquisas com insetos vetoresse pensar que esta interação se dava muito superficialmente, hoje se sabe que é um processo muito mais complexo, desde a escolha da planta até o próprio processo de penetração estiletar e transmissão do patógeno.

## 2.6 A técnica de EPG (“electrical penetration graph”) e seu emprego no estudo da transmissão de fitovírus por afídeos

A técnica de monitoramento eletrônico ou EPG (“*electrical penetration graph*”) é empregada no estudo das interações entre os insetos “praga”, suas peças bucais e outros organismos, no caso plantas. Esta metodologia se converteu em uma das ferramentas mais utilizadas no estudo do comportamento alimentar de insetos sugadores (Mc Lean & Kinsey, 1964; Gárzo, 2002) e no estudo dos gráficos de penetração elétrica (Tjallingii, 1978). Este processo é amplamente empregado principalmente para estudos envolvendo cigarrinhas (Backus & Hunter, 1989; Chang, 1978) e afídeos (Kiminis & Tjallingii, 1985; Tarn & Adams, 1982), além de tripes e cochonilhas em alguns ensaios esporádicos.

Esta técnica é empregada atualmente em várias frentes de pesquisa, tais como: avaliação da preferência alimentar de insetos por diferentes cultivares de plantas (La Pointe & Tingey, 1984), estudos envolvendo metabólitos secundários (Raman et al., 1979), ação de inseticidas (Holbrook, 1977) e também na compreensão do processo de transmissão de fitovírus (Feres et al., 1993; Martín et al., 1997; Leonard & Holbrook, 1978).

Os afídeos, pragas de diversas culturas de importância econômica, foram escolhidos como os pioneiros nos estudos onde se empregou a técnica de EPG (Mc Lean & Kinsey, 1964; 1965), esta consiste, de uma maneira geral, em incorporar o inseto e a planta em um circuito elétrico acoplado a um sistema de medição e um computador. A partir daí se registram as

mudanças de condutividade resultante do comportamento alimentar do inseto sobre a planta, pois estes diferentes eventos alteram a voltagem e causam oscilações quanto à frequência e amplitude que são registradas e avaliadas graças a padrões de onda já conhecidos (Tjallingii, 1985a; Prado, 1997).

Para estudos de resistência varietal o principal objetivo é localizar na planta tecidos implicados nos mecanismos de resistência a insetos (van Helden & Tjallingii, 1993), desta forma localizando a resistência em nível de epiderme, mesofilo ou floema (Chen et al., 1996) e depois de detectada defini-la como resistência física ou química. Segundo Van Helden & Tjallingii (2000) os principais parâmetros que se observam nos estudos relacionados com o EPG se dividem em: “*Parâmetros não-sequenciais*”, seriam aqueles que ajudam a ter uma impressão geral dos eventos e do estudo (duração total das ondas, frequência de acontecimento da onda, média da duração da onda). Os “*Parâmetros sequenciais*” são os mais importantes tipos de parâmetros, pois estes podem ser adaptados e moldados para favorecer a compreensão do estudo, alguns exemplos dos dados observados e analisados são: duração da primeira picada de prova, número de picadas de prova, duração da primeira penetração do estilete, duração da segunda picada de prova, duração do primeiro padrão E (atingindo o floema), número de penetrações após o primeiro padrão E, entre outros (Van Helden & Tjallingii, 1993).

Segundo Fereres & Collar (1999) nos anos mais recentes foram conseguidos inúmeros avanços para elucidar e compreender tanto os mecanismos quanto as relações entre os fitovírus e os seus insetos-vetores, e entre as técnicas das

quais se lançou mão para entender este patossistema encontra-se o EPG. Os vírus não-persistentes são transmitidos exclusivamente por afídeos, sugerindo que existe uma (ou mais) associação importante que diferenciam este grupo dos demais insetos-vetores, sendo esta possivelmente de origem morfológica, fisiológica ou comportamental.

Diversos experimentos foram realizados empregando-se o EPG com a finalidade de se obter um padrão no processo de alimentação visando auxiliar a compreensão do processo de transmissão de vírus não-circulativos. As fases foram divididas e caracterizadas em 7 principais e apresentam diferentes valores de amplitude, frequência e voltagem, sendo estes sinais relacionados com o tecido da planta envolvido e a atividade desenvolvida pelo afídeo (Figura 2 e Tabela 2). Esta técnica é utilizada atualmente na Espanha para estudos envolvendo a transmissão de diversos isolados de PVY que atacam pimenta e a sua epidemiologia (Fereres et al., 1993).

Em trabalho mais recente outro aspecto abordado foi a relação entre o mecanismo de ingestão e salivação e o processo de aquisição e inoculação envolvido na transmissão do tipo não-persistente (Martín, 1997). Os autores comprovaram que das atuais hipóteses: a primeira formulada por Kennedy et al. (1962) que sugere a agregação das partículas na extremidade dos estiletes, ou então na região interna da porção distal das peças bucais a aproximadamente 20 $\mu$ m do canal alimentar maxilar, ou seja, atuam como "agulhas voadoras". A segunda atualmente mais aceita sugere que os afídeos atuam como "seringas voadoras" contribuindo assim, mais ativamente no processo de transmissão.

Os pulgões atuam adquirindo os vírions ingerindo o conteúdo celular das células infectadas no processo de escolha da sua alimentação e inoculariam as partículas de vírus no processo de regurgitação na planta hospedeira sadia (Gamez & Watson, 1964; Harris, 1977). Os resultados deste trabalho empregando-se a EPG demonstraram que ocorrem diferentes padrões, e que para os vírus testados (PVY e CMV), que são transmitidos de forma não-persistente, a aquisição ocorre durante a sub-fase II-3, durante as picadas estiletares intracelulares, e a inoculação se dá durante os primeiros momentos da fase sub-fase II-1, sugerindo que se trata de um processo que envolve um mecanismo de ingestão e egestão.

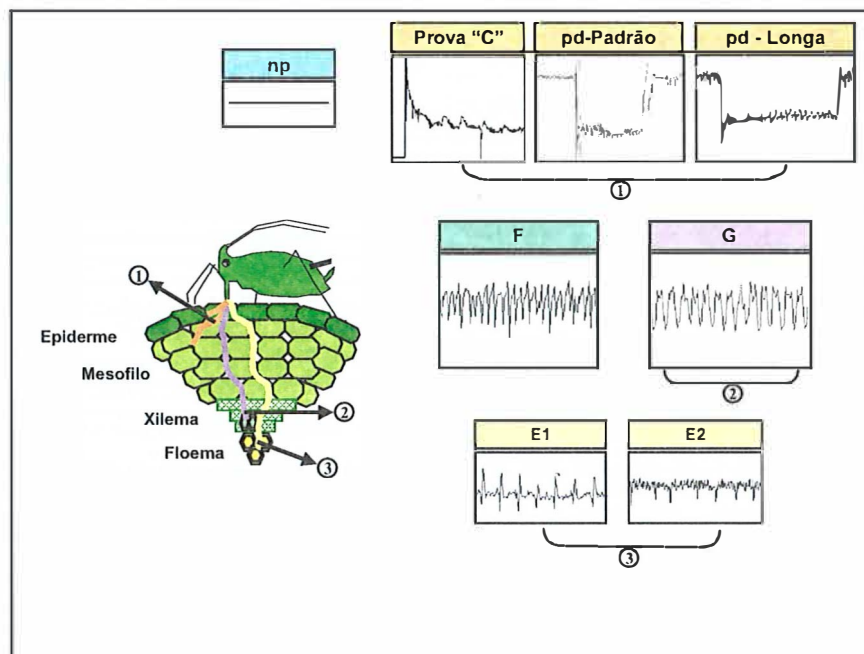


Figura 2 - Principais tipos de onda envolvidos no comportamento alimentar de afídeos (Adaptado de Garzo, 2002)

**Tabela 2 - Tipos de onda e correlações para análise de EPG (Adaptado de Prado, 1997 e Garzo, 2002)**

<b>Tipo de onda</b>	<b>Sub-fases</b>	<b>Tecido vegetal envolvido</b>	<b>Atividade do afídeo</b>	<b>Frequência</b>
<b>A</b>	-	<b>Epiderme</b>	<b>Contato do estilete com a epiderme</b>	<b>5-10 Hz</b>
		<b>Epiderme e mesofilo</b>	<b>Transição para ondas do tipo C. Associada com a formação da saliva gelificante</b>	<b>0,2-0,3 Hz</b>
<b>B</b>	-	<b>Todos os tecidos (epiderme e floema)</b>	<b>Atividades durante a inserção intracelular do estilete.</b>	<b>0,2 – 0,3 Hz</b>
			<b>Provavelmente em busca dos tecidos vasculares</b>	
<b>C</b>	-		<b>Penetração de estiletes maxilares no interior de uma célula</b>	<b>0,02 Hz</b>
	-		<b>Perfuração da parede celular pelos estiletes</b>	<b>Queda brusca de potencial</b>
<b>pd</b>	<b>II-1</b>	<b>Todas as células vivas</b>	<b>Egestão (inoculação de vírus não persistentes)</b>	<b>Potencial negativo</b>
	<b>II-2</b>		<b>Não definido</b>	<b>Potencial negativo</b>
	<b>II-3</b>		<b>Ingestão (aquisição de vírus não persistentes)</b>	<b>Potencial negativo</b>
	<b>III</b>		<b>Retirada dos estiletes do citoplasma celular</b>	<b>Rápida subida de potencial</b>
<b>E</b>	-	-	<b>Ação da bomba salivar</b>	<b>-</b>
	<b>E1</b>	<b>Extracelular</b>	<b>Salivação no floema e inoculação de vírus persistentes</b>	<b>2-4 Hz</b>
	<b>E2</b>	<b>Elementos de vaso</b>	<b>Ingestão floemática e salivação (aquosa) e aquisição de vírus persistentes</b>	<b>2-4 Hz</b>
<b>F</b>	-	<b>Todos os tecidos</b>	<b>Trabalho mecânico do estilete</b>	<b>11-18 Hz</b>
<b>G</b>	-	<b>Xilema</b>	<b>Ingestão ativa</b>	<b>4-6 Hz</b>



### 2.6.1 Breve descrição do aparelho de EPG

O aparelho consiste dos seguintes dispositivos:

- *um amplificador tipo DC (GIGA-2)*, desenhado por W.F. Tjallingii, Wagenigen Agricultural University, The Netherlands, que possui 4 canais de recepção de ondas elétricas (medida de queda de potencial elétrico), ligados a;
- *4 terminais/conectores* onde se conectam aos afídeos (formando assim, a primeira parte de um “circuito elétrico”);
- *4 eletrôdos* que fornecem o potencial variável (Vs) à planta,
- *Um adaptador de corrente contínua de 12 V*, alimentando o amplificador. Este possui uma resistência interna de 1 Giga-Ohm e uma intensidade de corrente contínua desprezível (<1pA),
- *Um cartão de conversão de dados analógico/digital para a aquisição de dados - ACM-12-8* (Strawberry Tree, Sunnyvale, CA, USA). As ondas geradas pelo amplificador são armazenadas através do;
- *Software A=cm<sup>2</sup> acquisition v 1.0* (cedido por G. Febvay, INSA, Lyon, France) em um Computador Machintosh da série Power Book ou PC 486 e,
- analisados com a ajuda do *aplicativo Macstylet v2.0β4* (Febvay et al., 1996), com os dados armazenados em seu disco duro e/ou transferidos a discos através de um *Zip Drive lomega 100*, para posterior análise.
- *Uma gaiola de Faraday* para redução de ruídos de fundo nos registros.

### 2.6.2 Mecanismos de resistência de batata e outras solanáceas a insetos e sua interferência com o processo de transmissão de fitovírus

Devido ao emprego excessivo do controle químico visando o controle de insetos vetores de vírus em hortaliças - principalmente pela forma de plantio em monocultura e aliado a necessidade das hortaliças serem cultivadas durante todo o ano permitindo assim a perpetuação de pragas e doenças - um dos métodos que merece destaque é o emprego de variedades resistentes, sejam estas visando o controle do inseto vetor ou do vírus. Trata-se de uma forma de controle preventiva e que pode ser incluída em programas de manejo integrado de pragas.

Entre os principais mecanismos de resistência de plantas a insetos encontram-se os fatores morfológicos e/ou químicos (Lara, 1944). Estas barreiras físicas podem se localizar na epiderme, tais como a presença de tricomas nas folhas e/ou no caule resultando em uma maior dificuldade na alimentação do inseto ou simplesmente a não alimentação podendo levar o inseto a morte. Alguns dos trabalhos pioneiros desenvolvidos para a cultura da batata (Gibson, 1971; La Pointe & Tingey, 1984) descrevem a resistência física provocada por pelos glandulares em algumas espécies de Solanaceae, como as espécies selvagens de batata: *Solanum polyadenium*, *S. tarijense* e *S. berthaultii* (Figura 3). Estes se encontram em grande quantidade na superfície axial das folhas maduras nas espécies selvagens e em número reduzido nas variedades comerciais. Quando ocorria a ruptura das paredes celulares dos tricomas liberava-se um exudado - inicialmente

um líquido claro – que, após algum tempo, se tornava viscoso e insolúvel paralisando os afídeos que entravam em contato. Alguns experimentos realizados mostraram que cerca de 30% da infestação por afídeos era paralisada após 24 horas, confirmando o potencial de resistência que podia ser incorporado nas plantas comerciais. Paralelamente a este trabalho Gibson & Pickett (1983) constataram que *Myzus persicae* era repellido quando colocado em contato a uma distância de 1 a 3mm com a variedade *S. berthaultii* devido a presença de um alomônio semelhante ao feromônio de alarme  $\epsilon$ - $\beta$  farnesene, a importância desta substância na seleção é justificada pelo fato de que este feromônio foi encontrado como componente da planta (*S. berthaultii*) fato que se observou também em cevada (*Humulus lupulus*) e também em algumas variedades de batata comercial (*S. tuberosum*), conseguindo assim alterar o comportamento na seleção da hospedeira (Herrbach, 1992; Pickett et al., 1992). Os autores afirmaram que o feromônio é proveniente dos pelos glandulares presentes na folhagem das plantas e ressaltaram a importância da introdução deste fator de resistência em variedades comerciais.



Figura 3 – Tricomas glandulares presentes em plantas de *Solanum berthaultii*. a) tricoma tetraglobular; b) tricoma glandular e, c) afídeo preso em tricomas glandulares com material glandular no tarso (Gibson, 1971)

Para a cultura de batata alguns trabalhos foram desenvolvidos avaliando a resistência genética de 57 progênies tubelíferas de *Solanum* spp. a *M. persicae* onde também foram incluídos híbridos intra e interespecíficos. Obteve-se uma boa segregação resultando em clones altamente resistentes com uma heredabilidade estimada de 50-60% em populações diplóides e tetraplóides (Sanford & Sleesman, 1970).

Outros fatores de resistência descritos são posteriores à epiderme e se encontram no floema onde os afídeos se deparam com uma barreira física ao inserir o estilete e verificar uma obstrução nos vasos crivados resultantes do tamponamento produzido pela calose ou pelas proteínas P, principalmente em cucurbitáceas (Garzo, 2002) impedindo a ingestão de seiva do floema (Shinoda, 1993; Cohen et al., 1990; Klingler et al., 1998).

Diversos grupos de metabólitos secundários ou aleloquímicos, tais como: alcalóides, ácidos fenólicos, glucosinolatos e ácidos hidroxâmicos são bastante conhecidos como mediadores na resposta do comportamento alimentar dos pulgões (Dreyer & Campbell 1987; Figueroa et al., 1999; Gabrys et al., 1997; Gianoli & Niemeyer, 1997; Hopkins et al., 1998) sendo que alguns atuam como deterrentes, fagoestimulantes ou causam um efeito antibiótico (Montllor, 1991; Pollard, 1973; Schoonhoven & Derksen-Koppers, 1976). Já os compostos fenólicos, normalmente se encontram nas células da parede e a sua influência no comportamento alimentar de afídeos é desconhecida (Montllor, 1991; Rahbé et al., 2000).

Entre as principais substâncias de defesa pós-ingestiva para o gênero *Solanum* se destacam os glicoalcalóides que

afetam a biologia e o comportamento de inúmeras espécies de insetos (Kogan, 1986). A ação de algumas destas substâncias foi avaliada por Jane et al. (1982) em 8 cultivares de *S. tuberosum*. O estudo se realizou avaliando reprodução e desenvolvimento (antibiose) do pulgão *M. persicae*, sob condições controladas em diferentes variedades. Os resultados mostraram que as cultivares Ulster Tarn, Record e Maris Piper são relativamente resistentes ao pulgão reduzindo a produção de ninfas e o peso dos insetos adultos. Em contrapartida, ocorreram o aumento dos parâmetros: tempo de maturação e complementação dos estádios embrionários. Não houve diferença significativa quando se comparou o efeito de antibiose dos cultivares em dois clones de *M. persicae*. No entanto, sabe-se que este tipo de resistência é dificilmente utilizada em programas de melhoramento, visto que se trata de uma característica poligênica dificilmente transferida para as gerações subseqüentes (Tinguey, 1984).

Os mecanismos de resistência induzida contra a herbivoria foram definidos por Kogan & Paxton (1983) como sendo o aumento qualitativo e/ou quantitativo dos mecanismos de defesa da planta em resposta a estímulos externos que podem ser físicos e/ou químicos. Este fato foi corroborado em ensaios realizados por Kogan (1986) onde se verificou o aumento na síntese e o acúmulo de dois inibidores de proteinases nas células de folhas de *S. tuberosum* quando estas sofrem algum tipo de injúria mecânica. Este processo se demonstrou proporcional ao número de injúrias, ou seja, o acúmulo de inibidores se dará duas a três vezes se a planta for danificada novamente no período de algumas horas. Posteriormente Kloepper et al. (1992) definiram este tipo de

resistência como sendo um processo que é ativado, dependendo das barreiras físicas e químicas da planta, pela atuação de agentes bióticos e abióticos.

Alguns estudos revelaram a preferência alimentar de afídeos, outros insetos fitófagos e ácaros por plantas infectadas por vírus (Kennedy, 1951; White, 1984), possivelmente porque estes patógenos, em alguns casos, induzem uma melhoria na qualidade da folha como alimento, beneficiando dessa forma o patógeno e o inseto vetor que ocorrem as plantas hospedeiras (Edwards & Wratten, 1981).

De acordo com White (1984), a preferência alimentar de alguns artrópodos por plantas infectadas poderia ser devida a um aumento na disponibilidade de nitrogênio solúvel, graças quebra de proteínas em aminoácidos e subsequente aumento no fluxo dessas substâncias pela translocação, via floema, para os locais de armazenamento ou de crescimento da planta. Outro exemplo que pode ser citado é a preferência - tanto por alimentação como para colonização - de *Aphis fabae* e *M. persicae* por folhas de beterraba (*Beta vulgaris*) com formação de galhas, além de folhas infectadas por vírus (Kennedy, 1951). Castle et al. (1998) comparou o comportamento alimentar de adultos ápteos de *M. persicae* em arenas onde dispunha folíolos de plantas infectadas de *S. tuberosum*, *Physalis floridana* e *Datura stramonium* com os vírus (PLRV, PVY, PVX) e folhas sadias das mesmas plantas, neste experimento se observou diferença quanto ao assentamento de afídeos em folhas de batata infectadas com o PLRV quando comparados com os demais vírus em questão e em folhas livres de vírus. Contudo, não foi detectada nenhuma diferença significativa quando as plantas hospedeiras eram *D. stramonium* e *P.*

*floridana*, corroborando um melhor desenvolvimento e desempenho quando o trinômio era *M. persicae*, PLRV e folhas de batata, reforçando a idéia de que nesta interação deva ocorrer um tipo de relação positiva entre os organismos estudados.

## 2.7 Mecanismos de resistência de batata aos seus principais fitovírus

Hull (2002) afirma que não existem tratamentos curativos para os fitovírus sendo assim, os métodos de luta e controle somente nos permitem minimizar o risco de infecções e diminuir as perdas. As tentativas de controle de vírus com característica de transmissão não persistente, como é o caso do PVY, se vem muito limitadas graças a rapidez de transmissão e a baixa especificidade na relação inseto-planta, sendo necessário recorrer a outras estratégias de controle.

Neste contexto, o emprego de cultivares resistentes se oferece como uma forma simples e barata para limitar o impacto produzido pelos vírus transmitidos por pulgões, por outro lado, é um processo muito longo e demorado visto o sistema de melhora convencional. Os primeiros trabalhos que visavam o emprego desta técnica foram realizados com feijoeiro e o vírus do mosaico do feijoeiro “(Bean Common Mosaic *Potyvirus* – BCMV) (Pierce, 1935).

Inúmeros cultivares de batata apresentam diferentes níveis de resistência ao PVY (Santos et al., 1986) variando de acordo com alguns fatores como: pressão de inóculo e do inseto vetor, além das condições climatológicas e idade e genótipo da planta (Basky 2002; Robert et al., 2000). No Brasil

desenvolvem-se trabalhos de controle genético para as mais importantes viroses na cultura de batata, todavia, dependendo do vírus em questão torna-se uma tarefa difícil devido ao controle desta herança possuir um caráter poligênico, como no caso do PLRV. Isto não se repete com os vírus PVY, PVX e o PVS que são controlados por genes simples e a introdução destes em cultivares melhorados é uma tarefa menos complicada (Pinto, 2003). No mecanismo de resistência da planta a fitovírus detectaram-se alguns princípios na carga genética de diferentes hortaliças para o PVY, inclusive, nas culturas de batata, tomate e pimentão (Lecoq & Pitrat, 1999). Em batata Milhovilovich *et al.* (1998) consideram como a melhor estratégia para controlar ou minimizar as perdas causadas pelo PVY o emprego de genes de resistência duráveis e, os agruparam em duas classes: hipersensibilidade e extrema resistência, consistindo na expressão de respostas necróticas a infecção viral (genes N) e na ausência ou no pequeno acúmulo de vírus na planta (genes R), respectivamente. Sabe-se que os genes de resistência que possuem maior durabilidade são os Ry, visto que atuam contra uma grande gama de *strains* (isolados) de PVY e, os genes Ny se limitam a alguns *strains* específicos. Para a batata são conhecidos dois genes de resistência para o PVY provenientes de duas espécies nativas: *S. tuberosum* subsp. *andigena* (Ry<sub>adg</sub>) e *S. stoloniferum* (Ry<sub>sto</sub>). Segundo Braun *et al.*, (1991) uma das estratégias mais utilizadas na obtenção de plantas transgênicas resistentes a vírus é a expressão do gene da capa protéica com sucesso para mais de 20 fitovírus, sendo esta técnica empregada no Brasil para a cultivar 'Achat' (Torres, 2003).



## 2.8 Epidemiologia e controle dos principais vetores de vírus na cultura de batata

Segundo Carter & Harrington (1991) os afídeos (Homoptera; Sthernorryncha) são considerados como os principais insetos-praga das áreas agrícolas que se localizam na zona temperada graças à possibilidade destes se reproduzirem por partenogênese e provocarem danos diretos e indiretos. Os danos diretos se correlacionam com a densidade populacional e os indiretos dizem respeito à transmissão de vírus com caráter não persistente e persistente (Harrewjin, 1989). Entre os inúmeros fatores envolvidos na dispersão dos fitovírus merecem destaque à dinâmica populacional, o potencial vetorial e os vírus envolvidos para desta maneira se poderem traçar algumas medidas de controle para a cultura em questão (Irwin & Ruesink, 1986) (Figura 4).

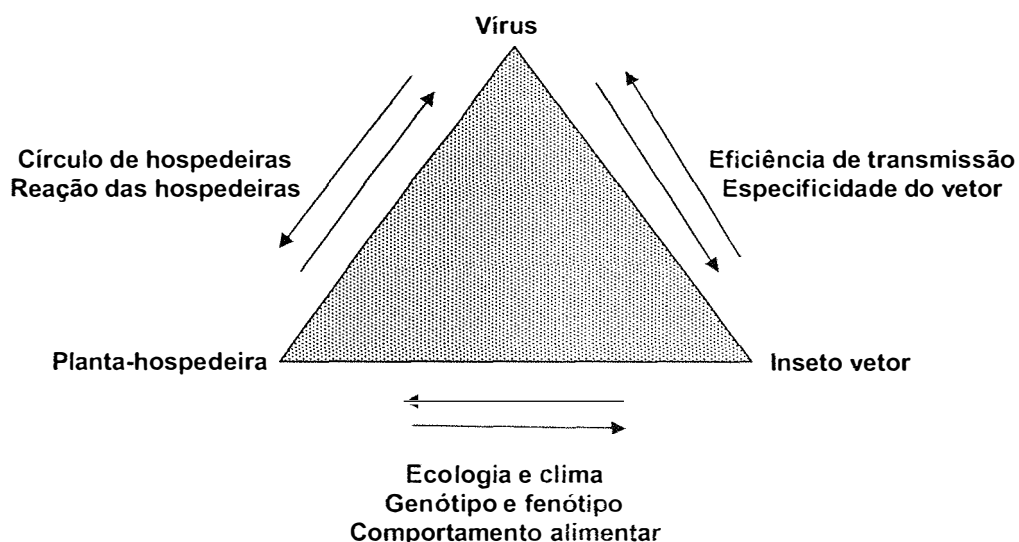


Figura 4- Principais organismos e fatores inter-relacionados durante o processo de disseminação de vírus (adaptado de Matthews, 1991)

Em comparação com os estudos realizados visando à interação entre fitovírus e plantas hospedeiras os trabalhos desenvolvidos com a relação vírus e inseto vetor são menores, porém, despertando uma pequena atenção. Isto se deve ao fato de se tratar de um assunto complexo envolvendo um grande número de respostas comportamentais que englobam diversos estímulos e eventos. Dentro dos modelos de simulação as relações individuais são uma das metodologias empregadas para prever a dinâmica do sistema.

Estes modelos dependem da avaliação de diferentes variáveis que incluem: o número de espécies vetoras presentes, quantas destas espécies “carregam” o vírus e quantas plantas na cultura estão realmente infectadas e quantas não.

Para realizar a quantificação da intensidade (índice) vetorial Irwin & Ruesink (1986) definiram alguns termos envolvidos no processo de transmissão.

✓ *Propensão vetorial*: é a probabilidade que um simples vetor, tenha a oportunidade de adquirir o vírus em uma planta infectada subseqüentemente transmitindo o vírus, para um novo campo e/ou planta hospedeira. Em outras palavras, probabilidade natural de que um vetor transmita um vírus a uma planta.

✓ *Competência vetorial*: é a capacidade inata para o ato do inseto vetor. Esta não leva em consideração as imposições do meio ambiente, podendo ser repetida em laboratório.

✓ *Eficiência vetorial*: define a probabilidade para obter uma infecção, desde que se use o vírus (certo) em

determinadas condições (favoráveis). Este valor se avalia em condições controladas sob manipulação experimental.

✓ *Atividade vetorial*: trata-se de um valor difícil de ser mensurado, geralmente os pesquisadores quantificam a abundância dos possíveis vetores (nº de indivíduos/área) sendo assim, neste caso abundância se torna sinônimo de densidade, ou seja, se trata do número de pulgões que pode aterrissar em uma planta sadia, independente da sua espécie.

### 2.8.1 Vírus envolvidos

Na Europa os progressos obtidos frente à epidemiologia causada por doenças de etiologia viral transmitidas por afídeos correspondem a um esforço de 30 anos (Robert et al., 2000), sabe-se hoje que as principais viroses envolvidas na quebra de produção da cultura de batata são: PLRV, PVY, PVM, PVA e o PVS. Deve-se levar em consideração que as características de transmissão destes diferem e envolvem o tipo circulativo propagativo (PLRV) e não-persistente (vírus Y, M, A e S da batata). Este processo é influenciado por inúmeros fatores meio ambientais, principalmente a *temperatura*, que altera o comportamento dos pulgões durante a aquisição e a inoculação além de interferir junto às plantas-fonte e as novas hospedeiras, influenciando assim a perpetuação do fitovírus.

A partir de 1960 alguns produtores europeus de batata-mente propuseram uma série de medidas de controle baseadas em práticas culturais procurando minimizar as doenças no campo. Estes modelos empregavam armadilhas para monitorar os afídeos-vetores e foram desenvolvidos para

melhorar a sincronia dos métodos de controle. Porém algumas considerações devem ser feitas quando se define o tipo de infecção estudado, pois é comum que algumas plantas infectadas no plantio ou brotação de culturas ou safras anteriores emirjam apresentando sintomas de uma “infecção secundária” permanecendo no inverno ou na entressafra graças a tubérculos infectados originando “plantas voluntárias” que se constituem em focos de infecção.

Este nível inicial de infecção representa um papel fundamental para a dispersão de vírus transmitidos por afídeos, visto que indivíduos não virulíferos adquirem o patógeno nestas fontes e o transmitem a plantas mais distantes. Este processo equivale a um processo de dispersão secundária em outros patosistemas.

## 2.8.2 Afídeos como vetores de vírus

### 2.8.2.1 Espécies de afídeos e intensidade vetorial

As principais espécies de pulgões, também denominadas por Robert et al. (2000) de “residentes” pelo fato de serem as mais comuns nas áreas de produção de batata, na Europa, são: *Myzus persicae*, *Aulocorthum solani*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Rophalosiphum latysphon*, *Aphis nasturtii* (= *rhamni*) e *A. frangulae*, estas transmitem os vírus de batata com eficiência variável.

Em condições de laboratório a espécie *M. persicae* é a que possui maior eficiência para estes vírus e seus isolados, levando em consideração algumas variações determinadas pelos “clones” empregados. No entanto, se observava alguma

discrepância quanto aos resultados obtidos em condições controladas quando comparados com os dados de campo, pois estes últimos sugeriam que os alados seriam os vetores mais eficientes. Posteriormente este fato foi explicado graças ao conceito de *intensidade vetorial* (Irwin & Ruesink, 1986).

#### 2.8.2.2 O papel das espécies de afídeos “migratórios” na disseminação de vírus não-persistentes

Broadbent (1948) sugeriu que indivíduos alados de espécies de afídeos não colonizantes, posteriormente denominadas “transitórias” ou “itinerantes”, possuem potencial como vetores do PVY devido às breves picadas de prova que realizam em batata. Diversos autores (Harrington & Gibson, 1989; de Bokx & Pirone, 1990) citam que a *eficiência vetorial* dos vetores de PVY é baixa fato explicado pelas variações na metodologia, local, biótipos de afídeos, isolados de vírus, países e anos, isto dificultando a determinação da *intensidade vetorial* para uma espécie em particular e para definir o risco em diferentes áreas. O comportamento de vôo dos afídeos migratórios é uma questão que diz respeito ao local de origem da colônia e da distância das fontes de vírus, por definição estes insetos podem reter vírus não-persistentes por curtos períodos de tempo e seriam incapazes de infectar novas hospedeiras depois de vôos longos devido à perda natural do vírus ou degeneração do patógeno.

### 2.8.2.3 Tipos de dinâmica de populações de afídeos

Normalmente, em países de clima temperado, as culturas são colonizadas pelo fluxo de afídeos alados durante a primavera em um vôo denominado de “imigração” ou “contaminação”, usualmente na época de emergência das plantas. Estas populações permanecem nas plantas e originam formas aladas que se dispersam no verão (“vôos de disseminação”)(Robert et al., 2000). Segundo Robert & Rouzé-Jouan (1978) há dois tipos de desenvolvimento da população, sendo o tipo I caracterizado por baixos vôos de infestação no início, isto resultando em grandes populações de indivíduos ápteros que por sua vez originam um grande número de formas aladas, ocorrendo assim uma ampla disseminação. No tipo II a abundante infestação anterior e seguida, normalmente, por um desenvolvimento moderado da população nas plantas, resultando então em pequenos vôos de disseminação ou em alguns casos, nenhum.

A temperatura, como citado anteriormente, desempenha um papel importante sobre as populações condicionando inclusive o tamanho destas. No Brasil, Bertels et al. (1971) verificou que fatores climáticos e de alimentação influenciaram a dinâmica populacional, em que as chuvas, a temperatura e alimentação insuficiente condicionaram à migração dos afídeos. Em trabalho posterior (Lourenço & Pinto, 1988) afirmam que a densidade populacional dos pulgões é afetada pela pluviosidade, pois quando esta diminui ocorre um incremento da população. Na cultura de batata Furiatti & Almeida (1993) encontraram uma relação significativa entre o número de *M. persicae* e outros pulgões não identificados

capturados em armadilhas e a temperatura nos dias de coleta, principalmente na faixa de 18 a 20°C e de maneira escassa em temperaturas inferiores a 12°C.

### 2.8.3 O papel das plantas na epidemiologia de vírus em batata

Diversos fatores inerentes à planta se destacam quando se aborda a epidemiologia de vírus de plantas e entre eles merecem destaque à *época de inoculação* e *as plantas fonte ou reservatórios* para vírus e afídeos. Beemster (1987) mostrou em estudos o que ele denominou de MPR – “*mature plant resistance*” (“resistência da planta madura”), trata-se de um processo no qual as plantas mais velhas, no momento em que são inoculadas, translocam o vírus em menores níveis para regiões inferiores, ou seja, os tubérculos. Isto reforça o motivo do porque o PRLV tem a sua maior dispersão para as culturas que são colonizadas logo após a emergência das plântulas. Robert et al. (2000) cita em alguns dos seus trabalhos relacionados que ocorre uma translocação mais rápida do PVY<sup>N</sup> quando comprado com o PVY<sup>o</sup> e o PLRV, além disto às plantas desenvolvem mais lentamente o MPR. Quando a infecção primária - propriamente dita - ocorre no início do plantio estas plantas podem servir como fontes de vírus para uma dispersão a locais mais distantes, visto que passam despercebidas para um eventual desbaste ou controle manual do agricultor.

Após duas semanas a espécie *M. persicae* pode adquirir o PVY<sup>N</sup> em folhas sem sintomas aparentes de batata cv. Bintje sempre quando estas plantas tenham sido inoculadas de duas a quatro semanas antes do plantio, no entanto após quatro semanas da inoculação os valores de aquisição diminuem. Uma

recomendação oriunda deste trabalho é a realização de desbaste, nas áreas de produção de sementes, após 12 dias do início dos vôos de disseminação dos afídeos.

A distribuição e a abundância das plantas hospedeiras são fatores importantes para os afídeos que colonizam batata e para os vírus disseminados por estes insetos. De acordo com Walkey (1985) para formular as medidas para controlar a disseminação de vírus é de suma importância identificar os focos iniciais da infecção. Tresh (1981) dividiu em três tipos principais os focos de infecção para disseminação, estes seriam: a) a dispersão ocorre a partir de plantas de dentro da cultura; b) a partir de plantas adjacentes à cultura e, c) a partir de áreas remotas ou longe da cultura. Nos dois primeiros casos podem estar envolvidos vírus de caráter persistente ou não-persistente - como o PVY - e este último caso é usual para vírus persistentes - como o PLRV - devido a distância e a inerente perda ou degeneração do patógeno.

O tamanho e a distância da dispersão a partir do foco da infecção é denominado *gradiente* de infecção. Um exemplo disto é a diminuição do número de plantas infectadas quando se distancia do foco da infecção. O incremento ou decréscimo do gradiente de infecção esta diretamente relacionado com o grupo de vetor e o tipo de transmissão do vírus em questão, além do movimento e a abundância do inseto vetor. Gradientes reduzidos envolvem dispersão entre distâncias consideráveis, resultado de uma alta mobilidade do vetor, por outro lado, à dispersão a partir de gradientes elevados envolvem a dispersão para curtas distâncias, ou através de um vetor com pouca mobilidade ou mesmo a transmissão por outros meios, como



através de contato das raízes ou mesmo das folhas das plantas (infectadas/sadias).

## 2.9 Exemplos de modelos

Um exemplo de modelo criado, graças ao estudo destas variáveis supra citadas, para definir a capacidade real de transmissão do vírus Y da batata – estirpe PVY<sup>o</sup> - foi desenvolvido por Fereres et al. (1993) na cultura de pimentão e se determinou graças a experimentos em laboratório, casa-de-vegetação e ao ar livre. Este possibilitou verificar a relação existente entre a perda da cultura causada pela infecção por PVY e CMV em 5 momentos críticos da cultura em campo. Os resultados geraram uma aplicação informática (software) para ser utilizada em simulações de campo. Este modelo (SIDIPVY) (Fereres & Ponz, 2002) proporciona inúmeras informações ao agricultor auxiliando-o na sua tomada de decisão para o controle de afídeos-vetores e assim a redução da infecção e perdas.

Para a cultura de batata alguns programas de manejo integrado para o controle de pulgões foram analisados por Harrewijn (1989). O autor define como um bom modelo àquele que monitora o desenvolvimento das populações de afídeos e avalia antecipadamente o benefício das medidas de controle a serem empregadas durante a época de desenvolvimento da cultura. Whalon & Smilowitz (1979) desenvolveram um modelo baseado na temperatura para populações de campo de *Myzus persicae*, estes destacaram que as condições climáticas da região (Pensilvânia) eram muito diferentes que as existentes em toda a Europa Ocidental, observação que deve ser

estendido a todas as regiões de clima tropical inclusive o Brasil. Em um curto espaço de tempo, com condições favoráveis, cerca de três dias, a população dobra de tamanho e em poucos dias a linha de dano econômico é ultrapassada. Os autores afirmam que para a cultura de batata faz-se necessário uma avaliação destes valores em diferentes estádios de desenvolvimento das plântulas.

De acordo com Janson & Smilowitz (1986) o desenvolvimento das populações de *M. persicae* na cultura de batata é determinado pela grande quantidade de fertilizantes nitrogenados que são aplicados graças aos tratos culturais necessários. De acordo com White (1984), a preferência alimentar de alguns artrópodos por plantas infectadas poderia ser devida a um aumento na disponibilidade de nitrogênio solúvel, pela quebra de proteínas em aminoácidos e subsequente aumento no fluxo dessas substâncias pela translocação, via floema, para os locais de armazenamento ou de crescimento da planta. Em trabalho desenvolvido por Schepers et al. (1981) citado por Harrewijn (1986) os autores compararam o desenvolvimento das populações de *M. persicae* e *M. euphorbiae* em *S. tuberosum* cv. Bintje sob diferentes condições de adubação e quando utilizaram óleo mineral (medida utilizada para o controle de vírus não-persistentes em batata-semente) o resultado evidenciou que a espécie *M. euphorbiae* sofreu uma inibição parcial no desenvolvimento. Isto foi corroborado em ensaios empregando dietas artificiais que revelaram diferentes necessidades nutricionais para as duas espécies. Algumas aminos semelhantes a aspargina são necessárias para a reprodução e estas são inibidas por aminoácidos “negativos” semelhantes a prolina, sendo estas

duas substâncias influenciadas ao nível do floema pela adubação feita com nitrogênio e potássio.

## 2.10 Emprego de métodos físicos de controle

O manejo de pragas agrícolas empregando métodos físicos de controle fez-se notar graças ao aparecimento de problemas relacionados ao uso abrangente de inseticidas sintéticos tornando-se evidente a necessidade do emprego de outros métodos (Vincent et al., 2003).

Muitas vezes o controle químico pode ser eficaz contra a propagação de vírus transmitidos de forma *circulativa*, devido aos longos períodos de alimentação necessários para a aquisição e para inoculação, no entanto, este tipo de controle se torna impossível em sistemas que envolvem a transmissão do tipo *não-persistente*, onde o período de transmissão é muito curto e os inseticidas dificilmente conseguem atuar.

Salas (2001) enumerou algumas medidas preventivas de controle de insetos vetores de fitovírus empregadas:

*Uso de semioquímicos e repelentes:* Muitas espécies de afídeos produzem um tipo de feromônio de alarme - (E) $\beta$ -farnesene que é liberado quando os pulgões são atacados. A idéia é utilizar derivados do feromônio, reduzindo a sua aterrissagem em plantas sadias evitando uma possível transmissão.

*Emprego de barreiras ópticas:* recentemente se descobriu que os cultivos de hortaliças, quando produzidos em casas-de-vegetação do tipo túnel e cobertos com *polietileno*, material que absorve os raios ultravioletas, reduziram sensivelmente o ataque de diversas pragas e a infecção por

vírus, quando comparadas com as casas-de-vegetação cobertas com plástico normal (Costa et al., 2002).

*Superfícies refletoras:* os afídeos e as "moscas"-brancas são atraídos por algumas cores e repelidos por outras. Baseado neste princípio, alguns pesquisadores desenvolveram trabalhos mediante o emprego de superfícies repelentes e com pulverizações de materiais refletores. Estes obtiveram sucesso no controle dos pulgões quando se empregaram telas brancas com 2-8 mesh.

*Armadilhas amarelas:* O emprego de armadilhas amarelas com óleo ou polietileno adesivo é amplamente empregado no controle de insetos vetores obtendo-se um maior sucesso no caso das "moscas"-brancas. Este tipo de armadilha pode ser empregado como indicador do momento de pulverização na cultura, auxiliando assim na tomada de decisão para efetuar o controle (Cohen & Marco, 1973).

*Cultura armadilha ou planta-isca:* as grandes monoculturas sempre proporcionam um ambiente propício para a transmissão de fitovírus, inclusive entre propriedades vizinhas. O plantio de culturas hospedeiras suscetíveis entre estas propriedades pode reduzir de forma significativa a proporção de vírus propagados no campo.

*Isolamento das plantas:* a proteção da planta contra os insetos, através de métodos culturais empregando técnicas agrícolas apropriadas, tais como o *isolamento das culturas* em regiões de baixa incidência de vetores, isto provocado por condições ambientais, ou por cultivo em casa-de-vegetação, telados, ou plasticultura, impedindo a entrada destes agentes. Outro método empregado é a proteção através de *barreiras com plantas*, geralmente espécies botânicas não preferidas pelos

insetos e que possuam altura suficiente. São recomendadas para esta função milho e crotalária, entre outras.

O controle físico de insetos-praga pode ser dividido em passivo, ativo e misto. Entre os métodos passivos um dos que vem merecendo destaque pela ampla utilização dos agricultores europeus são as barreiras físicas, estas, são definidas como material vivo ou não para restringir movimentos ou delimitar um espaço (Vincent et al., 2003). Esta metodologia é compatível com outros métodos de controle muitas vezes com o material podendo ser reutilizado e com um baixo custo de implantação. Alguns exemplos de métodos passivos que são empregados com sucesso, pois são facilmente consorciados com métodos tradicionais de proteção, visto que não interferem entre si são: a) sulcos - para evitar o ataque de insetos caminhadores; b) cercas - auxiliam no controle de insetos que realizam vôos baixos; c) coberturas orgânicas – ajudam na manutenção de inimigos naturais e na proteção das plantas; d) filmes de partículas – coberturas inertes para a planta (Kaolin); e) armadilhas – interceptação de insetos migradores e monitoramento; f) óleos – óleos minerais podem ser combinados sem problemas com inseticidas sintéticos para o controle de dípteros em árvores frutíferas; g) sabões e surfactantes – atuam direta ou indiretamente sobre o corpo frágil dos insetos e h) coberturas derivadas de materiais artificiais.

Este último exemplo originou uma metodologia de controle utilizada em diversos países do mundo denominada de coberturas flutuantes (agrotêxtil, floating rowcovers, cubiertas agrotexiles, cubiertas flotantes) o eventual sucesso se deve a iminente redução de aplicações de produtos fitossanitários,

impostas por diversas e rígidas, exigências comunitárias visando à proteção do meio ambiente e preservação do espaço natural (Fererres, 1993). Em alguns países europeus se buscava um método para minimizar os danos provocados pelas geadas e entre alguns dos testados os que apresentaram uma boa aceitação foi o material denominado TNT ou *tecido não tecido* (Polipropileno ou polietileno, de filamentos contínuos soldados termicamente, permeáveis à água e ao ar, que permitem uma luminosidade de 80% e peso variável), pois além de proteger as culturas contra as baixas temperaturas das geadas, obteve algumas outras vantagens agronômicas, tais como: adiantar o desenvolvimento (cultura precoce); inibir a floração prematura; melhorar o rendimento e a qualidade; evitar o ataque de algumas pragas comuns em culturas tradicionais (mosca-minadora, besouros, lagartas, etc.) desta forma reduzindo também a incidência de insetos-vetores.

Hoje em dia a área plantada coberta do Oeste Europeu é de 25.000 ha, onde se somam 20.000 ha na França (Fererres, 1996) sendo esta metodologia também empregada, em menor escala nos Estados Unidos, Espanha, México e alguns países da América Latina inclusive o Brasil.

Os primeiros estudos envolvendo este material datam de 1985 (Natwick & Durazo) visando o controle de vírus transmitidos por mosca-branca em hortaliças. Posteriormente a técnica foi aplicada com sucesso nas culturas de melão (Perring et al., 1989), tomate (Gomez et al., 1990), cucurbitáceas (Webb & Linda, 1992); pimentão (Avilla, 1996; Fereres et al., 1994) e crucíferas e alface (Fererres et al., 2002, no prelo). No Brasil assim como na Espanha é empregado em pequena escala para a produção de batata-semente (Dr. Javier

**Legorburu – NEIKER, País Basco e Elma Chips – informações pessoais). No entanto, um grande sucesso foi obtido no controle do “amarelão do meloeiro”, doença de etiologia viral, na região produtora de Mossoró<sup>1</sup>.**

---

<sup>1</sup> Anais da Fruticultura Brasileira, 2002

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Os estudos foram desenvolvidos no Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), em Piracicaba, SP, onde efetuou-se a identificação dos insetos e preparo de materiais para coleta e análise dos dados, no Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia do Instituto Biológico (LFF/IB), em São Paulo, onde realizou-se a caracterização dos isolados de vírus coletados no campo. No Departamento de Proteção Vegetal do Centro de Ciencias Medioambientales (CCMA) do Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid/ Espanha, foram realizados realizaram os estudos envolvendo EPG, os testes de transmissão de fitovírus e os ensaios de antibiose e antixenose, sob supervisão do Dr. Alberto Fereres. O estudo de barreiras físicas para controle de vetores foi realizado em plantio de batata na região de Paranapanema.



### 3.1 Levantamento de estirpes do *Potato virus Y* (PVY)

#### 3.1.1 Coleta de material infectado

O levantamento foi realizado no período de março de 2001, em plantios comerciais de batata (semente e consumo) nos seguintes municípios produtores do sudoeste do Estado de São Paulo: Itapetininga, Capão Bonito e Paranapanema (Figura 5). Foram efetuadas amostragens em áreas indicadas pelos produtores vinculados a CACB (Cooperativa Agrícola de Capão Bonito) e à ABBA (Associação Brasileira de Produtores de Batata), colhendo-se 20 amostras (Tabela 3). As plantas coletadas apresentavam sintomas sistêmicos característicos ao PVY e suas estirpes. O material foi levado ao LFF/IB em caixa de isopor, mantido a baixa temperatura, para proceder ao seu isolamento e caracterização.

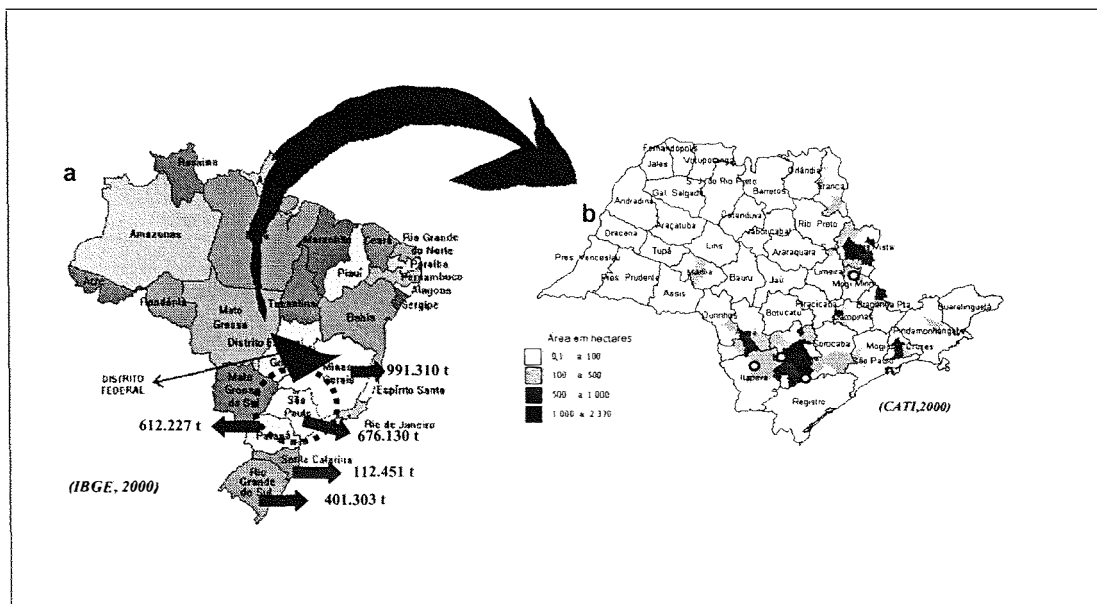


Figura 5 – a) Principais Estados brasileiros produtores de batata e produção (t) e, b) Regiões produtoras de batata e áreas de amostragem

### 3.1.2 Inoculação mecânica em plantas indicadoras

Foram inoculadas 6 espécies de 2 famílias botânicas: Chenopodiaceae (*Chenopodium murale* L.) e Solanaceae (*Nicotiana benthamiana* Domin., *N. tabacum* L. cv. White Burley, *Physalis floridana* Rydb., *Solanum lycocarpum* A.St.-Hil. e *S. nigrum* L.) que respondem com sintomas específicos para as estirpes em estudo.

O inóculo constou de extrato preparado a partir de material coletado de folhas de *S. tuberosum*, macerado em tampão fosfato 0,5M pH 7,5 ou solução de sulfito de sódio a 0,5% (Yarwood, 1952; 1969). As plantas (10 de cada espécie) foram previamente polvilhadas com o abrasivo “carburundum” e inoculadas 15 dias após o transplante.

A evolução de sintomas foi acompanhada durante 10-15 dias, realizando-se observações diárias, principalmente na folhagem das plantas. O controle constou de plantas “inoculadas” apenas com tampão ou sulfito.

Tabela 3 - Áreas amostradas e utilização final da batata produzida

Região de coleta	Variedades	Utilização	Área Plantada (ha)	Nº de amostras
Paranapanema – Fazenda Cavalinho	Mondial	Consumo	2	5
	Asterix <sup>(1)</sup>	Consumo	1	5
	Jaette Bintje	Consumo	6	6
	Agata	Consumo	6	5
	Atlantic	Indústria	2	5
Itapetininga -Estância Célia	Agata	Consumo	9	10
	Atlantic	Indústria	9	10
Capão Bonito - Fazenda CACB	Jaette Bintje	Semente	18	10
	Bintje	Indústria	18	10
	Holandesa <sup>(1)</sup>			

(1) Material não incluído no “screening” para o PVY devido à sua reduzida área atual plantada

### 3.1.3 Caracterização serológica dos isolados

As plantas indicadoras que manifestaram sintomas foram analisadas através da técnica de ELISA (*Enzimed linked immunosorbent assay*) para a determinação do subgrupo ao qual pertencia o “provável” isolado de PVY em estudo. Foi utilizado o teste de DAS-ELISA com antissoros monoclonais comerciais específicos para os subgrupos clorótico (PVY<sup>C</sup>), necrótico (PVY<sup>N</sup>) e ordinário (PVY<sup>O</sup>). O procedimento foi realizado conforme Converse & Martin (1990), com algumas alterações recomendadas pelo fabricante (*Agdia 1000 reagent*). As leituras de absorbância (405 nm) foram feitas até 45 min após a aplicação do substrato (p-nitrofenilfosfato), sendo os resultados analisados pela razão da média das leituras (duplicata) das amostras infectadas sobre a média das leituras das amostras sadias (infectadas/sadias). Foram consideradas positivas as amostras com razão maior ou igual a 2. As leituras foram realizadas em aparelho *Microplate reader 3550-UV* (Bio-Rad), determinando-se as frequências relativas das estirpes de PVY nas áreas estudadas.

### 3.1.4 Caracterização molecular dos isolados

#### 3.1.4.1 Extração de RNA

As amostras cujos isolados não puderam ser identificados por ELISA foram submetidas a ensaios de RT-PCR (Polymerase Chain Reaction – Reverse Transcriptase) com a finalidade de verificar se havia outro isolado (PVY<sup>NTN</sup>). Para a extração de RNAs totais, amostras foliares (1 g) de *N. tabacum* apresentando sintomas característicos foram submetidas a

procedimento descrito por Chomczynski & Sacchi (1987). Amostras de RNAs totais de folhas sadias de *N. tabacum* foram incluídas no procedimento para servirem como controle negativo.

#### 3.1.4.2 RT - PCR

Para a RT-PCR, utilizou-se 5 µl (1 µg) de RNA total extraído de cada amostra, seguindo protocolo descrito por Boonham et al. (2002). Foram utilizados *primers* específicos para os isolados PVY<sup>N</sup> e PVY<sup>NTN</sup>, desenhados para anelar na porção do genoma correspondente à capa protéica. O tamanho do fragmento de DNA esperado é de cerca de 335 pares de bases (pb). Para a PCR, foi utilizado o termociclador *Programmable Thermal Controller - PTC100* (MJ Research), e os reagentes utilizados foram do kit para PCR *Taq DNA Polymerase, recombinant* (Gibco BRL). As condições para a PCR constaram de uma denaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos a 95 °C por 1 min, 58 °C por 1 min e 72 °C por 5 min, com uma extensão final de 5 min a 72 °C. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,2 % corado com brometo de etídeo sob luz ultravioleta (Sambrook et al., 1989). O procedimento será realizado para a capa protéica.

#### 3.1.5 Armazenamento de material

A partir de plantas inoculadas de *Solanum tuberosum* e *Nicotiana tabacum* L. com sintomas sistêmicos, o vírus foi mantido de três formas: a) através de repicagens sucessivas em plantas hospedeiras; b) através de material foliar

desidratado com  $\text{CaCl}_2$ , armazenado em baixas temperaturas (Barradas & Silberschmidt, 1973; Barradas, 1992); c) extrato foliar bruto, armazenado em baixas temperaturas (Barradas et al., 1992).

### 3.2 Material entomológico

#### 3.2.1 Obtenção e manutenção dos clones de *Myzus persicae* (Sulzer) e *Aphis gossypii* Glover

Os indivíduos de *M. persicae* empregados nos experimentos são provenientes de duas colônias coletadas em zonas distintas da Espanha e mantidas no laboratório do CCMA. O primeiro clone denominado “Encín” foi obtido sobre planta de pimentão (*Capsicum annum* L.) na Fazenda Experimental “El Encín” (Alcalá de Henares, Madrid) em 1989 e, o clone “Fuentidueña” foi coletado sobre planta de pêssego (*Prunus persica* Batsch) em Fuentidueña del Tajo (Madrid) em 2000. Ambos são mantidos em plantas de pimentão cv. Yolo Wonder, para os experimentos desenvolvidos em laboratório.

Para desenvolver os ensaios, iniciou-se a criação de um clone de *M. persicae* sobre variedades de batata com a finalidade de “adaptar” estes indivíduos à referida cultura. Para tal, selecionaram-se fêmeas ápteras adultas e virgens das colônias (Encín e Fuentidueña), mantidas em pimentão, para obter por partenogênese indivíduos geneticamente idênticos. As colônias foram mantidas em plantas de batata das cultivares ‘Baraka’ e ‘Desireè’, diferentes das demais variedades empregadas nos experimentos para evitar um possível condicionamento pré imaginal. Os afídeos foram confinadas em

cilindros de metacrilato inicialmente e, posteriormente, com o incremento da colônia, em gaiolas de criação de plástico transparente mantidas em câmara climatizada [temp.: 22:16°C (dia:noite); fotofase de 16 horas e U.R.: 80 ± 20%]. A colônia de *Aphis gossypii* foi obtida empregando-se o “clone 98” derivado de melão (*Cucumis melo* L.) em Almería (Espanha) em 1998, mantidas em melão ‘Regal’.

A manutenção dos clones era realizada se inserido plantas sadias sem tratamento químico e livres de pulgões nas caixas de criação, evitando assim uma possível contaminação. Um detalhe importante foi eliminar as plantas antigas para reduzir a quantidade de insetos e evitando, desta maneira, pulgões com tamanhos diminutos e o aumento de formas aladas, visto que todos os experimentos necessitavam de formas adultas ápteras e de bom tamanho (Figura 8).

### 3.2.2 Fontes de vírus e manutenção

Devido à dificuldade inerente à legislação agrícola espanhola, não foi possível realizar os estudos de transmissão com os isolados coletados no Brasil. Isolados semelhantes foram obtidos de tubérculos infectados gentilmente cedidos pelo Dr. Javier Legurburo do Centro de Mejora de la Patata – NEIKER – Vitória, País Basco (Tabela 4). Estes isolados de PVY foram empregados tanto para os ensaios de resistência à transmissão quanto para os estudos de resistência dos cultivares de batata aos vírus.

As fontes de inóculo dos isolados foram mantidas através de repicagens sucessivas (inoculação mecânica) e/ou por armazenamento de material foliar desidratado com Sílica

Gel a aproximadamente, 5°C. O inóculo para as repicagens foi preparado a partir de material fresco ou desidratado de folhas de *S. tuberosum* infectadas, macerado em tampão fosfato 0,5M pH 7,5 (Yarwood, 1952; 1969). Plantas das variedades Desireè e Baraka foram previamente polvilhadas com o abrasivo “carburundum” e inoculadas após o aparecimento do segundo ou terceiro par de trifolíolos.

A evolução de sintomas foi acompanhada durante 10-15 dias, realizando-se observações diárias, principalmente na folhagem das plantas. O controle constou de plantas “inoculadas” apenas com tampão. Verificou-se a infecção através do teste sorológico de ELISA.

Tabela 4 - Isolados espanhóis de PVY utilizados nos ensaios de transmissão e resistência varietal

<i>Isolado*</i>	<i>Variedade de origem</i>	<i>Fonte de vírus</i>
<i>PVY<sup>NTN</sup></i>	<i>H-94 / Nicotiana tabacum</i>	<i>N. tabacum cv. Xanthi</i>
<i>PVY<sup>N</sup></i>	<i>Solanum tuberosum cv. Heltha*</i>	<i>S. tuberosum cv. Heltha</i>
<i>PVY<sup>O</sup></i>	<i>S. tuberosum cv. Palogam</i>	<i>S. tuberosum cv. Palogam</i>

\* isolado holandês mantido para estudos no Centro de Mejora de la Patata – NEIKER, Espanha

### 3.2.3 Obtenção de plantas-teste

A seleção de cultivares de batata para utilização como plantas teste nos estudos de transmissão (3.2.5) e de comportamento (3.3) baseou-se em consulta a bataticultores do

Sudoeste paulista sobre os cultivares mais relevantes na região e sobre os níveis de incidência de viroses, procurando-se selecionar os cultivares comerciais mais plantados e com níveis de resistência variáveis.

As plântulas inoculadas (planta-teste) nos experimentos de transmissão foram obtidas a partir de: a) mini tubérculos, comprovadamente sadios, cedidos pela Cooperativa Agrícola de Capão Bonito - CACB, pelo Engenheiro Agônomo Luiz Carlos Mariotto ('Agata', 'Monalisa' e 'Jaette Binjte') e pelo Engenheiro Agrônomo Natalino Shimoyama - ABBA (Mondial); e b) tubérculos sadios adquiridos junto ao Centro de Mejora de la Patata - NEIKER, Vitoria, País Basco, Espanha ('Santè', 'Baraka' e 'Desireè'). Para obter maior rapidez no brotamento do material, empregou-se uma lavagem (15 min) em solução de ácido giberélico e tiourea (1 mg:10 g), seguida de lavagem em água corrente e semeadura em vasos e/ou células de germinação com 28 orifícios, contendo substrato constituído de vermiculita e terra orgânica - metodologia empregada na NEIKER. As plantas eram adubadas semanalmente com NUTRICHEN 60 (fertilizante foliar solúvel concentrado - NPK - 20-20-20) na dose de 0,25 Kg/l.

#### 3.2.4 Detecção sorológica dos vírus por ELISA

Para confirmar a presença de infecção viral nas plantas inoculadas mecanicamente e para verificar a transmissão para as plantas-teste nos ensaios, utilizou-se a técnica serológica ELISA (item 3.2.2). Foram utilizadas duas variações da técnica: DAS (*"double antibody sandwich"*) ELISA (Clarck & Adams, 1977) e ELISA-Indireto (Koenig, 1981, Rybicki & von Wechmar,



1981). Até o momento deste estudo, não havia anticorpos monoclonais capazes de detectar a presença de infecção pelo PVY<sup>NTN</sup>. Assim empregou-se o anticorpo policlonal para o grupo *Potyvirus* (geral), pois se tratava de isolados já identificados pela NEIKER.

### 3.2.5 Ensaios de transmissão de três isolados de PVY

#### 3.2.5.1 Comprovação da infectividade e transmissibilidade dos isolados obtidos

Com a finalidade de confirmar a infectividade e transmissibilidade dos isolados obtidos na Espanha (Tabela 4) foram realizados dois testes, sendo um de transmissão mecânica e o segundo por vetores, empregando a colônia de *M. persicae*, já implantada no laboratório.

O experimento com afídeos foi realizado empregando-se a técnica descrita por Fereres et al. (1992) e Garzo (2002). Um total de 90 pulgões adultos/ápteros de aproximadamente 7 - 9 dias de idade foram transferidos com um pincel para caixas plásticas (3,5 x 5,5 x 1 cm) para um período de jejum de 1 hora, com a finalidade de favorecer a aquisição. Após o jejum, os lotes de 30 afídeos foram transferidos para um período de acesso de aquisição (PAA) de 5 min sobre plantas-teste dos isolados de PVY (batata 'Desirè') apresentando sintomas sistêmicos dos três isolados.

Após o PAA, cinco afídeos foram colocados sobre 9 plantas-teste de três espécies vegetais (*Capsicum annuum* L., *S. tuberosum*. 'Mondial' e *Nicotiana tabacum* L.cv. 'Xanthi') para a um período de acesso à inoculação (PAI) de 2 h.

Posteriormente as plantas foram tratadas com o inseticida Confidor 20 LS (Bayer Hispania Industria S.A., Barcelona), que contém um 2% p/v de ingrediente ativo (Imidacloprid). Uma vez tratadas, as plantas foram levadas para câmara climatizada com temperatura de 26:20°C (dia:noite) e fotoperíodo de 16:8 h (dia:noite). A evolução dos sintomas foi acompanhada diariamente. Após 15-20 dias, com o aparecimento de sintomas característicos aos vírus, as plantas foram levadas a laboratório para avaliação serológica através de ELISA.

Para avaliar a infectividade, realizou-se inoculação mecânica nas mesmas plantas hospedeiras (controle positivo), segundo metodologia descrita no item 3.2.2. O controle constou de plantas-teste inoculadas apenas com solução tampão.

#### 3.2.5.2 Eficiência de transmissão dos isolados de PVY por *M. persicae* e *A. gossypii* – eficiência vetorial

Comparou-se a eficiência de transmissão dos isolados PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>N</sup> e PVY<sup>NTN</sup> pelos dois afídeos empregando-se metodologia semelhante à descrita no item 3.2.5.2 (Figura 7), porém utilizou-se apenas *S. tuberosum* 'Desirè' (origem espanhola) como planta teste, que é suscetível aos isolados e não foi usada na criação das colônias, a fim de evitar algum condicionamento pré-imaginal dos afídeos. Foram inoculadas 28 plantas-teste (número máximo de orifícios da bandeja de semeadura empregada) em cada tratamento (combinação afídeo/isolado). Como controle positivo, 10 plantas-teste foram inoculadas mecanicamente com cada isolado. Após 2 h, as plantas foram tratadas com o inseticida e cobertas com tela de

polipropileno do tipo agrotêxtil de 17 g/m<sup>2</sup> de peso e cor branca (Texnovo/Reicrop, Barcelona, Espanha), sendo posteriormente mantidas em casa-de-vegetação para observação dos sintomas. Após 30 dias, amostras foliares das plantas testadas foram submetidas a teste serológico (ELISA). Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística empregando-se tabelas de contingência ( $X^2$ ) (Yates, 1934) para comparar a porcentagem de transmissão.

#### 3.2.5.3 Avaliação da transmissão de estirpes de PVY por *M. persicae* em cinco cultivares de batata

Os níveis de resistência de cinco cultivares comerciais de *S. tuberosum* ('Agata', 'Jaette Bintje', 'Mondial', 'Monalisa' e 'Santè') a três estirpes de PVY foram avaliados através de ensaios de transmissão pelo afídeo *M. persicae*, que se mostrou mais eficiente no experimento de eficiência vetorial (3.2.5.2). Empregou-se a metodologia de transmissão descrita anteriormente (itens 3.2.5.1 e 3.2.5.2 e Figura 6) para todos os isolados (PVY<sup>o</sup>, PVY<sup>N</sup> e PVY<sup>NTN</sup>). Após o PAA de 5 minutos nas plantas-fonte dos isolados, os afídeos foram transferidos para o PAI de 2 h em plantas sadias (28 plantas-teste/ variedade). Após a eliminação dos afídeos com o inseticida e proteção da bandeja com arotêxtil, as plantas indicadoras foram levadas à casa-de-vegetação e avaliadas quanto ao tipo e severidade de sintomas durante 30 dias. Após este tempo os sintomas visuais foram confirmados através do teste de ELISA. Os dados de porcentagem de transmissão foram submetidos à análise estatística empregando-se tabelas de contingência ( $X^2$ ) segundo Yates (1934).

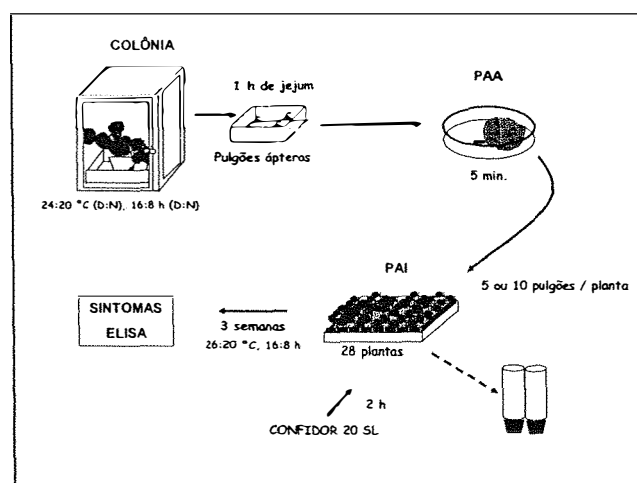


Figura 6 - Metodologia empregada nos ensaios de transmissão dos isolados de PVY por pulgões (Ferreles et al., 1992). Adaptado de Garzo (2002)

### 3.3.3 Ensaios de preferência e de desenvolvimento de *M. persicae* em cultivares de batata

#### 3.3.2 Ensaios de preferência (antixenose)

Para avaliar a preferência do inseto, realizaram-se ensaios de livre escolha utilizando-se as cultivares 'Agata', 'Jaette Bintje', 'Mondial', 'Monalisa' e 'Santè'. As plantas foram obtidas, de acordo com o item 3.2.3, em câmara climatizada [(temp.: 22:16°C (dia:noite); fotofase de 16 horas e U.R.: 80 ± 20%)] sem tratamento com inseticidas, porém adubadas semelhantemente com fertilizante foliar solúvel NUTRICHEN 60 na dose de 0,25 Kg/l, após aproximadamente 20 dias, apresentavam massa foliar suficiente para a realização do ensaio.

Empregou-se técnica semelhante à empregada por Garzo (2002), oferecendo-se discos foliares de cada cultivar em uma arena circular. O experimento foi realizado em placas de Petri plásticas de 9 cm de diâmetro por 3 cm de altura, com um

orifício de 4 cm de diâmetro na tampa, onde se colou uma tela plástica de 50 mesh para permitir a ventilação e evitar a saída dos insetos. Colocou-se um algodão umedecido sobre a placa para evitar a dessecação, tanto dos discos foliares como dos afídeos. Cada placa de Petri constituiu uma “arena”.

Os discos foliares (5 discos / arena), com diâmetro de 1,5 cm, foram obtidos com ajuda de um vazador de rolha coletando-se discos de folhas trifolioladas das diferentes cultivares. Os discos permaneceram em água destilada por 2 h, antes do teste, para manterem a turgidez.

Distribuiu-se um disco de cada cultivar equidistantemente do centro da placa de Petri, onde foram liberados 30 adultos ápteros de *M. persicae*, previamente submetidos a 1 h de jejum (Figura 7). Realizaram-se contagens do número de indivíduos por disco em diferentes períodos de tempo (0,15, 0,5, 1, 2, 4, 6 e 12 h) após a liberação. Apenas foram contados os indivíduos que se encontravam sobre os discos de folhas no momento das avaliações.

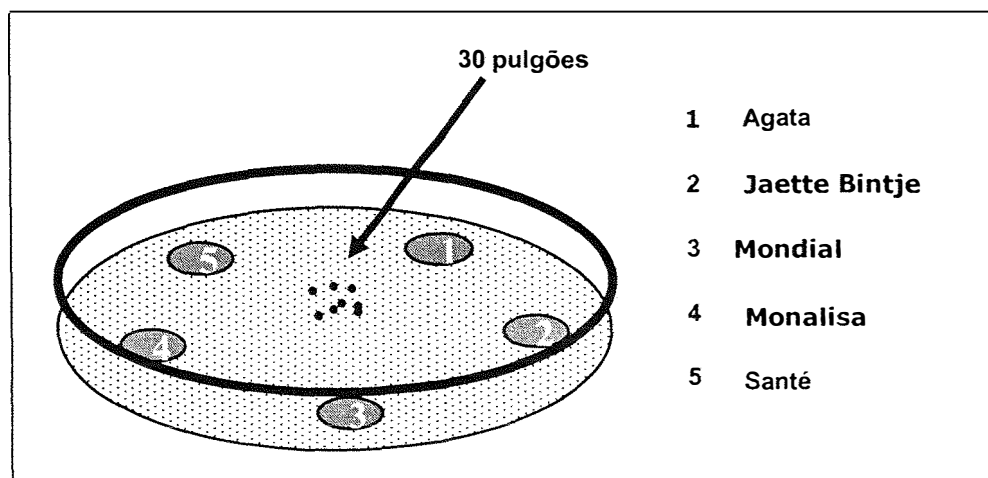


Figura 7 - Esquema dos experimentos de antixenose com *M. persicae* em discos de folhas de batata em diferentes intervalos de tempo

### 3.3.1 Ensaio de desenvolvimento (antibiose)

Avaliou-se o desenvolvimento de *M. persicae* em três dos cultivares de *S. tuberosum* estudados ('Agata', 'Jaette Bintje' e 'Monalisa'). Para tal, os afídeos foram padronizados e as plantas obtidas em câmara climatizada conforme descrita nos itens 3.3 e 3.3.1. O protocolo empregado no ensaio foi semelhante ao descrito por Fereres et al. (1989) e Garzo (2002). Para cada uma das três variedades foram infestadas quatro plantas com 10 adultos ápteros cada, as quais eram cobertas com um cilindro de metacrilato para confinar os indivíduos, constituindo uma gaiola (Figura 9). Durante o ensaio, as plantas foram mantidas em câmara climatizada (Temp.: 26°C e fotofase de 8 horas) (Garzo, 2002).

Depois de 8 dias do início da infestação, ou seja, após os indivíduos adultos atingirem a fase madura e se reproduzirem, realizou-se a contagem de ninfas e adultos de *M. persicae* (reprodução). Considerando-se que o ciclo evolutivo de *M. persicae* é de aproximadamente 10 dias (Furiatti & Almeida, 1993), foram obtidos dados correspondentes a uma geração do inseto.

### 3.3.3 Delineamento e análise estatística dos ensaios de preferência e desenvolvimento

Para os ensaios de preferência adotou-se o delineamento de blocos ao acaso com cinco tratamentos e 10 repetições. Os discos de folha dos diferentes cultivares correspondiam aos diferentes tratamentos, sendo que depois de distribuídos nas placas de Petri, constituíram uma parcela. Cada placa ou arena

correspondeu a um bloco, recebendo os cinco tratamentos distribuídos equidistantemente a partir do centro. O ensaio foi realizado três vezes.

No experimento de desenvolvimento, adotou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado. Foram preparados quatro vasos para os cultivares Agata, Jaette Bintje e Monalisa, contendo uma planta cada um. Cada gaiola constitui uma parcela.

Os dados foram transformados em  $\log x+1$  (preferência) e  $\sqrt{x+1}$  (desenvolvimento) e submetidos a análise de variância no programa Super Anova, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey-Kramer (ANOVA), ao nível de 5% de probabilidade.

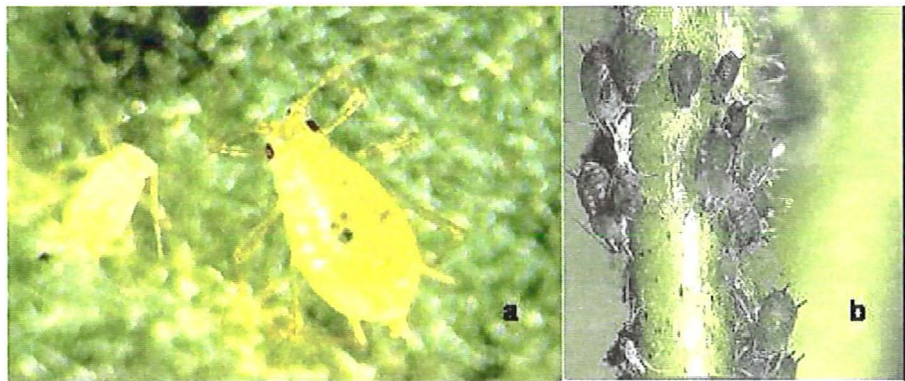


Figura 8 – a) Ninfa e adulto áptero de *Myzus persicae* e b) colônia de *Aphis gossypii*



**Figura 9 – Plantas de batata cobertas com cilindro de metacrilato empregados nos experimentos de antibiose. Madri, Espanha, 2002**

### **3.4 Monitoramento da atividade alimentar de *M. persicae* em diferentes cultivares de batata**

Através da técnica de “Electrical Penetration Graph” (EPG) caracterizou-se o comportamento alimentar do vetor *M. persicae* no interior do tecido vegetal das diferentes cultivares de batata (‘Ágata’, ‘Jaette Bintje’, ‘Monalisa’, ‘Mondial’ e ‘Santè’), visando-se identificar possíveis fatores de resistência a este inseto.



### 3.4.1 Obtenção de registros EPG

Em cada cultivar, realizou-se o monitoramento alimentar de 15 adultos ápteros de *M. persicae*, com idade entre 7 e 9 dias, obtidos da colônia pré-estabelecida (item 3.2.1). Estes foram imobilizados com o auxílio de uma bomba de vácuo adaptada a um microscópio estereoscópico (Nikon SMZ2T, Nikon Corp. Tokyo, Japão) e uma fonte de luz fria.

A conexão dos afídeos aos eletrodos de cobre (3 cm x 1 mm de diâmetro) (Figuras 10) foi feita através de um fio de ouro de aproximadamente 1,5 - 3 cm de comprimento e 20  $\mu$ m de diâmetro. Com a ajuda de uma pinça de ponta curva e um estilete entomológico, o fio de ouro foi colado ao dorso do abdome do afídeo (Figura 12). Para a fixação, utilizou-se uma gota de pintura de prata condutora (16034 Pelco Collodia Silver, Ted Pella Inc. Redding CA, E.U.A.). Os afídeos foram deixados em jejum durante 1 h, com o fio de ouro aderido, antes de dar início ao registro.

O equipamento empregado na maioria dos registros (DC (GIGA-2)), é operado em um computador Macintosh com o programa de aquisição de dados Macstylet v2.0  $\beta$ 4 operando em ambiente DOS, possui 6 canais e é acoplado a um monitor gráfico (osciloscópio), utilizado para registros de eletrocardiogramas na contração de músculos cardíacos, normalmente utilizado em trabalhos de fisiologia animal. Para o armazenamento dos dados foi utilizado um computador Macintosh série Power PC que possibilitava a transferência das informações geradas a discos de *Zip Drive* (Figura 10).

Após o jejum dos afídeos, procedia-se à calibragem do amplificador gráfico, especificando número de canais (na

maioria das vezes 4) e duração do registro (6 h) com o software A=cm<sup>2</sup> acquisition v1.0 (G. Febvay, INSA, Lyon, França) para Macintosh.

As plantas de batata eram oferecidas aos insetos em vasos de 10 cm de diâmetro, onde no substrato se colocava um segundo eletrôdo de cobre de 10 cm de comprimento e 0,2 cm de diâmetro; finalizando-se os ajustes destes, iniciava-se o processo de aquisição de dados. Realizaram-se registros de onda de EPG de 6 h de duração para cada um dos indivíduos avaliados.

#### 3.4.2 Interpretação e análise dos registros EPG

Após a obtenção dos registros EPG, estes foram analisados utilizando o aplicativo Macstylet v2.0 $\beta$ 4 (Febvay et al., 1996) para Macintosh, obtido junto ao INRA-INSA, França. Este permite fácil visualização das ondas obtidas nos registros, bem como fazer a marcação dos diferentes eventos (tipos de onda) descritos por Tjallingii (1990) (Figura 2), que correspondem à atividade dos estiletos do afídeo em diferentes tecidos da planta. As atividades são identificadas baseando-se na análise da amplitude e da frequência de ondas registradas.

O programa permite, também, a fixação do intervalo de voltagem (eixo y) e do intervalo de tempo (eixo x), facilitando a avaliação dos eventos. A observação e análise foram feitas

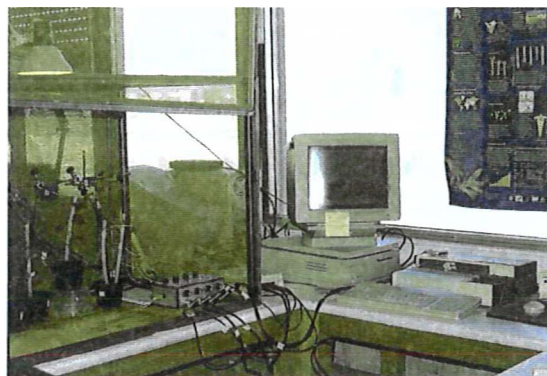


Figura 10 – Vista geral do equipamento empregado para aquisição e análise de registros de EPG no estudo de monitoramento da alimentação de *Myzus persicae* em cvs. de batata



Figura 11 – Detalhe dos terminais do equipamento EPG durante obtenção de registros

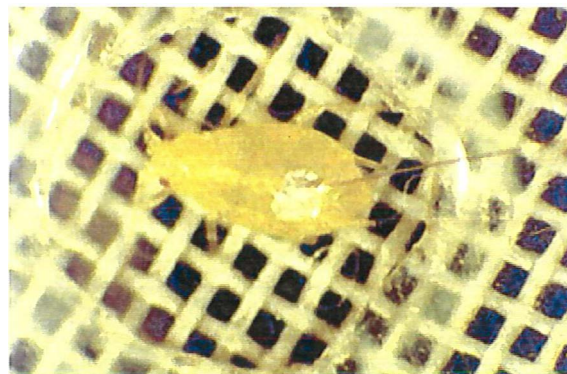


Figura 12 – Adulto áptero de *Myzus persicae* com fio de ouro aderido ao abdome através de pintura de prata condutora (cortesia da foto: A. Fereres)

empregando-se intervalos de tempo de 10 e 15 segundos, para maior precisão. Além da possibilidade da marcação dos eventos no registro, foi possível obter o momento exato (tempo em segundos), a voltagem da seqüência de marcas feitas e as estatísticas de cada um dos tipos de onda e geral.

Os dados da avaliação das marcas foram interpretados e dispostos em forma de tabelas para realização da análise estatística. Neste estudo, foram analisados 15 registros válidos (ou seja, sem nenhum tipo de variação ou interferência) por tratamento. Os parâmetros avaliados foram:

- a) *Duração da 1ª np (“no probe”)*: trata-se de um dado sensível ao pré-tratamento. Refere-se ao período de “não prova” entre o início do registro e o início da 1ª prova. É um parâmetro importante e depende de condições prévias ao registro, relacionadas à manipulação da planta, do pulgão e do equipamento, como por exemplo: manuseio do pulgão provocando *stress* ou quebra do aparelho bucal, tratamento da planta, fixação do fio de ouro, conexão com a sonda, calibragem do aparelho, etc.
- b) *Tempo até a primeira pd (“potential drop”)*: A queda de potencial registra o rompimento de uma célula pelos estiletos, evidenciando a picada de prova. Quanto maior o tempo entre o começo do registro até a primeira picada de prova (ou *pd*), maior é o fator de resistência (defesa química ou física) na epiderme. Neste trabalho não se diferenciaram *pds* longas de curtas.
- c) *Duração da 1ª penetração (ondas pd e C)*: compreende o período de trabalho extracelular do estilete do afídeo (possivelmente entre a epiderme e o floema) buscando os tecidos vasculares. Durante este processo são rompidas

várias células ocasionando as ondas do tipo pd, posteriormente retornando à onda C. Esta onda representa os trabalhos de movimentação dos estiletos em uma frequência positiva maior ou igual a zero.

- d) *Número total de pd e n° total de pd com duração menor que 3 min*: mostra o número total de eventos realizados por cada indivíduo e sua duração nas regiões extracelulares da planta. Quando estes eventos são muito freqüentes e duram pequenos intervalos de tempo (poucos segundos), acredita-se que evidencia algum princípio de resistência nas camadas mais externas, ou seja, epiderme ou mesofilo.
- e) *Provas maiores que 3 min (C>3 min)*: esta variável indica a frequência de atividade de prova (penetração dos estiletos antes de chegar aos vasos) com duração maior que 3 min o que mostra uma maior dificuldade para a movimentação estiletoar entre as células da epiderme, evidenciando certa resistência inicial da planta.
- f) *Tempo até ingestão floemática e duração do evento E*: o padrão de onda E é subsequente a uma onda C, e se associa com o potencial intracelular resultante da ação da bomba salivar durante, penetração dos tecidos vasculares e ingestão. Este evento se divide em dois padrões de onda: E1, que apresenta alternância de picos de polaridade positiva e de vales e E2, na qual se observam apenas vales de polaridade negativa sobre um padrão de onda base. A onda E1 representa o contato e perfuração dos vasos crivados do floema com salivação. A onda E2 envolve ingestão de saliva do floema (Tjallingii, 1990; Prado, 1997). Não necessariamente a onda E1 é seguida por E2, e quando isto não ocorre geralmente se retorna ao tipo de onda C.

- g) *Tempo até alcançar o floema desde o início da prova (tempo até E2 > 8 min)*: período que o inseto é retido nas fases anteriores à ingestão floemática. Este parâmetro serve na avaliação de resistência, inclusive quanto a fatores químicos envolvidos. Uma planta que apresenta um longo período em E1 e curto em E2, ou não permite a chegada do inseto em E2, pode vir a ter fatores químicos de resistência.
- h) *Porcentagem de tempo em E2*: o tempo em ingestão floemática evidencia uma preferência e ou facilidade do inseto para se fixar na planta, seja para alimentação ou colonizá-la.
- i) *Porcentagem de tempo em np até a 1ª E*: determina a porcentagem de tempo envolvido entre a oferta da planta ao inseto até sua chegada na alimentação no floema, para 15 indivíduos.
- j) *Porcentagem de tempo em np até a 1ª E/ tempo total até E*: esta razão mostra a relação no registro entre a porcentagem do inseto sem nenhuma atividade frente ao tempo total, incluindo todos os demais eventos (np, pd e C).
- k) *Frequência de pd*: mostra o número de picadas de prova por minuto, este valor está relacionado com a atividade de transmissão de vírus e resistência física da planta em regiões mais externas do tecido vegetal.
- l) *Número total de E2/número de E1*: esta razão indica o número de eventos E1 que foram seguidos de E2. Este valor não pode ser maior que 1.

### 3.4.3 Análise estatística dos registros EPG

A análise estatística foi realizada empregando-se o programa Statview 4.01 para Macintosh, verificando-se a distribuição normal ou não da amostra com o teste *W* de Shapiro Wilk (Abacus Concepts, 1987). Os dados obtidos que se enquadravam em uma curva normal foram analisados através do teste de Fisher-MDS, a 5% de probabilidade (ANOVA), do “software” Super Anova 1.11 (Abacus Concepts, 1989). Para os dados que não obedeciam a uma distribuição normal, empregou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Winer, 1971; Siegel, 1956).

### 3.5 Avaliação de barreiras físicas para controle de afídeos vetores em plantio de batata

O experimento de campo para a avaliação de métodos físicos de controle foi implantado na Fazenda Cavalinho em Paranapanema, SP, de propriedade do Eng<sup>o</sup>. Agrônomo Tadashi Takeko, em área de plantio para consumo do cultivar ‘Atlantic’.

Foram avaliados quatro tratamentos para o controle de afídeos: 1) barreira física de tela tipo sombrite, com 30% de sombreamento; 2) barreira de plantas de soja – *Glycine max* Merrill. ‘IAC 15’, semeada 15 dias antes de fixar as barreiras, na linha adjacente à região da bordadura para cada repetição; 3) cobertura flutuante constituída de tela hidrofílica do tipo “tecido não-tecido” ou agrotêxtil com 15 g/cm<sup>2</sup>, hidrofílica e 85% de transparência de luz (Marca Novotex Agro®, Fitesa S.A., Santa Catarina, Brasil); e 4) testemunha (sem nenhum tratamento).

O delineamento experimental empregado foi um quadrado latino com quatro repetições (Figuras 13 e 14), evitando desta maneira o efeito de borda. As parcelas mediam  $10 \text{ m}^2$  sendo 5 m de comprimento por 2 m de largura, totalizando 6 linhas (distância de plantio entre cova = 0,70 cm) e aproximadamente 60 plantas (distância de plantio entre plantas = 0,20 cm), por parcela. As quadras foram distanciadas por aproximadamente 4 m, englobando uma área total de  $640 \text{ m}^2$  (Figura 13).

Foram realizadas observações semanais, onde se avaliou o número de pulgões por planta de batata, amostradas ao acaso (20 plantas/quadra) através de contagem visual nos quatro tratamentos.

Colocaram-se três armadilhas adesivas amarelas a 1,5 m de altura na direção do vento dominante, sendo trocadas quinzenalmente.

A avaliação dos afídeos presentes nas armadilhas adesivas amarelas propiciou uma análise de populações de afídeos presentes, abrangendo também os alados, caracterizando as revoadas (ou vôos migratórios) nos diferentes períodos de coleta, inclusive para aquelas espécies que não colonizam a cultura de batata, além de outros insetos que se constituem como pragas para a cultura. O experimento foi iniciado após 28 dias do plantio, visto que a cobertura com o agrotexil (Novotex Agro®) e a fixação da barreira com a tela de sombrite somente se tornou possível após o trato cultural necessário (amontoa), executado após a germinação da maioria das plântulas.

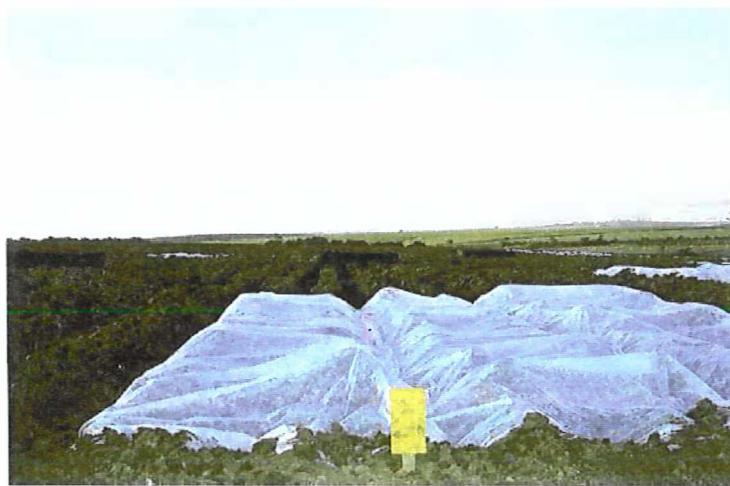
Realizou-se a contagem em 20 plantas por quadra nos quatro tratamentos, totalizando 360 plantas. As avaliações



visuais foram realizadas semanalmente e os dados das médias totais obtidas foram transformados em  $\log x+1$  e submetidos à análise de variância no programa Super Anova, com as médias comparadas pelo teste de Tukey Kramer (ANOVA) ao nível de 5% de probabilidade. O mesmo teste estatístico foi empregado para o número de insetos totais amostrados nas armadilhas amarelas.

Avaliou-se o número de plantas com sintomas de virose (5 amostras por talhão, com um total de 20 amostras por tratamento) por ocasião das amostragens de afídeos, com a finalidade de acompanhar a incidência de PVY. O material vegetal e entomológico foi levado a laboratório onde se procedeu a identificação dos afídeos segundo Eastop (2000), em microscópio estereoscópico e a diagnose do material amostrado por ELISA-indireto, utilizando-se antissoro policlonal para o PVY.





**Figura 14 – Vista geral do experimento de controle físico a insetos vetores de vírus, Paranapanema (2003)**

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Levantamento de estirpes do vírus Y da batata

#### 4.1.1 Indexação biológica dos isolados de campo

As plantas indicadoras inoculadas mecanicamente manifestaram sintomas característicos aos *Potyvirus*, sendo que os apresentados foram: pontos cloróticos, pontos necróticos e “ring spots” (anéis concêntricos locais), além de sintomas sistêmicos como bolhosidades, clareamento de nervuras, deformação foliar, mosaico amarelo, mosaico; mosqueado, necrose, necrose de topo e “vein-banding” (faixa das nervuras) (Figuras 14 a 16). De acordo com indexação biológica apresentada nas tabelas 5, 6 e 7, foram detectados todas as estirpes de PVY descritas na literatura. Nas três localidades avaliadas observou-se a presença do PVY ordinário (PVY<sup>o</sup>), necrótico (PVY<sup>N</sup>) e um outro isolado não caracterizado que prevaleceu em toda a amostragem, e que induz sintomatologia semelhante ao PVY<sup>NTN</sup>. Este último foi identificado como *Potyvirus* nos ensaios de serologia empregando-se o antissoro policlonal para este gênero (Tabela 5 e 6). O isolado clorótico (PVY<sup>C</sup>) foi detectado em duas amostras, sendo uma da região de Paranapanema no cultivar

Atlantic e, em Capão Bonito no cultivar Jaette Bintje. Esta região não foi incluída nos demais estudos sorológicos e moleculares, visto que se tratava de uma pequena coleta dentro de uma reduzida área plantada para propagação de sementes e com uma pequena infecção pelo PVY (Tabela 7).

De acordo com a literatura, as espécies da família Solanaceae são as que melhor diferenciam os isolados de PVY, principalmente os necróticos (Moraes, 1997). A espécie *Nicotiana tabacum* L. cv. White Burley apresentou na maioria das vezes sintomas que evoluíram de um leve clareamento de nervuras, para mosqueado e mosaico característicos para os vírus do gênero *Potyvirus*. No entanto, para as amostras caracterizadas como pertencentes às estirpes <sup>N</sup> e <sup>NTN</sup>, notou-se uma maior frequência de necrose. O cultivar de batata empregada nos testes de inoculação mecânica (*Solanum tuberosum* cv. Jaette Bintje) reagiu aos isolados com sintomas que se iniciaram, na sua maioria, com clareamento de nervuras, deformação foliar, mosqueado, bolhosidades, mosaico e em alguns casos necrose apical. Com menor frequência houve o aparecimento de sintomas de mosaico amarelo ou amarelecimento das folhas, anéis concêntricos ou (“ring spots”) e faixa das nervuras ou (“vein banding”).

De acordo com trabalhos anteriores realizados no Brasil (Figueira & Pinto, 1995; Figueira et al., 1996; Souza-Dias, 1995; 1997) até meados da década de 90, o principal vírus causando perdas importantes na produção de batata era o vírus do enrolamento da folha da batata (*Potato leafroll luteovirus* – PLRV). Contudo, o PVY possui grande variabilidade, como pode ser observado pelo número de isolados descritos na literatura, devido a inúmeras possibilidades de recombinação gênica

(Revers et al, 1996). Mais recentemente, houve um incremento significativo da incidência de PVY nas regiões produtoras nacionais, sendo que um dos motivos foi a entrada no Brasil de um isolado oriundo da Europa (Figueira & Pinto, 1995), que possuía uma disseminação rápida e ampla. Conseqüentemente, o PVY tornou-se isto elevou novamente o PVY como sendo um problema fitossanitário grave que limitava a cultura de batata em determinadas regiões no país. Moraes (1997) ressalta a inversão dos dados observados na década anterior, quando o principal problema era o PLRV. Outro fato que este autor destaca, que corrobora os resultados obtidos, diz respeito à maior incidência das estirpes necróticas quando comparado com a estirpe comum (PVY<sup>0</sup>), como se observa na Tabela 4.

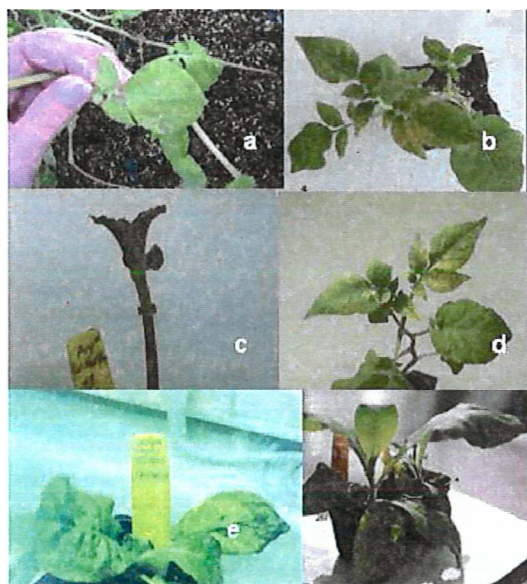


Figura 14. Prancha com sintomas induzidos pelo isolado PVY<sup>N</sup>- a) *Solanum tuberosum* cv. Desirè - transmissão por *Aphis gossypii*; b) cv. Jaette Bintje - transmissão por *Myzus persicae*; c) cv. Herta – fonte de material infectado; d) cv. Jaette Bintje - inoculação mecânica; e) *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi apresentando necrose e *bolhosidades* e, f) necrose nas nervuras em *N. tabacum* cv. Samsun

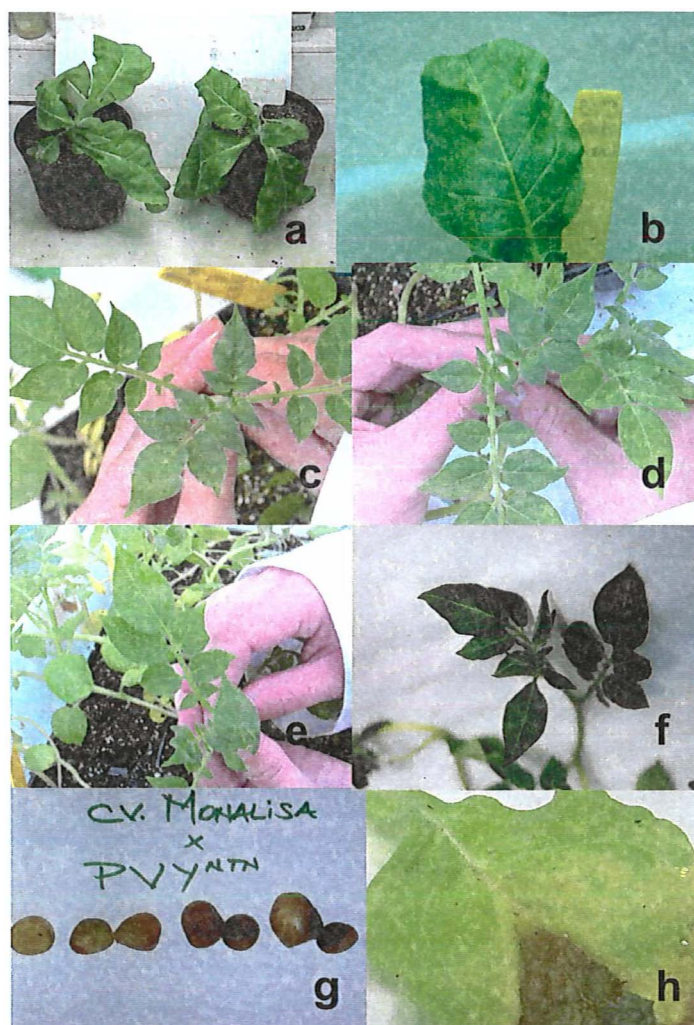


Figura 15. Prancha com sintomas induzidos pelo isolado PVY<sup>NTN</sup>. a) deformação foliar em *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi; b) *N. tabacum* cv. Xanthi com manchas cloróticas e mosqueado; c) *Solanum tuberosum* cv. Desirè – transmissão por *Myzus persicae*; d) *S. tuberosum* cv. Ágata - transmissão por *M. persicae*; e) *S. tuberosum* cv. Desirè - transmissão por *Aphis gossypii*; f) *S. tuberosum* cv. Jaette Bintje - transmissão por *Myzus persicae*; g) *S. tuberosum* cv. Monalisa sintomas em tubérculos; h) sintomas de necrose em *N. tabacum* cv. Xanthi – inoculação mecânica

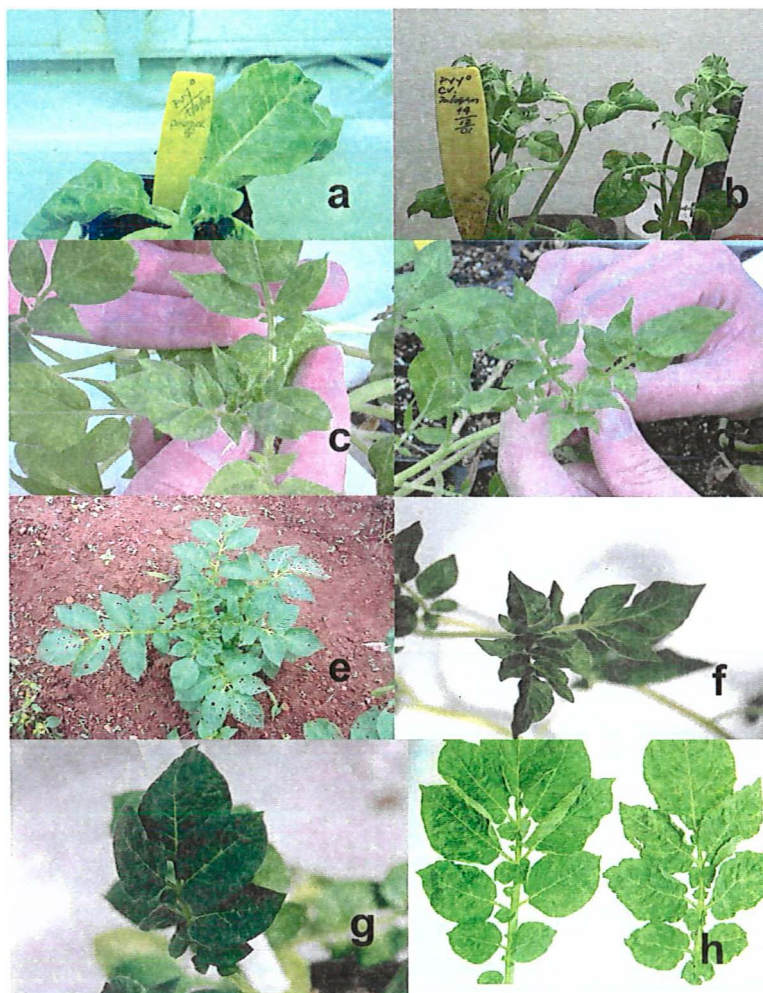


Figura 16. Prancha com sintomas induzidos pelo isolado PVY<sup>0</sup>- a) *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi com bolhosidades; b) *Solanum tuberosum* cv. Palogam – fonte original de vírus; c) *S. tuberosum* cv. Desirè com mosaico - transmissão por *Myzus persicae*; d) *S. tuberosum* cv. Desirè – mosaico por transmissão mecânica; e) *S. tuberosum* cv. Jaette Bintje sintomas em campo; f) *S. tuberosum* cv. Jaette Bintje - transmissão por *M. persicae*; g) *S. tuberosum* cv. Mondial – transmissão por *M. persicae*; h) sintomas de mosqueado e bolhosidades em *S. tuberosum*



Tabela 5. Indexação biológica de isolados de *Potyvirus*, coletados em plantios de batata de Itapetininga, SP, quanto à sintomatologia apresentada em plantas indicadoras. Abril/2001

Variedade amostrada	Amostra	Plantas Indicadoras <sup>(1)</sup>						Isolado <sup>(2)</sup>
		<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>N. tabacum</i> cv. White burley	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Jaette Bintje	<i>S. nigrum</i>	<i>Physalis floridana</i>		
Ágata	1	*	-	-	-	-	-	-
	2	*	CN, Ne	Ma	Ma	-	-	? (PVY <sup>NTN</sup> )
	3	*	Ne	Ma	Ma	CN	Mq	? (PVY <sup>NTN</sup> )
	4	*	Mo	Mq	Mq	CN	-	PVY <sup>N</sup>
	5	*	CN	CN,DF	CN,DF	-	-	PVY <sup>NTN(3)</sup>
	6	*	CN, Ne	Ma	Ma	-	-	? (PVY <sup>NTN</sup> )
	7	*	CN, Ne	Ma, Mo	Ma, Mo	-	-	Poty
	8	*	Ne	Ma	Ma	-	-	-
	9	*	-	-	-	CN	-	-
	10	*	Mq, Mo	Bo	Bo	-	-	PVY <sup>O</sup>
Atlantic	1	-	Ne	Mq, Df	Mq, Df	-	-	PVY <sup>N</sup>
	2	PN, MC, Df, Mo	Mo	Mq, Ma	Mq, Ma	-	Ma, Df, Mq	PVY <sup>O</sup>
	3	Ne, DF, Mo	Mq, Mo	Ma, CN, DF	Ma, CN, DF	-	-	PVY <sup>O</sup>
	4	-	Mo	Ma, NA, DF	Ma, NA, DF	Mo	-	PVY <sup>N</sup>
	5	-	Mo	Mo, DF	Mo, DF	-	-	PVY <sup>O</sup>
	6	-	CN	CN, VB, Ma, RS	CN, VB, Ma, RS	Mq, Bo	-	PVY <sup>C</sup>
	7	-	Mq	-	-	-	Mq	PVY <sup>O</sup>
	8	-	Ma, Ne	Ma, RS	Ma, RS	Mq, PCI	-	? (PVY <sup>NTN</sup> )
	9	-	Ma, Ne	Ma, Mq	Ma, Mq	-	Mq	Poty
	10	-	Ma	Ma, Cn, Bo, Mo, DF	Ma, Cn, Bo, Mo, DF	-	-	PVY <sup>NTN</sup>

(1) S

intomas apresentados: Bo: bolhosidades; CN – clareamento de nervuras; DF - deformação foliar; Ma – mosaico amarelo; Mo – mosaico; Mq – mosqueado; Ne – necrose; NA - Necrose de apical; PCI – pontos cloróticos; PN – pontos necróticos; VB – “vein-banding”; RS – “ring spot.”

(2) Denominação de isolados baseada em sintomas apresentados nas plantas indicadoras e teste sorológico de ELISA (Tabela 8). Os isolados que apresentaram sintomas, mas não foram positivos para PVY por ELISA, receberam a designação PVY<sup>NTN</sup> e posteriormente foram caracterizados empregando-se técnicas moleculares (RT-PCR).

(3) Os isolados ressaltados em negrito foram avaliados por RT-PCR

Tabela 6. Indexação biológica de isolados de *Potyvirus* coletados em plantios de batata de Paranapanema, SP, quanto à sintomatologia apresentada em plantas indicadoras. Abril/2001

Variedade amostrada	Amostra	Plantas indicadoras <sup>(1)</sup>					Isolado <sup>(2)</sup>
		<i>N. tabacum</i> cv. White burley	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Jaette Bintje	<i>S. nigrum</i>	<i>Physalis floridana</i>		
Ágata	1	Mo	Ma	-	-	-	? (PVY <sup>NTN</sup> )
	2	-	-	-	-	-	-
	3	Mq, Mo	Ma, RS, Nf	-	-	-	? (PVY <sup>NTN</sup> )
	4	Mo, DF	DF, Mo, DF	-	-	-	PVY <sup>O</sup>
	5	Ne	Mo	-	-	-	PVY <sup>N</sup>
Atlantic	1	Mq, Mo	CN, Ma, RS	CN, Mo	-	-	? (PVY <sup>NTN</sup> )
	2	Mo, DF	Mo, Ma, VB, RS	Af, Bo	-	-	? (PVY <sup>NTN</sup> )
	3	Mq	CN, Mo	-	-	-	? (PVY <sup>NTN</sup> )
	4	Mq, DF	Mo, DF, CN	-	-	-	PVY <sup>C</sup>
	5	Mq, Mo	Ma, RS, NF	-	-	-	PVY <sup>NTN</sup>
Jaette Bintje	1	Mo	Mq	-	-	-	? (PVY <sup>NTN</sup> )
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	CN, Mo	Mo, Ma	-	-	-	? (PVY <sup>NTN</sup> )
	5	Mq, CN	Ma, Bo, DF	-	-	-	? (PVY <sup>NTN</sup> )
Mondial	1	CN, Mo	Ma	-	-	-	? (PVY <sup>NTN</sup> )
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	Mq	Mq, Ma, Df	-	-	-	? (PVY <sup>NTN</sup> )
	5	Mq, DF	Mq, Mo	-	-	-	<i>Pofy</i>

(1) Sintomas apresentados: Bo: bolhosidades; CN – clareamento de nervuras; DF - deformação foliar; Ma – mosaico amarelo; Mo – mosaico; Mq – mosqueado; Ne – necrose; VB – “vein-banding”; RS – “ring spots”.

(2) Resultados obtidos graças a sintomas apresentados em plantas hospedeiras e teste sorológico de ELISA. Os materiais que apresentaram sintomas, mas não foram isolados através do ensaio de ELISA receberam a designação PVY<sup>NTN</sup> e posteriormente foram caracterizados empregando-se técnicas moleculares (RT-PCR).

(3) Os isolados ressaltados em negrito foram avaliados por RT-PCR

Tabela 7 – Indexação biológica de isolados de *Potyvirus*, coletados em plantios de batata de Capão Bonito, SP, quanto à sintomatologia apresentada em plantas indicadoras. Abril/2001

Variedade amostrada	Amostra	<i>N. tabacum</i> cv. White burley	Plantas hospedeiras <sup>(1)</sup>			<i>Physalis floridana</i>	Isolado <sup>(2)</sup>
			<i>Solanum tuberosum</i> cv. Jaette Bintje	<i>S. nigrum</i>	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Jaette Bintje		
Jaette Bintje	1	CN, DF, Mo	-	-	-	-	-
	2	CN, DF	-	-	-	-	-
	3	DF	Ma	-	-	-	? (PVY <sup>NTN</sup> )
	4	-	-	CN	Mo	Mo	PVY <sup>C</sup>
	5	Mo	-	-	-	-	-
	6	-	Mo	-	-	-	? (PVY <sup>NTN</sup> )
Bintje Holandesa	1	Mo	-	-	-	-	*
	2	CN	-	-	-	CN	*
	3	CN, DF	Mo	-	-	Mo	*
	4	-	-	-	Mo	Mo	*
	5	CN, Mo	Ma, VB, CN	-	-	Mo	*

(1) Sintomas apresentados: Bo: bolhosidades; CN – clareamento de nervuras; DF - deformação foliar; Ma – mosaico amarelo; Mo – mosaico; VB – “vein-banding”

(4) Resultados obtidos graças a sintomas apresentados em plantas hospedeiras e teste sorológico de ELISA. Os materiais que apresentaram sintomas, mas não foram isolados através do ensaio de ELISA receberam a designação PVY<sup>NTN</sup> e posteriormente foram caracterizados empregando-se técnicas moleculares (RT-PCR).

A disseminação de PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup>, e PVY<sup>N</sup> se dá de maneira diferente, sendo que alguns autores afirmaram inicialmente que o subgrupo clorótico não era transmissível pelo inseto vetor (De Bokx & Huttinga, 1981). Entretanto, Blanco-Urgoiti et al. (1998) comprovaram a transmissão de alguns isolados do PVY<sup>C</sup> pelo afídeo *M. persicae* (Sulzer) dividindo-o em dois subgrupos (C1 e C2), devido à capacidade de infectar *Capsicum annum* L. cv. Yolo Wonder. Esta não transmissibilidade por pulgões foi relacionada a mutações na região amino-terminal da capa protéica (Atreya et al., 1990) e pela presença de um componente auxiliar alterado.

#### 4.1.2 Caracterização dos isolados por ELISA

Os testes de ELISA, realizados para indexar serologicamente o material que apresentava suspeita de infecção por vírus, mostraram que varias estirpes do PVY se encontram na região Sudoeste do Estado de São Paulo. De uma maneira geral observou-se uma maior incidência de isolados necróticos (PVY<sup>N</sup>) e do isolado não caracterizado (possivelmente PVY<sup>NTN?</sup>) quando comparado com os demais (Tabela 8). De um total de 45 amostras analisadas, 35 estavam infectadas com PVY, nas seguintes proporções (isolado/plantas infectadas): PVY<sup>C</sup> (3/35); PVY<sup>O</sup> (6/35); PVY<sup>N</sup> (3/35); PVY<sup>NTN?</sup> (23/35). O cultivar Atlantic foi o que apresentou a maior taxa de infecção pelos diferentes isolados de PVY sendo que todas as amostras provenientes de campo deste cultivar encontravam-se infectadas (15 coletados/ 15 infectados) fato que não se repetiu nos demais cultivares.

Os métodos serológicos de detecção, pelo menos no caso deste grupo específico (*Potyvirus*), são de grande importância já que se trata de uma ferramenta complementar aos testes biológicos e à sintomatologia observada em plantas indicadoras.

Sabe-se que a detecção e a identificação de isolados de PVY em campo é de crucial importância para se desenvolver técnicas e métodos de controle. No entanto, devido à facilidade de recombinação inerente a esta família de fitovírus, faz-se necessário o emprego de outras metodologias, tais como a detecção através de anticorpos monoclonais específicos e a biologia molecular. Estes fatores, aliados à necessidade do Brasil ter de importar sementes básicas para o plantio, favorecem muito a entrada de estirpes e isolados novos como aconteceu em 1995, com a suspeita de entrada do PVY<sup>NTN</sup> ou “Potato Tuber Necrotic Ringspot Disease” (PTNRD) nas regiões produtoras.

Em trabalho semelhante ao realizado, Ellis et al. (1997) indexou-se materiais provenientes de diferentes hospedeiras e regiões do mundo utilizando-se 10 antissoros monoclonais preparados para alguns isolados específicos, englobando as três estirpes amplamente conhecidas: PVY<sup>O</sup>, que apresenta a maior distribuição mundial, o PVY<sup>N</sup> que prevalece na Europa e na América do Sul, sendo raramente encontrado na América do Norte e o PVY<sup>C</sup> já descrito na Austrália, Nova Zelândia, Europa, Índia e África do Sul. Inicialmente, foram encontradas as três estirpes, sendo possível uma subdivisão em serotipos. Para o PVY<sup>N</sup>, o serotipo mais comum, foi designado N1 sendo detectado em 10 localidades diferentes tanto em batata quanto em pimentão. Os demais (N2 a N5) foram encontrados apenas

em material de batata proveniente do Canadá, Escócia e Peru. Para o PVY<sup>O</sup> os isolados foram detectados com maior freqüência em batata e em menor quantidade em fumo e pimentão. Os serotipos mais comuns (O1 a O3) foram obtidos da Austrália, Canadá, Irlanda, Peru, Escócia, Espanha e Estados Unidos, enquanto que os serotipos isolados de O4 a O8 foram obtidos de batata do Canadá e Estados Unidos e apenas um (O9) foi obtido em fumo, proveniente da África do Sul. O PVY<sup>C</sup> foi encontrado apenas em batata proveniente da Holanda e se trata de um material muito restrito de uma maneira geral. No Brasil com base em sintomas apresentados em tabaco Moraes (2003) classificaram 20 isolados como sendo 11 necróticos e 9 pertencentes à estirpe comum. Assim, observou-se uma ampla relação entre os resultados obtidos nesta pesquisa e os observados por Moraes (2003), particularmente no que se refere à alta incidência de materiais necróticos.

#### 4.1.3 Caracterização de isolados por RT - PCR

Os materiais armazenados foram analisados através da técnica de RT-PCR empregando-se *primers* para a detecção específica da variante necrótica <sup>NTN</sup>. Das 23 amostras avaliadas biológica e sologicamente, fragmentos de aproximadamente 550 pb foram amplificados com sucesso, para as seguintes amostras de cultivares, escolhidas aleatoriamente para as regiões de Paranapanema (Atlantic 5 e Mondial 5) e Itapetininga (Ágata 5 e 7 e Atlantic 9 e 10) (Tabelas 5 e 6). Os resultados obtidos não permitiram a total confirmação da identidade dos isolados quando avaliados através de ensaios biológicos e

sorológicos, o que indica a necessidade de se realizar análises futuras para os demais isolados.

Estes dados confirmam observações prévias feitas por Souza Dias (1997) no Estado São Paulo e por Figueira et al. (1995) e Moraes (2003) no Estado de Minas Gerais.

**Tabela 8 – Caracterização sorológica de material com suspeita de infecção por PVY coletado nos municípios paulistas de Itapetininga, Paranapanema e Capão Bonito/SP.**

<i>Variedades amostradas</i>	<i>Inoculação mecânica</i> (1)	<i>Deteção de isolados por ELISA</i> <sup>(2)</sup>		
		<i>PVY<sup>C</sup></i>	<i>PVY<sup>O</sup></i>	<i>PVY<sup>N</sup></i> <i>PVY<sup>NTN</sup></i> <sup>(3)</sup>
<i>Agata</i>	10 / 15	1 / 10	2 / 10	2 / 10
<i>Atlantic</i>	15 / 15	2 / 15	4 / 15	2 / 15
<i>Jaette</i>	6 / 10	1 / 6	0 / 6	0 / 6
<i>Bintje</i>				
<i>Mondial</i>	3 / 5	0 / 3	0 / 3	0 / 3
<b>TOTAL</b>	<b>35/45</b>	<b>3/35</b>	<b>6/35</b>	<b>3/35</b>

(1) N° de plantas indicadoras sintomáticas sobre o número total de plantas inculdas mecanicamente com amostras de campo

(2) Número de isolados de PVY detectados por ELISA com antissoros monoclonais específicos, sobre o total de amostras ed plantas indicadoras testadas

(3) Possível presença do PVY<sup>NTN</sup>. Inferência baseada em sintomatologia da planta hospedeira e pela ausência de reação com os antissoros específicos para as estirpes O, N e C. O numerador representa o número de amostras que reagiram com antissoro policlonal para PVY.



#### 4.1.4 Infectividade de material foliar armazenado

As amostras foliares desidratadas de diversas cultivares de *Solanum tuberosum* L. e *Nicotiana tabacum* L. conservaram a infectividade dos isolados de *Potato Y virus* em estudo por até 31 meses. Esta metodologia de armazenamento de material é empregada por inúmeros laboratórios de virologia no mundo e também para alguns outros grupos de vírus vegetais, como no caso de *Tymovirus* (Barradas et al., 1993).

Este fato reforça dados anteriores obtidos por Colariccio (1996), que estudando a estabilidade de um isolado de *Potyvirus* oriundo de *Solanum palinacanthum* Dunn. coletado em Piedade, SP obteve resultados positivos por até 51 meses. No entanto, outro isolado coletado na região de Jacareí, SP manteve a sua infectividade por um período de apenas 12 meses. Kurstak (1981) afirma que o PVY pode ser armazenado e manter-se infectivo por aproximadamente 15 anos.

Esta técnica de armazenamento por desidratação apresenta vantagens pelo fato de reduzir o número de plantas em casas-de-vegetação, minimizar o risco de contaminação por infecções mistas (fato comum quando se trabalha com *Potyvirus* pela relativa facilidade de transmissão por diversos afídeos que podem ocorrer em casas-de-vegetação), além de se poder manter o material original sem sofrer mutações, com eventual perda da sua infectividade ou transmissibilidade. Além destes aspectos positivos, os fitovírus assim conservados podem ser empregados em experimentos de transmissão inclusive realizando a aquisição através de

membrana (Salas & Barradas, 1999; Salas et al., 1993; Salas et al., 2000).

## 4.2 Transmissão de três estirpes de PVY por afídeos

### 4.2.1 Comprovação da infectividade e transmissibilidade dos isolados espanhóis obtidos

Os resultados mostraram que os isolados estavam infectivos, sendo transmitidos tanto mecanicamente como por *M.persicae* (Tabela 9) para plantas teste de *S. tuberosum* cv. Mondial e *N. tabacum* cv. Xanthi. Observou-se sintomatologia característica das respectivas estirpes de PVY em plantas de *N. tabacum* eliminando a hipótese de infecção mista (Figura 17). Alguns autores (Collariccio 1996; Watson, 1958; Pirone & Thornbury, 1983) citam casos da perda da infectividade de diversos *Potyvirus*, inclusive da transmissibilidade por afídeos, resultante das inúmeras inoculações sucessivas para manutenção das fontes em laboratório.



Figura 17. Plantas de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi inoculadas mecanicamente com três isolados de PVY a) controle negativo, b) PVY<sup>O</sup> – mosaico leve; c) PVY<sup>N</sup> – mosaico e deformação e d) PVY<sup>NTN</sup> - início de necrose de nervuras

Tabela 9. Testes de transmissão para comprovação da infectividade dos isolados empregados no estudo. Madrid, 2002

isolado	Plantas teste	Inoculação mecânica		Inoculação por pulgões		ELISA
		resultado / sintomas <sup>(1)</sup>	resultado / sintomas <sup>1</sup>	resultado / sintomas <sup>1</sup>	resultado / sintomas <sup>1</sup>	
PVY <sup>MTN</sup>	<i>Capsicum annuum</i>	NR	NR	NR	NR	-
	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Mondial	NR	NR	NR	NR	+
	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthi	+	CN	+	MQ(?)	+
PVY <sup>N</sup>	<i>C. annuum</i>	NR	NR	+	MQ	-
	<i>S.m tuberosum</i> cv. Mondial	NR	NR	+	MQ	+
	<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi	+	PN,CN	+	DF, CN	+
PVY <sup>o</sup>	<i>C. annuum</i>	NR	NR	+	CN(?)	-
	<i>S. tuberosum</i> cv. Mondial	NR	NR	-	-	+
	<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi	+	PN,CN	+	PN,CN	+

(1) NR – inoculação não realizada; CN – clareamento de nervuras; DF –deformação foliar; PN – pontos necróticos; MQ - mosqueado

#### 4.2.2 Eficiência da transmissão dos isolados de PVY por *M. persicae* e *Aphis gossypii* Glover– eficiência vetorial

Os isolados de PVY<sup>O</sup>, PNY<sup>N</sup> e PVY<sup>NTN</sup> foram transmitidos por ambos afídeos, porém com maior eficiência por *M. persicae*. *A. gossypii* é descrito no Brasil como um vetor de menor para o PVY (Moraes, 1997).

Eastop (1977) afirma que a proporção dos vírus transmitidos por afídeos não é tão evidente graças às relações específicas destes com seu grupo de plantas hospedeiras. Segundo Berger et al. (1983), a eficiência dos afídeos como vetores do grupo *Potyvirus* pode variar mesmo entre populações diferentes de uma mesma espécie e, inclusive, com as condições ambientais (bióticas e abióticas) a que estes são submetidos.

Sabe-se, atualmente, que o processo de transmissão de vírus não persistentes é um mecanismo biológico e não mecânico e, que há determinadas associações muito restritas aos organismos em questão, no caso, afídeos e vírus vegetais (p.ex.: PRLV x *M. persicae*) que se estendem intra-especificamente. Entre os isolados aqui testados, o PVY<sup>NTN</sup> obteve uma alta taxa de transmissão (71,4%) por *M. persicae* e não foi transmitido por *A. gossypii*. Quanto ao isolado PVY<sup>O</sup>, também se verificou uma maior eficiência de *M. persicae* (82,1%) quando comparado com *A. gossypii* (10,7%) fato que se repetiu para o isolado PVY<sup>N</sup> com 42,8 e 14,3% de eficiência, respectivamente para *M. persicae* e *A. gossypii*. Alguns autores (Figueira & Pinto, 1995; Figueira et al., 1996) afirmam que as estirpes necróticas deste vírus possuem uma maior

transmissibilidade aliada ao fato de conseguirem uma maior concentração nos tecidos da planta hospedeira. Moraes (1997) observou maior eficiência de transmissão (SC – 81,3%) isolados necróticos (Br, 54, 20 e UFLA) de PVY<sup>N</sup> em relação a um isolado (07) de PVYO (6,3%).

Segundo Bourdin et al. (1999), há três fatores nos modelos epidemiológicos que muitas vezes não são levados em conta para a caracterização das interações planta x vírus x vetor, entre eles: a própria identificação do inseto vetor ao nível de espécie, a caracterização do clone em estudo (*M. persicae* é freqüentemente confundido com outras espécies) e a identificação correta do isolado do vírus. Assim, as taxas de transmissão observados em experimentos podem ser mais altas ou mais baixas de acordo com a origem e a espécie viral envolvida. Além da idade da colônia e origem dos insetos empregados. Por outro lado, ao comparar a eficiência vetorial de 8 espécies de afídeos comuns à cultura de batata em Idaho, Halbert et al. (2003) verificou que todas, inclusive as espécies não colonizantes, podem transmitir o PVY, embora a espécie *M. persicae* tenha se destacado como mais eficiente em experimentos de transmissão envolvendo picadas de prova.

A ocorrência de transmissão não persistente de *Potyvirus* via picadas de prova parece explicar por que espécies de afídeos não colonizantes podem transmitir PVY em batata.

Tabela 10. Comparação da transmissão de três isolados do *Potato virus Y* por inoculação mecânica, e por pulgões (*Myzus persicae* e *Aphis gossypii*) em *Solanum tuberosum* cv. Desirée.

Modo de transmissão	Isolado viral					
	PVY <sup>o</sup>		PVY <sup>N</sup>		PVY <sup>MTN</sup>	
	Plantas infectadas / Plantas testadas	% transmissão	Plantas infectadas / Plantas testadas	% transmissão	Plantas infectadas / Plantas testadas	% transmissão
<i>Aphis gossypii</i>	3 / 28	10,7	4 / 28	14,3	0 / 28	0
<i>Myzus persicae</i>	23 / 28	82,1	12 / 28	42,8	20 / 28	71,4
Inoculação mecânica	8 / 10	80,0	0 / 10	0	3 / 10	30,0

#### 4.2.3 Transmissão de estirpes do *Potato virus Y* em cinco cultivares de batata – resistência ao vírus

No estudo de resistência à transmissão dos isolados PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N</sup> e PVY<sup>NTN</sup> para cultivares de batata por *M.persicae* observou-se uma variação na porcentagem de infecção de acordo com o isolado testado, indicando diferentes níveis de resistência (Tabela 11). O cultivar espanhol Santè mostrou-se resistente a todos os isolados, não apresentando plantas infectadas. Este cultivar foi desenvolvido (NEIKER/País Basco) através de manipulação genética visando resistência ao PVY e, quando desafiado com isolados oriundos da Espanha, apresentou resultados promissores. Por outro lado, as quatro cultivares brasileiras mostraram, no máximo, uma resistência moderada aos mesmos isolados. Pode-se observar que entre os 5 cultivares testados, apenas Santè se mostrou resistente ao processo de transmissão, enquanto que nos demais observou-se uma variação na taxa de transmissão de acordo com o isolado estudado (Tabela 11). Nenhuma variedade brasileira se mostrou imune ou resistente ao PVY<sup>NTN</sup>.

Entre os cultivares brasileiros testados, 'Ágata' e 'Jaette Bintje' mostraram resistência moderada ao isolado de PVY<sup>O</sup> com porcentagens de transmissão de 57,14 e 50,0%, respectivamente. Os cultivares Mondial e Monalisa apresentaram uma alta taxa de infecção (89 e 96% respectivamente)(Tabela 11). Sabe-se que a transmissão de *Potyvirus* se caracteriza pelos curtos períodos de tempo necessários para aquisição e inoculação, ou seja, um grande número de picadas de prova pode incrementar a transmissão e

desta maneira uma variedade que é resistente ao inseto, porém suscetível ao vírus pode favorecer a dispersão da doença.

Para o isolado necrótico (PVY<sup>NTN</sup>) não houve nenhum cultivar resistente à transmissão. As taxas de transmissão foram maiores ou iguais a 75% (Tabela 11) o que pode estar relacionado à alta concentração de inoculo inerentes aos isolados necróticos na cultura de batata. O PVY<sup>N</sup>, por outro lado, foi o que mostrou taxas de transmissão mais baixas para alguns dos cultivares envolvidos, com 39,28% para Jaette Bintje, 50% para Mondial e 32,14% para Monalisa (moderadamente resistentes). Apenas a variedade Ágata, classificada como suscetível, propiciou uma maior taxa de transmissão (85%). Este fato pode ser resultado de uma baixa concentração de PVY<sup>N</sup> na planta hospedeira, visto que a baixa infecção se repete conforme verificado no experimento de transmissão por diferentes afídeos (4.2.2) em que não ultrapassou 42,8%, independente da espécie vetora utilizada, e não se obteve infecção através de inoculação mecânica (Tabela 10).

Sabe-se que a transmissão não persistente de vírus de plantas é relacionada ao comportamento do afídeo quando este realiza as picadas de prova geralmente na epiderme da planta hospedeira, para reconhecimento. Com o auxílio da técnica de monitoramento alimentar baseada em "Electrical Penetration Graph" (EPG) Tjallingii & Hogen Esch (1993) investigaram as rotas dos estiletos de afídeos através dos tecidos da planta e as relacionaram com o processo de transmissão. Esses autores observaram que muito poucas células da planta são mortas no processo, fato muito importante para a transmissão de vírus, visto que este tipo de patógeno necessita de uma célula viva



para se replicar e poder se translocar mais facilmente, provocando a infecção na planta hospedeira.

A rota envolvida na busca do floema tem também um papel importante. Durante a penetração estiletar, ocorre a salivação, que atua como indutora ou inibidora de reações dos tubos crivados aos danos provocados pelos estiletos que podem resultar na coagulação da proteína do floema e formação de calose (Prado, 1997). Este processo pode impedir a liberação dos virions do estilete, como ocorre com *Aphis gossypii* em plantas de melão que possuem o gene *Vat1*, podendo alterar o equilíbrio na oxidoredução de alguns aminoácidos da planta e reduzir a eficiência de transmissão, e desta forma manifestar uma resistência à transmissão (Garzo, 2002). Assim, é evidente a necessidade de se incrementar estudos da resistência à transmissão de vírus na cultura de batata.

Segundo Lecoq & Pitrat (1999), tem-se detectado princípios de resistência na carga genética de diferentes hortaliças para o PVY, inclusive nas culturas de batata, tomate e pimentão. Em batata, Milhovilovich *et al.* (1998) consideram como a melhor estratégia para controlar ou minimizar as perdas causadas pelo PVY, o emprego de genes de resistência agrupados em duas classes: de hipersensibilidade e de extrema resistência, que envolvem expressão de respostas necróticas à infecção viral (genes N) e ausência ou pequeno acúmulo de vírus na planta (genes R), respectivamente.

Sabe-se que os genes de resistência que possuem maior durabilidade são os Ry, visto que atuam contra uma grande gama de estirpes de PVY e, os genes Ny, que se limitam a algumas estirpes específicas. Para a batata são conhecidos

dois genes de resistência para o PVY, provenientes de duas espécies nativas: *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* (Ry<sub>adg</sub>) e *S. stoloniferum* Schltdl. (Ry<sub>sto</sub>). Como pode se observar é evidente a necessidade de se incrementar estudos de resistência à transmissão na cultura de batata no Brasil.

**Tabela 11. Avaliação da resistência à transmissão de três isolados de Potato vírus Y por *M. persicae* em cinco cultivares comerciais de *Solanum tuberosum***

<i>Isolado Viral</i>	<i>Cultivar</i>	<i>Nº plantas infectadas/ nº plantas teste</i>	<i>% de transmissão</i>	<i>Nível de resistência<sup>(1)</sup></i>
PVY <sup>O</sup>	Agata	16 / 28	57,14 b <sup>(2)</sup>	MR
	Jaette Bintje	14 / 28	50,00 b	MR
	Mondial	25 / 28	89,28 a	S
	Monalisa	27 / 28	96,42 a	S
	Santè	0 / 28	0 c	R
PVY <sup>NTN</sup>	Agata	25 / 28	89,28 a	S
	Jaette Bintje	26 / 28	92,85 a	S
	Mondial	21 / 28	75,00 a	S
	Monalisa	21 / 28	75,00 a	S
	Santè	0 / 28	0 b	R
PVY <sup>N</sup>	Agata	24 / 28	85,71 a	S
	Jaette Bintje	11 / 28	39,28 b	MR
	Mondial	14 / 28	50,00 b	MR
	Monalisa	9 / 28	32,14 b	MR
	Santè	0 / 28	0 c	R

(1) Tabela de níveis de resistência

R = Resistente: 0 – 6 plantas infectadas (0 – 25%)

MR = Moderadamente resistente: 7 – 16 plantas infectadas (25 – 60%)

S = Susceptível: 17 – 28 plantas infectadas (60 – 100%)

(2) Médias seguidas de mesma letra, dentro de um mesmo isolado viral, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey – Kramer a 5% de probabilidade (P<0,05)

Tabela 12. Análise estatística do teste de avaliação da resistência à transmissão de três isolados de PVY em cinco variedades de *Solanum tuberosum* por *M. persicae*

Comparação de cultivares	PVY <sup>o</sup>		PVY <sup>NTN</sup>		PVY <sup>N</sup>	
	$\chi^2(1)$	P	$\chi^2$	P	$\chi^2$	P
Agata vs. Jaette Bintje	0,29 ns	0,592	0,22 ns	0,6393	12,88 s	0,0003
Agata vs. Mondial	7,38 s	0,006	1,95 ns	0,16	8,19 s	0,0042
Agata vs. Monalisa	12,12 s	0,0005	1,95 ns	0,016	16,6 s	0,0001
Agata vs. Santè	22,40 s	0,001	45,16 s	0,0001	42,00 s	0,0001
Jaette Bintje vs. Mondial	10,22 s	0,0014	3,31 ns	0,689	0,65 ns	0,42
Jaette Bintje vs. Monalisa	15,38 s	0,0001	3,31 ns	0,689	0,31 ns	0,577
Jaette Bintje vs. Santè	18,66 s	0,0001	48,53 s	0,0001	13,69 s	0,0002
Mondial vs. Monalisa	- ns	0,0136	- ns	0,999	1,84 ns	0,174
Mondial vs. Santè	45,16 s	0,0001	33,60 s	0,00001	18,67 s	0,0001
Monalisa vs. Santè	52,13 s	0,0001	33,60 s	0,00001	10,72 s	0,0011

(1) Dados de resistência a transmissão analisados pelo teste de  $\chi^2$ , onde ns = não significativo e s = significativo ao nível de 1% de probabilidade.

### 4.3 Ensaio de preferência e desenvolvimento de *M. persicae* em diferentes cultivares de batata

#### 4.3.1 Ensaio de preferência (antixenose)

O número médio de *M. persicae* variou nas cinco cultivares de 1,42 (valor mínimo) a 2,76 afídeos/disco foliar (valor máximo), para os valores considerados na análise estatística. Os valores correspondentes à avaliação de 12 h após a liberação não foram empregados devido à discrepância nos dados obtidos, este fato é explicado pela perda na turgidez dos discos de folha, prejudicando a escolha pelos insetos.

Ocorreu diferença significativa na porcentagem de afídeos sobre discos foliares dos cultivares em todos os tempos avaliados, com maior preferência alimentar pelo cultivar Mondial (Figura 17). Não houve diferença quanto à preferência entre os demais genótipos. Estes dados corroboram informações anteriores de que o tempo ótimo para o afídeo definir a planta hospedeira seria de 30 min (Moraes, 1994).

Alguns estudos revelam a preferência alimentar de afídeos e outros artrópodes fitófagos por plantas, infectadas por vírus (Kennedy, 1951; White, 1984); possivelmente porque estes patógenos, em alguns casos, induzem uma melhoria na qualidade da folha da planta hospedeira como alimento, beneficiando dessa forma o patógeno e o inseto vetor (Edwards & Wratten, 1981).

De acordo com White (1984), a preferência alimentar de alguns artrópodes por plantas infectadas poderia ser devida a um aumento na disponibilidade de nitrogênio solúvel, pela

quebra de proteínas em aminoácidos e subsequente aumento no fluxo dessas substâncias pela translocação, via floema, para os locais de armazenamento ou de crescimento da planta. Um exemplo que pode ser citado é a preferência - tanto por alimentação como para colonização - de *Aphis fabae* Scopoli e *M. persicae* por folhas de beterraba (*Beta vulgaris* L.) com formação de galhas e infecção por vírus (Kennedy, 1951).

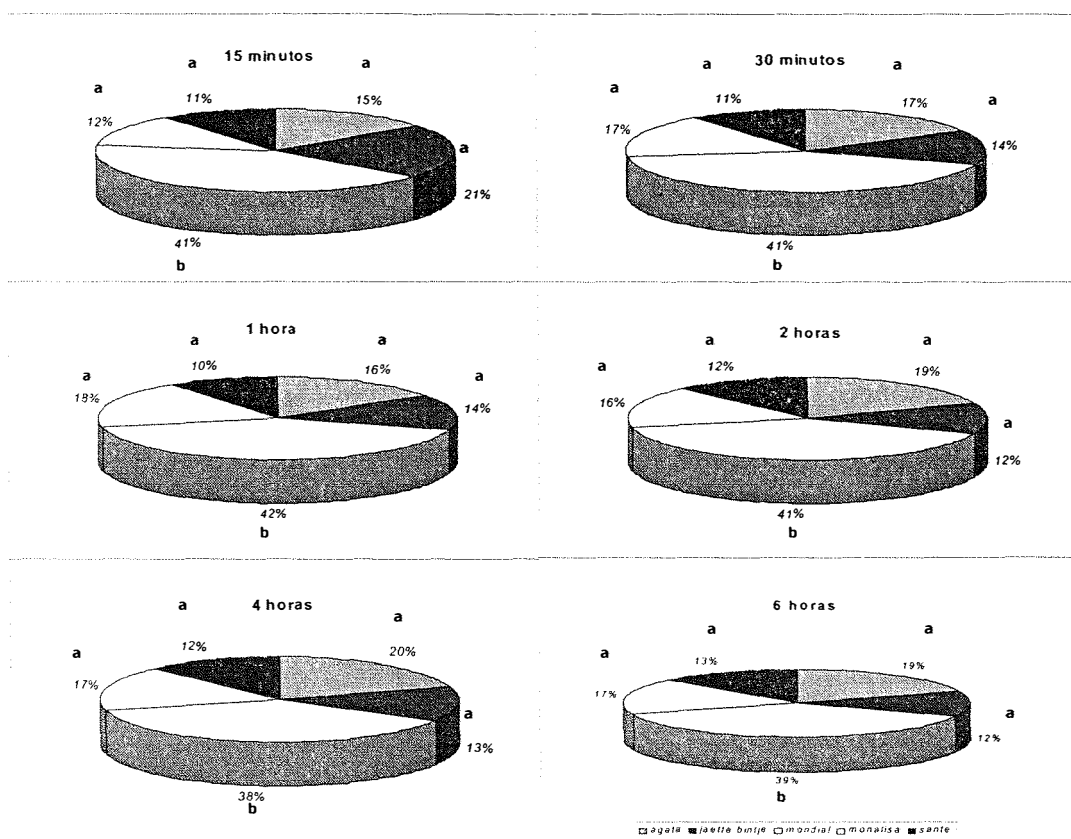


Figura 17. Porcentagem média de indivíduos de *Myzus persicae* em discos de folha das cultivares em estudo, após sucessivos períodos de tempo, em teste de livre escolha. Médias seguidas de letras diferentes dentro do mesmo gráficos diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey-Kramer - ANOVA

Com os resultados da presente pesquisa pode-se recomendar, de acordo com o tipo de infecção mais freqüente em campo, uma variedade onde os pulgões se reproduzam menos ou mais lentamente e que possua uma resistência moderada ao PVY, minimizando perdas.

#### 4.3.2 Ensaio de desenvolvimento (antibiose)

Os resultados dos experimentos de antibiose indicaram que *M. persicae* se desenvolve nas três cultivares avaliadas, Agata, Jaette Bintje e Monalisa, porém com uma taxa menor em Monalisa, quando comparado com Jaette Bintje (Figura 18).

Em um estudo anterior, Stein (1998) verificou que seis diferentes genótipos testados não interferiram na sobrevivência de *M. persicae* durante o período ninfal. Este autor observou altos valores da variedade ninfal. Esse autor observou altos valores da viabilidade ninfal se davam graças a não interferência dos tricomas glandulares como mecanismo de defesa da planta nesta fase, também citado por La Pointe & Tingey (1984).

Entre os estímulos que atuam na preferência dos insetos por determinados alimentos, destacam-se os físicos e químicos. Muitos insetos são influenciados por estímulos físicos; por exemplo, diversas espécies de afídeos são atraídas por tons amarelados.

Diversos estímulos químicos estão relacionados às interações que envolvem inseto-planta. Tais estímulos são de natureza complexa e contêm misturas de substâncias diferentes, destacando-se as provenientes do metabolismo secundário das plantas (Swain, 1977). Além disso, outro

aspecto que merece destaque é o acúmulo de produtos secundários, como alcalóides, substâncias fenólicas, terpenos, glicosídeos esteroidais e cianogênicos, contribuindo para a defesa das plantas contra patógenos e herbívoros (Levin, 1976; Duarte, 1997).

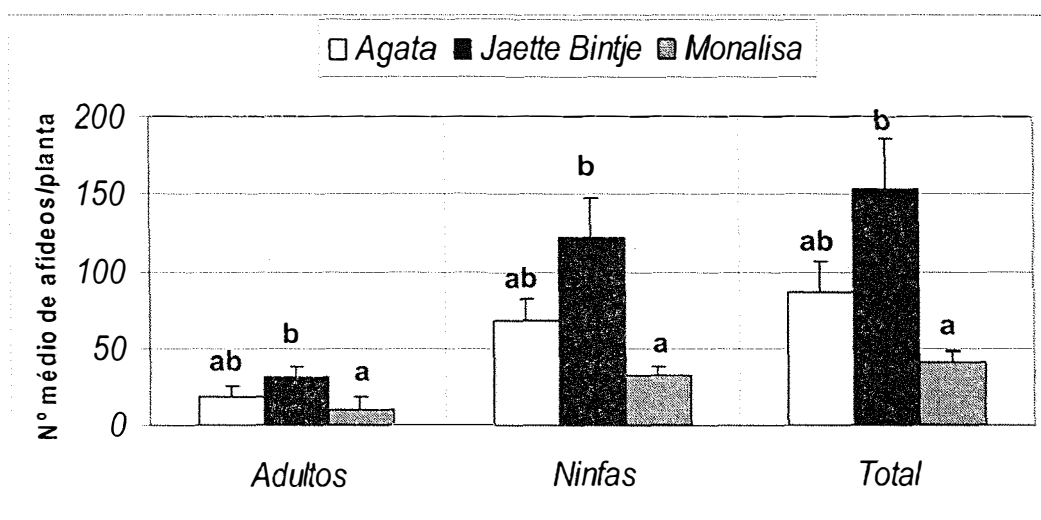


Figura 18. Número médio(1) de indivíduos de *Myzus persicae* observados em 3 cultivares de batata após 8 dias da infestação-com 10 adultos ápteros/ planta. [Temp.: 26°C; Fotoperíodo:16:8 (D:N) h]. As médias seguidas de letras diferentes possuem diferença significativa ( $P < 0,05$ ) segundo o teste de Tukey-Kramer - ANOVA

#### 4.4 Monitoramento da atividade alimentar de *M. persicae* em diferentes cultivares de batata

Os resultados obtidos neste subitem correspondem ao estudo do comportamento alimentar de *M. persicae* em 4 cultivares comerciais de batata oriundas do Brasil e de uma cultivar espanhola (Santè) com resistência genética ao PVY (gene  $Ry_{sto}$ ), produzida pela manipulação genética. Através



destas observações, tentou-se identificar algum princípio de resistência nas plantas testadas, seja este em seus tecidos ou metabólitos secundários, frente ao seu afídeo vetor.

O número total de registros obtidos através da técnica de “Electrical Penetration Graph” (EPG) em todas as cultivares de batata foi de 205, totalizando 1230 h. Destes foram tomados ao acaso 75 (15 por cultivar) registros válidos, ou seja, sem nenhum tipo de variação ou interferência que comprometesse a qualidade dos dados. O número de registros válidos por cultivar (tratamento) para que o estudo fosse considerado válido foi de 15 a 20.

As variáveis do comportamento alimentar foram divididas em *não seqüenciais*, ou seja, frequência e duração total dos eventos (Tabela 13), fornecidas pelo programa de análise dos registros (Mac Stylet) e as *variáveis seqüenciais*, que evidenciaram alguns eventos relacionadas ao estudo da resistência e que não foram fornecidos pela análise, tais como: porcentagem de tempo em E2, frequência de ondas pd, tempo até a primeira E, entre outras (Tabela 14).

A análise dos registros de dados durante 6 h mostraram que existem fatores pré e pós floemáticos envolvidos em alguns mecanismos de resistência para os cultivares em estudo. Os resultados mostraram que na variedade Santè ocorreu um pequeno número de eventos de não prova - np (16,7), porém com uma maior duração total (192,33 min) (Tabela 13), ou seja, são poucos e longos períodos nesta variável, o que evidencia dificuldade de *M. persicae* na inserção do estilete na epiderme do cultivar Santè quando comparado com os demais cultivares. Observou-se também que este cultivar

possui o menor número de tentativas de inserção intercelular do estilete (C); poucas provas menores de 3 min ( $C < 3$ ) e o menor tempo total (85,88 min) desta variável. Neste cultivar, os afídeos realizaram um pequeno número de provas intracelulares (pd) (85,8), resultando assim na menor frequência observada (0,23 pd/min). Outro fator que apóia a evidencia de resistência é o longo período que os afídeos levam até entrarem na fase de ingestão floemática (E2), constituindo-se no maior valor em comparação aos demais cultivares e no menor número de eventos realizados (0,70) (Tabela 13).

De uma maneira geral, a principal característica do cultivar Santè é impedir que o afídeo inicie a alimentação sobre a planta, visto que os pulgões passam uma grande quantidade do seu tempo em np, mesmo depois de um longo período exposição à planta (Figura 19) Outra característica deste cultivar é o grande número de provas curtas (C antes de  $C > 3$  min) em relação aos demais cultivares testados (Tabela 13), indicando uma resistência que inibe a penetração dos estiletos em direção ao floema. Estas duas características sugerem que existe um tipo de resistência física impedindo o assentamento inicial do pulgão e bloqueando as fases iniciais da alimentação. Observou-se, também, que poucos indivíduos chegam à fase de ingestão floemática (E1 e E2) (Tabela 14), indicando que existem problemas na localização do floema. No entanto, após a localização do floema, a duração da ingestão é similar à observada nos cultivares Ágata, Mondial e Monalisa, comprovando então, que não há evidências de uma resistência química relacionada à ingestão floemática

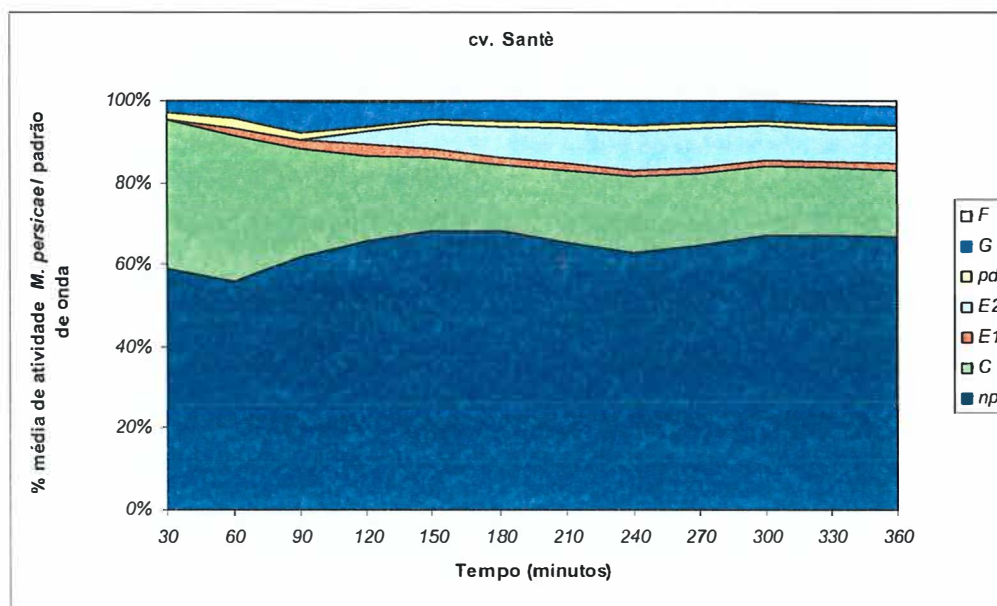


Figura 19. Porcentagem média de tempo gasto por adultos (n=15) de *Myzus persicae* em diferentes padrões de onda (EPG), a cada intervalo de 30 min em *Solanum tuberosum*

No cultivar Monalisa, inicialmente classificado em questionários de campo como sendo suscetível devido à grande quantidade de plantas infectadas nas áreas produtoras, observou-se um comportamento de *M. persicae* que sugere resistência física. Isto se deve aos elevados períodos sem prova (128,05 min) e o maior índice de eventos deste tipo (np) realizados (32,5) (Tabela 13). Este cultivar também mostrou a maior frequência (30,5) de provas (C) e um alto número de provas (1,9) antes da primeira prova maior que 3 min ( $C > 3$ ), fato este que pode evidenciar dificuldades na busca dos tecidos vasculares. Deve-se destacar, também, o menor tempo total em E, com 38,7 min (Tabela 9 e Figura 20). Os valores obtidos para

as demais variáveis (E1, E2, pd e G) se enquadram como intermediários em relação aos demais cultivares. Não se obteve nenhum registro com o padrão de onda F para o cultivar Monalisa.

Estes dados corroboram os resultados obtidos nos experimentos de antibiose, onde no cultivar Monalisa ocorreu uma menor fixação e desenvolvimento da colônia de *M. persicae* (Figura 18), este fator de resistência, este fator de resistência provavelmente pré-floemático, pode provocar o fenômeno de repelência, muito conhecido no início do emprego dos primeiros inseticidas piretróides, que induz uma maior disseminação de vírus não persistentes em campo.

Assim, parece que o cultivar Monalisa, possui uma maior resistência ao assentamento na planta (resistência física), mas em menor grau que o cultivar Santè, visto que um maior número de pulgões iniciam a prova rapidamente (minutos) (Figura 19). Contudo, após a localização do floema a ingestão de seiva transcorre normalmente (E) transcorre normalmente (Tabela 14).

O cultivar Mondial mostrou valores intermediários para todas as variáveis analisadas, destacando-se o grande número de vezes que os pulgões entraram em E2 (2,3) (Tabela 13). Este cultivar possui uma das mais altas taxas de ingestão floemática, com duração total de  $E_{total}$  e de E2, superado apenas pelo cultivar Jaette Bintje. Isto evidencia a suscetibilidade do cultivar Mondial, devido à facilidade dos insetos atingirem seus tecidos floemáticos, e é consistente com os resultados obtidos nos experimentos de antixenose com os resultados obtidos onde se observou o maior número

médio de pulgões por disco de folha, em todos os tempos avaliados (Figura 9), ou seja, a preferência de *M. persicae* pela cultivar Mondial..

O cultivar Ágata induziu se destaca pelo comportamento semelhante ao cultivar Monalisa (Figura 11). Entretanto, deve se destacar um indício de resistência ao nível de floema (não do mesofilo), visto que uma grande proporção de eventos E1 não termina em E2. Outro dado importante é que o tempo em E1 é maior que todos os demais cultivares (Tabelas 13 e 14). Dessa forma, os afídeos alcançam o floema, porém não se alimentam perfeitamente, nem conseguem realizar uma ingestão contínua de seiva do floema (E2) (Tabela 14). Também se observou uma alta taxa de trabalho mecânico (F) (0,50/registro). Os valores de duração em E2 são relativamente baixos (Tabela 13 e 14), o que demonstra que os insetos chegam ao floema (E1), mas permanecem pouco tempo em ingestão floemática (E2) nos vasos crivados, o que pode sugerir algum tipo de resistência.

Finalmente, no cultivar Jaette Bintje, caracterizado como resistente segundo alguns produtores, devido ao baixo índice de plantas infectadas em campo, observaram-se curtos períodos em pd (7,7 min) e em E1 (9,9 min) e longos em E<sub>total</sub> e E2, (138,9 min e 116,4, respectivamente) (Tabela 13). Estes dados mostram que há uma relativa facilidade de *M. persicae* transpor as camadas mais superficiais da planta para penetração e ingestão no floema. Devido a estes fatores, este cultivar se constitui em uma ótima planta hospedeira, a qual *M. persicae* coloniza melhor (Figura 17 e 18), este fato talvez explique o por quê do número reduzido de plantas infectadas por PVY observado por agricultores em campos de produção,

pois ao se fixar na planta o afídeo *M. persicae* reduziria a sua movimentação entre plantas, diminuindo assim a disseminação do PVY, que é um vírus de transmissão não persistente, transmitido por picadas de prova. Ao que parece o cultivar Jaette Bintje é o suscetível à infestação pelo pulgão, pois permite um melhor um melhor assentamento e facilidade no início da alimentação. Além disso, pode ser um cultivar mais suscetível à inoculação de vírus restritos ao floema, como é o caso *Potato leafroll vírus* (PLRV) cuja transmissão é favorecida, pois períodos mais longos do vetor em E2 (Prado & Tjallingii, 1994).

As interações envolvendo afídeos e plantas são de extrema importância ao se estudar a transmissão de fitovírus, visto que a habilidade de transmitir o patógeno esta intimamente relacionada com a atividade estiletar, morfologia do aparelho bucal e hábito alimentar do inseto vetor. Sabe-se que alguns vírus, principalmente os de transmissão não persistente, são adquiridos e inoculados de uma maneira muito rápida (segundos/minutos) não sendo necessário o vetor ultrapassar a epiderme e ou mesofilo onde os mesmos se concentram. Por outro lado, os vírus de transmissão persistente (circulativos e propagativos) geralmente necessitam de um maior período tanto para a aquisição quanto para inoculação (vários minutos/horas) por se situarem principalmente no floema das plantas (Nault, 1997), demandando do afídeo uma maior fixação na planta e um longo trabalho estiletar.

Dentro os cultivares estudados, Santè apresentou uma ampla resistência tanto à transmissão, devido ao gene de

resistência introduzido, quanto ao assentamento do afídeo vetor, não permitindo o início da alimentação, sendo detectado um grande número de provas curtas. Neste caso, o fator de resistência se encontra nas regiões mais externas do tecido vegetal; porém, se o afídeo atravessar esta barreira, poderá se alimentar no floema. Os resultados obtidos para o cultivar Santè corresponderam ao esperado, visto que se trata de um cultivar empregado como controle resistente, contudo com baixa utilização no mercado brasileiro.

O cultivar Monalisa, em contraste com a anterior é amplamente empregado nas regiões produtoras do Sudoeste paulista. Este, entre os cultivares analisados por EPG, foi o que apresentou maior resistência ao assentamento de *M. persicae* na planta, o que pode vir a provocar uma maior dispersão do vírus em campo. No entanto, deve-se levar em consideração que a população geral de afídeos nas áreas produtoras de batata inclui espécies colonizantes e não colonizantes (ou migratórias). Espécies colonizantes podem desempenhar um papel muito importante na disseminação, pois como se sabe, os vírus de transmissão não persistente possuem uma baixa especificidade de insetos vetores. Embora a eficiência de transmissão por certas espécies seja mais baixa (p. ex.: *Aphis gossypii*, Tabela 10), isto pode ser compensado por uma alta população do vetor.

Em trabalho relacionando a eficiência de alguns afídeos vetores Halbert et al. (2003) verificou que 8 espécies de afídeos não colonizantes transmitem o PVY inclusive em áreas onde o principal vetor *M. persicae* não foi encontrado. Basky (2003) encontrou uma relação significativa entre o número total de

afídeos, o número de afídeos vetores do PVY e a incidência em campos de batata semente, tendo verificado também uma maior incidência de PVY<sup>NTN</sup>, quando comparado com os demais isolados de PVY. O mesmo autor incluiu algumas novas espécies como vetoras, no entanto há poucos dados sobre a sua eficiência vetorial e verificou que quando se iniciam os vôos migratórios, o valor acumulado de intensidade vetorial é muito alto, quase alcançando o crítico, e que apenas as áreas onde foram empregadas variedades resistentes podem vir a produzir uma batata semente de boa qualidade (Basky, 2003).

Deve se salientar, que uma variedade resistente a afídeos reduz o número desses insetos que colonizam a cultura, principalmente se ocorre predominância de uma determinada espécie alvo (p. ex. *M. persicae*). Porém, se este fato não ocorre e existem outras espécies vetoras envolvidas, a variedade resistente pode não ser eficaz na redução da epidemia.

No Brasil, a principal espécie relacionada com a transmissão do PVY é *M. persicae* (Moraes, 1997; Colariccio, 1996). Assim, pode-se sugerir o emprego de um cultivar resistente que permita o assentamento de *M. persicae* (suscetível a antixenose), mas que dificulte a reprodução desta espécie (resistente em antibiose), pois se ocorrer um alto índice de reprodução, os pulgões gerariam muitos alados que se distribuiriam dentro da área cultivada e auxiliariam na dispersão do vírus. Nenhum dos cultivares testados obedeceu a estas exigências.

No caso desta relação entre PVY e *M. persicae*, há de se ressaltar as outras espécies de afídeos que não colonizam



batata, mas que poderiam disseminar o vírus, resultando na ineficácia do emprego de uma variedade resistente apenas a *M. persicae*. Nota-se, contudo, que se trata de uma área promissora, porém carente, de estudos no Brasil, onde devem ser desenvolvidos mais trabalhos de pesquisa.

**Tabela 13. Variáveis não-sequenciais observadas no monitoramento da atividade estiletar de *Myzus persicae* em cinco cultivares de batata, por 6 h, através da técnica de “Electrical Penetration Graph” (EPG).**

Variáveis EPG	Cultivares analisados						Análise estatística			
	Agata	Jaette Bintje	Monalisa	Mondial	Santê	Kruskal Wallis <sup>(1)</sup>	F	P	Andeva <sup>(2)</sup>	P
	Frequência das variáveis						P	F	P	P
np (não prova)	29,9±0,3 bc <sup>(3)</sup>	20,6±0,3ab	32,5±0,3c	22,6±0,2abc	16,7±0,3a	-	3,574	0,0130	-	-
C (prova)	28,6±0,3bc	19,5±0,3ab	30,5±0,3c	21,6±0,2abc	16,0±0,3a	0,009	-	-	-	-
C<3min	22,2±0,3c	16,4±0,3bc	22,2±0,3c	12,8±0,2ab	8,70±0,2a	-	4,984	0,0021	-	-
C antes da 1ª C > 3 min	1,5±0,1ab	0,8±0,1a	1,9±0,1ab	1,7±0,2ab	3,60±0,2b	0,346	-	-	-	-
C antes da 1ª E	7,8±0,3a	6,6±0,4a	11,6±0,4a	5,2±0,3a	11,6±0,4a	0,272	-	-	-	-
pd	175,8±0,8b	117,5±0,8a	162,9±0,4b	166,4±0,5b	85,8±0,5a	-	5,703	0,0008	-	-
E1	5,3±0,1a	4,1±0,2a	4,8±0,1a	5,9±0,2a	2,9±0,1a	0,298	-	-	-	-
E2	1,8±0,1ab	1,5±0,1ab	1,5±0,1ab	2,3±0,1b	0,7±0,06a	0,125	-	-	-	-
E2>8min	0,4±0,08a	0,9±0,06a	0,5±0,08a	0,7±0,08a	0,4±0,06a	0,250	-	-	-	-
G (gestão xilêmica)	0,4±0,06a	1,1±0,1a	0,8±0,09a	0,5±0,08a	1,0±0,1a	0,548	-	-	-	-
F (trabalho mecânico)	0,5±0,09b	0,2±0,05ab	0±0a	0,2±0,05ab	0,3±0,06ab	0,419	-	-	-	-
Duração total das variáveis										
Np	95,7±0,5ab	74,1±0,9a	128,0±0,5b	96,7±0,4ab	192,3±0,6c	-	11,752	0,0001	-	-
C	196,8±0,3b	112,1±0,7a	171,2±0,2b	174,7±0,4b	85,8±0,6a	-	14,730	0,0001	-	-
pd	12,9±0,1b	7,7±0,2a	10,6±0,1b	11,5±0,1b	6,0±0,1a	-	7,637	0,0001	-	-
E	39,6±0,7a	138,9±1,4b	38,7±1,1a	65,2±0,9ab	47,7±1,4a	-	4,798	0,0026	-	-
E1	29,9±0,5b	9,9±0,4a	13,9±0,4a	17,1±0,3ab	9,3±0,4a	-	4,818	0,0025	-	-
E2	10,4±0,7a	116,4±1,5b	24,7±1,1a	48,1±1,2a	38,4±1,5a	-	5,167	0,0016	-	-
G	7,3±0,6a	25,8±0,9a	21,2±0,8a	21,6±1,1a	20,9±1,0a	0,622	-	-	-	-
F	16,2±1,0a	6,3±0,6a	0±0a	1,5±0,2a	7,0±0,7a	0,441	-	-	-	-

<sup>(1)</sup> Resultados Kruskal Wallis, G.L.=4,087

<sup>(2)</sup> Resultados ANDEVA, G.L.= 4,087

<sup>(3)</sup> Média ± Erro Padrão (n=15) na mesma linha seguida de letras diferentes possuem diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) segundo o teste de de Fisher (MDS).

Tabela 14. Variáveis sequenciais observadas durante 6 h de monitoramento da atividade estiletar de *M.persicae* em cinco cultivares de batata, através da técnica de “Electrical Penetration Graph” (EPG).

Variáveis EPG	Cultivares analisados						Análise estatística			
	Agata	Jaette Bintje	Monalisa	Mondial	Santè	Andeva <sup>(b)</sup>	Kruskal Wallis <sup>(a)</sup>			
							P	F	P	
	Duração média das variáveis									
Np	3,82±0,15a	3,73±0,14a	4,27±0,10a	4,63±0,10a	14,69±0,32b	14,72	0,0001			
C	1,79±0,13ab	1,33±0,13ab	2,47±0,19b	0,93±0,20a	0,79±0,24a	-	0,025			
Pd	0,071±0,10b	0,064±0,23a	0,53±0,10b	0,065±0,12b	0,07±0,14a	-	0,0001			
E1	6,77±0,30b	2,25±0,15a	3,03±0,10a	3,68±0,15ab	2,45±0,17a	-	-	3,491	0,014	
E2	4,62±0,46a	96,77±1,69b	8,65±0,61a	37,84±1,29a	38,42±1,52a	-	-	4,198	0,005	
G	7,38±0,60a	15,99±0,68a	16,60±0,75a	18,80±1,06a	9,75±0,68a	-	-	-	-	
F	12,34±0,91a	6,36±0,64a	0±0a	1,59±0,28a	7,06±0,72a	-	-	-	-	
	Porcentagens(%)									
np até a 1ª E	7,80±0,39a	6,60±0,49a	11,60±0,40a	5,20±0,30a	11,60±0,46a	-	0,272			
np até a 1ª E/Tempo até E	1,14±0,04a	0,62±0,04a	0,85±0,03a	0,59±0,03a	0,82±0,01a	-	0,150			
Tempo em E2	4,36±0,10a	48,52±0,28b	10,32±0,17a	20,05±0,19a	16,00±0,24a	-	-	5,167	0,001	
	Outras variáveis									
Frequência de pd (nºpds/min)	0,48±0,02b	0,32±0,02a	0,45±0,01b	0,46±0,01b	0,23±0,01a	-	-	5,703	0,0008	
Tempo até primeira E	70,24±1,31a	89,20±1,47a	96,54±1,29a	81,08±1,35a	105,38±1,39a	-	0,767			
Tempo até a primeira E2>8min	295,25±1,36b	162,02±1,34a	296,66±0,83b	258,88±1,42ab	301,30±1,16b	-	-	2,912	0,031	
Nº de E2/Nº de E1	0,35±0,04a	0,52±0,04a	0,26±0,04a	0,45±0,09a	0,27±0,03a	-	0,241			

<sup>(1)</sup> Resultados Kruskal Wallis, G.L.=4,087

<sup>(2)</sup> Resultados ANDEVA, G.L.= 4,087

<sup>(3)</sup> Média ± Erro Padrão (n=15) na mesma linha seguida de letras diferentes possuem diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) segundo o teste de de Fisher (MDS).

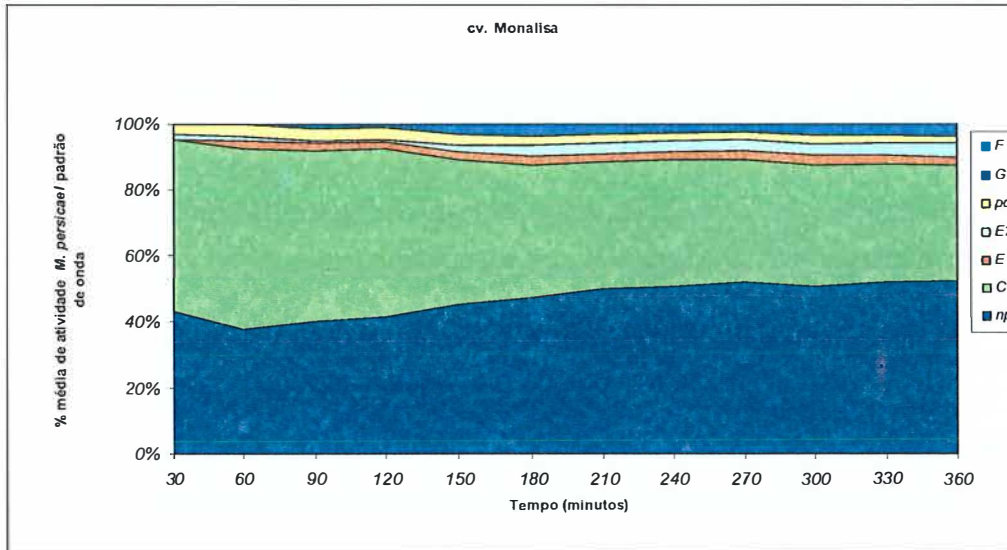


Figura 20. Porcentagem média de *Myzus persicae* em diferentes atividades e padrões de onda (EPG) durante 6 horas – cv. Monalisa

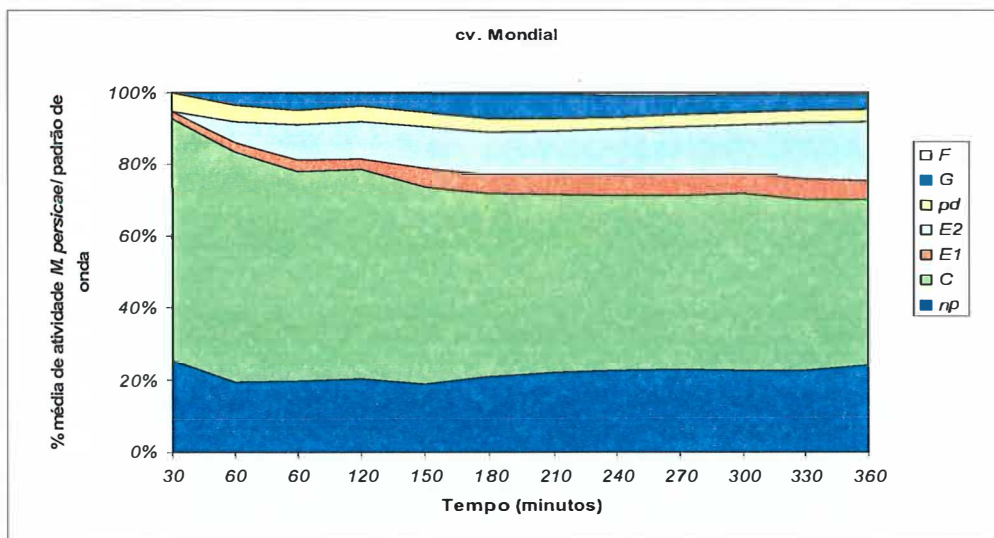


Figura 21. Porcentagem média de *Myzus persicae* em diferentes atividades e padrões de onda (EPG) durante 6 horas – cv. Mondial

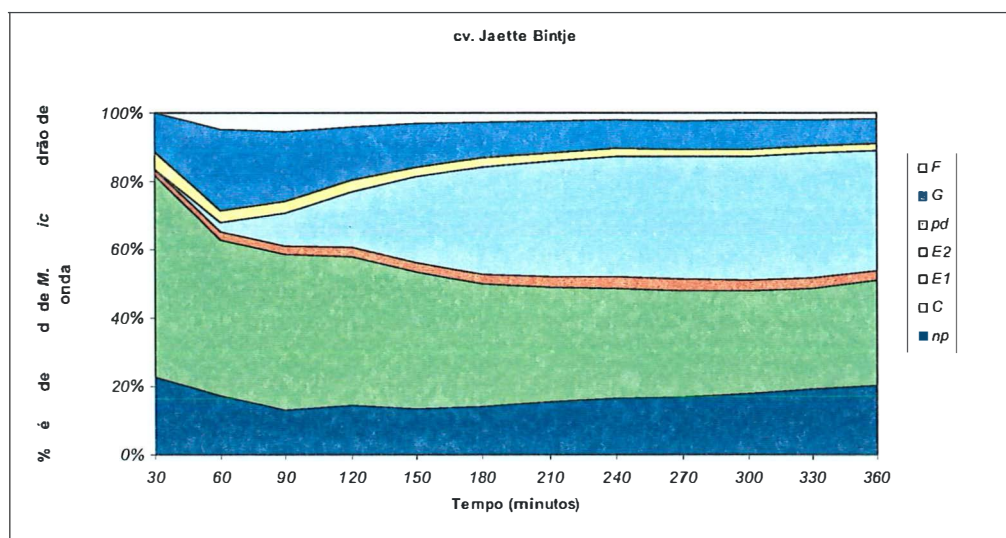


Figura 22. Porcentagem média de *Myzus persicae* em diferentes atividades e padrões de onda (EPG) durante 6 horas – cv. Agata

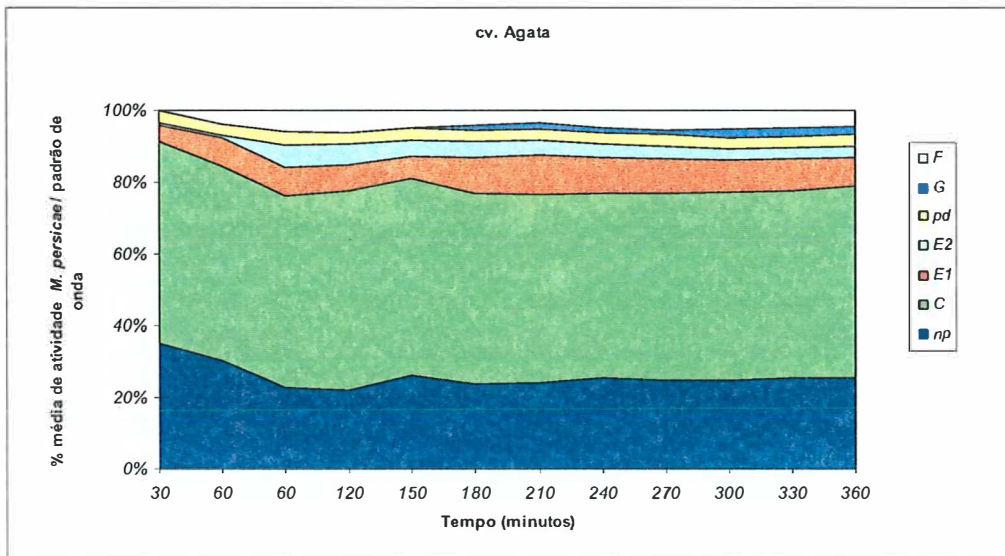


Figura 23. Porcentagem média de *Myzus persicae* em diferentes atividades e padrões de onda (EPG) durante 6 horas – cv. Jaette Bintje

#### 4.5 Avaliação de barreiras físicas para controle de afídeos vetores em plantio de batata

Analisando-se os resultados obtidos através da contagem e detecção visual de afídeos na região no talhão experimental em Paranapanema, SP, observou-se um aumento na densidade populacional de afídeos com um pico aos 71 dias após o plantio, para todos os tratamentos (Figuras 24 e 25).

Nas avaliações visuais foi constatado que, apesar de algumas diferenças significativas, o número médio insetos, inclusive de formas imaturas de afídeos, teve um crescimento gradual em todos os tratamentos até os 64 dias posteriores à montagem do experimento. No entanto, observou-se diferença na primeira contagem de formas ninfais de *M. persicae* quando

se comparou o *Novotex Agro*® - Agrotêxtil (cobertura flutuante) com os demais tratamentos.

Nas avaliações quanto à presença de adultos ápteros (Figura 24 b) houve diferença significativa apenas aos 64 dias nos quatro tratamentos, quando os três tratamentos obtiveram um relativo controle quando comparados com a incidência sobre a testemunha.

O isolamento espacial ou barreira física feita com tela plástica preta de 50 mesh (sombrite) afetou a incidência de ninfas de *M. persicae* aos 57 dias, adultos ápteros e de moscas brancas aos 64 dias. Notou-se um melhor desempenho nas fases mais avançadas da cultura onde se observou um maior número de insetos (64 dias) que possuíam uma maior mobilidade ou estavam migrando (moscas-brancas e adultos alados).

A barreira cultural (bordadura com soja *Glycine Max* cv. IAC 15) não obteve um bom desempenho, como se pode observar nas figuras 24 e 25, não havendo diferença significativa quando comparada com os demais tratamentos.

Após 71 dias, o número total de insetos foi elevado quando se empregou o agrotêxtil. Este fato pode ser explicado pela limitação imposta pela cobertura flutuante, criando um microclima favorável (Otto et al., 2001), como verificado em hortaliças de ciclo curto (Gimenez et al., 2002) como a couve chinesa (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*), a alface (*Lactuca sativa* L.) espécie onde se emprega esta metodologia em larga escala na Europa, a beterraba (*Beta vulgaris* L.) e o espinafre (*Spinacea oleracea* L.) onde também se avaliou a produtividade foliar e das raízes sobre o agrotêxtil. Outro fato que deve ser levantado é a facilidade com que o material se

decompõe ao ser submetido a aplicações seguidas de agroquímicos quando empregado na cultura de batata. Após análise do material, descobriu-se que o polipropileno, matéria prima do agrotêxtil, reage com derivados de halogênio e de cloro, reduzindo a resistência do material e permitindo com que este se rasgue permitindo a entrada de insetos.

Outro fato que reduziu a eficiência da cobertura flutuante é o manejo ao qual a cultura é submetida. É necessário esperar até o aparecimento dos primeiros folíolos emergentes, por aproximadamente 25 dias, para se realizar a amontoa, e somente após isso pode-se realizar a cobertura, permitindo a chegada e o assentamento de afídeos migratórios de outras áreas adjacentes.

Amostras coletadas durante todo o ciclo da cultura foram positivas em ELISA para o gênero *Potyvirus*, com algumas variações quanto à porcentagem de plantas infectadas (Tabela 15), o que indica, uma alta infecção inicial, provavelmente causada pelo emprego de sementes não certificadas visto que se tratava de uma área de batata para consumo.

Diversos autores citam esta fase inicial da cultura da batata como a mais suscetível em relação ao ataque por vírus, podendo justificar o alto índice de plantas infectadas, quando se coletaram amostras de plantas sintomáticas (Tabela 15) no início do ciclo vegetativo da planta. Isto pode ser explicado pela alta taxa de inóculo inicial que pode ter vindo de uma área de produção próxima, através de pulgões alados virulíferos, em vôo migratório; por áreas de reboleira deixadas da safra anterior ou mesmo pelo emprego de sementes não certificadas, visto que se tratava de uma área de batata para consumo.



Tabela 15 – Porcentagem de plantas infectadas por PVY do total de plantas sintomáticas coletadas em diferentes dias após o plantio de batata nas parcelas do experimento de controle de afídeos com barreiras físicas. Paranapanema, SP, abril-maio, 2003

<i>Tratamento/ Coleta(dias após o plantio)</i>	<i>Agrotêxtil</i>	<i>Sombrite</i>	<i>Soja</i>	<i>Testemunha</i>
<i>36 dias</i>	<i>50</i>	<i>90</i>	<i>80</i>	<i>80</i>
<i>57 dias</i>	<i>0</i>	<i>40</i>	<i>50</i>	<i>50</i>
<i>71 dias</i>	<i>20</i>	<i>20</i>	<i>0</i>	<i>10</i>
<i>Média</i>	<i>23</i>	<i>50</i>	<i>43</i>	<i>47</i>

Os experimentos envolvendo armadilhas amarelas adesivas visando monitorar a área mostraram que houve a presença de afídeos alados durante todas as coletas com um incremento verificado em épocas com baixo índice pluviométrico e temperaturas médias entre 20 e 15°C, confirmando dados de Furiatti & Almeida (1993) (Figura 25).

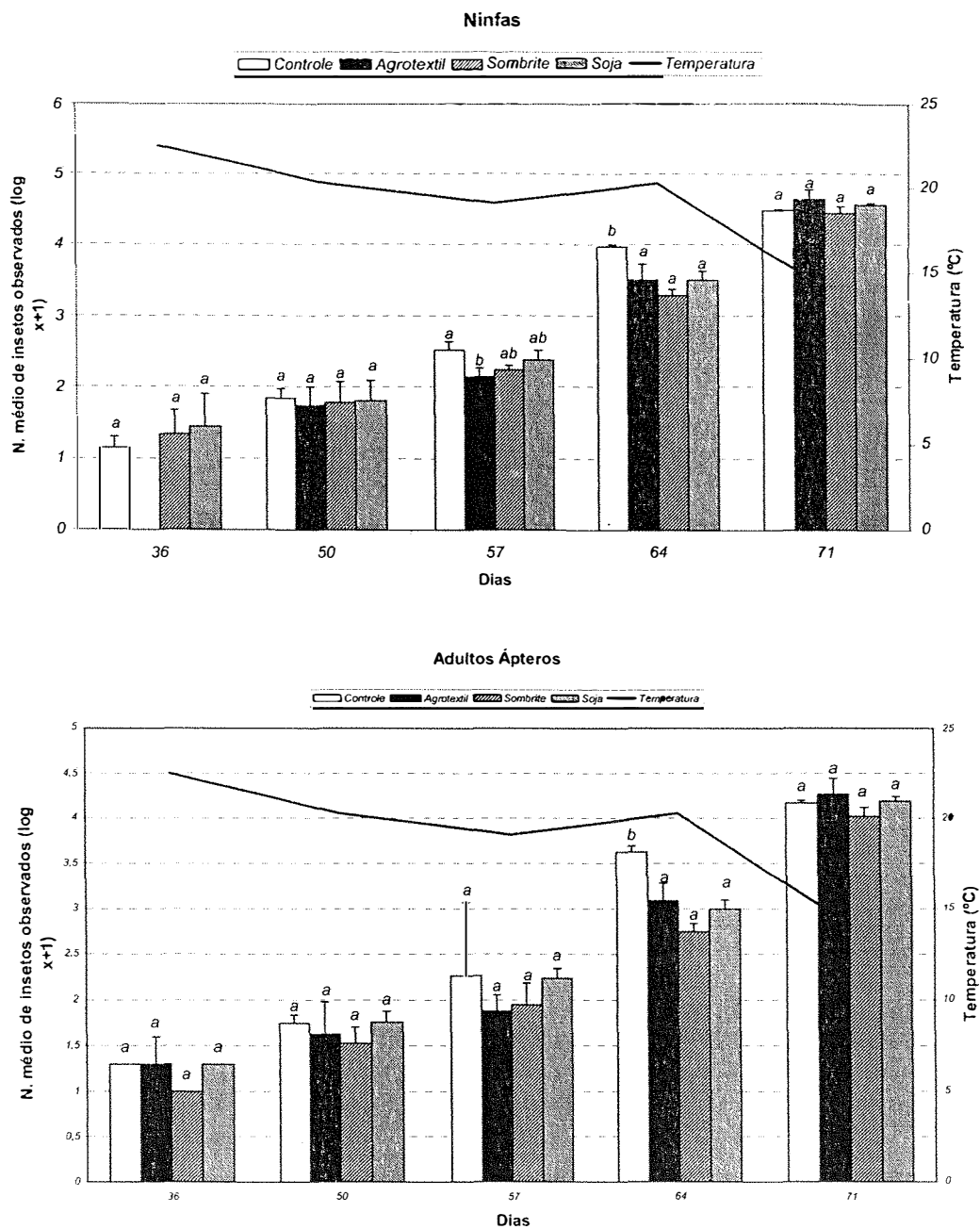


Figura 24. Número médio de indivíduos observados de *M. persicae* - ninfas-(a) adultos ápteros (b) sobre cultura de batata em Paranapanema empregando-se diferentes métodos de controle físico

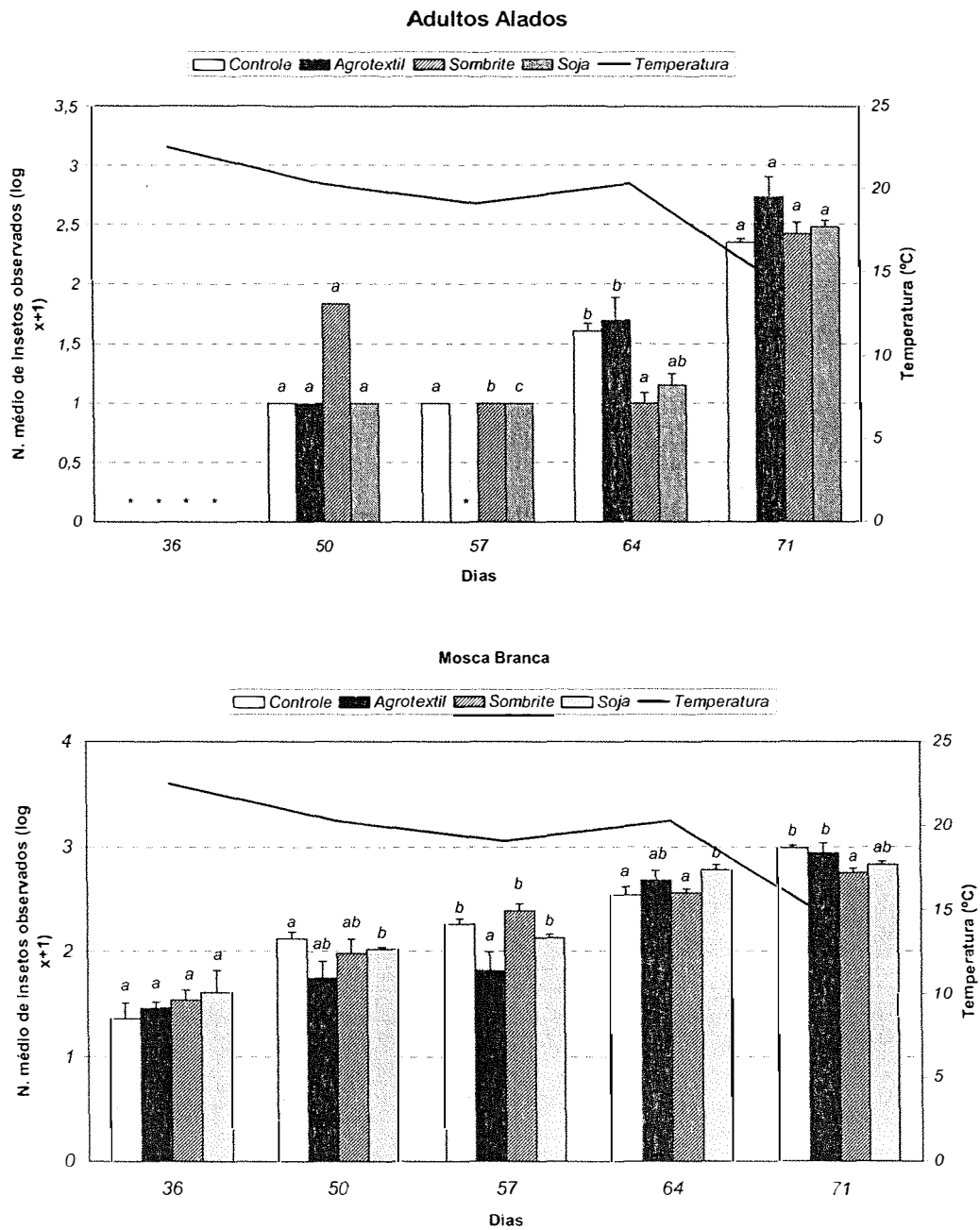
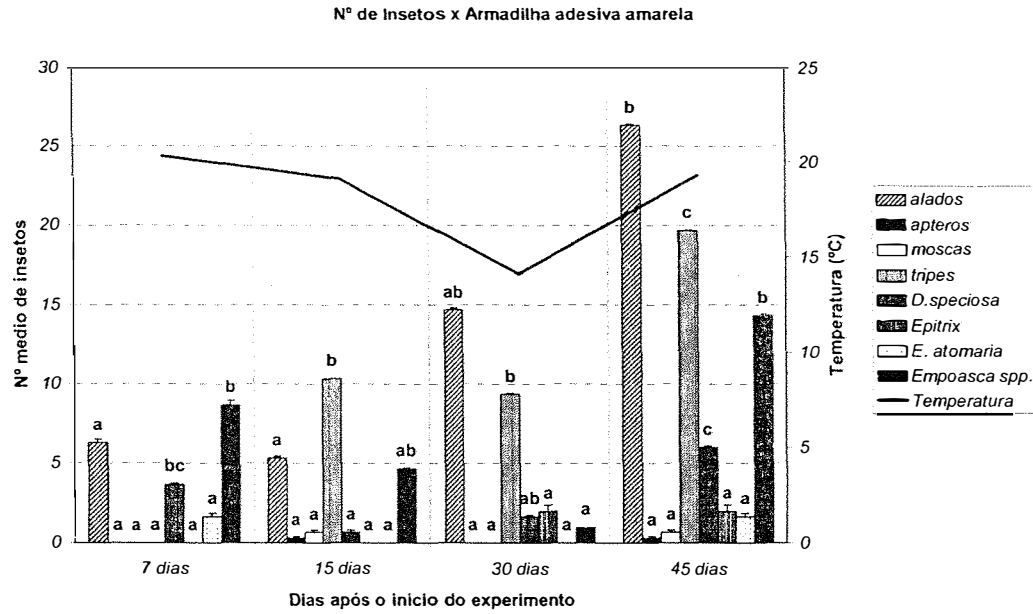


Figura 25. Número médio de indivíduos observados de *M. persicae* – adultos alados (a) e *Bemisia* spp. (b) sobre cultura de batata em Paranapanema empregando-se diferentes métodos de controle físico



**Figura 26.** Número de indivíduos coletados em armadilhas adesivas amarelas em diferentes períodos após o início do experimento em cultura de batata na safra de seca. Paranapanema, SP

## 5 CONCLUSÕES

- ✓ Quatro estirpes do vírus Y da batata (*Potato virus Y* – PVY), PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>NTN</sup> e PVY<sup>N</sup>, ocorrem em plantios comerciais da região sudoeste do Estado de São Paulo;
- ✓ O afídeo *Myzus persicae* (Sulzer) transmite as estirpes PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>NTN</sup> e PVY<sup>N</sup> com maior eficiência que *Aphis gossypii* Glover;
- ✓ O cultivar Santè apresenta resistência à transmissão por *M. persicae* das estirpes PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>NTN</sup> e PVY<sup>N</sup>, enquanto que os cultivares Ágata, Jaette Bintje, Mondial e Monalisa são suscetíveis ou moderadamente resistentes;
- ✓ O cultivar Mondial é preferido por adultos de *M. persicae* em ensaios de livre escolha incluindo os cultivares Ágata, Jaette Bintje, Monalisa e Santè;
- ✓ A taxa de crescimento populacional de *M. persicae* é mais elevada no cv. Jaette Bintje em relação ao cultivar. Monalisa;

- ✓ O estudo da atividade estiletar através da técnica de “Electrical Penetration Graph” (EPG) mostra que o cultivar Jaette Bintje é bastante adequada para a alimentação e colonização por *M. persicae*, enquanto que os cultivares Santè e Monalisa inibem o início da alimentação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABACUS CONCEPTS. **Statview II**. Berkeley, 1987.
- ABACUS CONCEPTS. **Super ANOVA**. Berkeley, 1989.
- ATREYA, C.D.; ATREYA, P.L.; THORNBURY, D.W.; PIRONE, T.P. Site-directed mutations in the potyvirus HC-Pro gene affect helper component activity, virus accumulation, and symptom expression in infected tobacco plants. **Virology**, v.191, p.106-111, 1992.
- ATREYA, C. D.; RACCAH, B.; PIRONE, T.P. A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyviruses. **Virology**, v.178, p.161-165, 1990.
- AVILLA, C.; COLLAR, J.L.; DUQUE, M; PÉREZ, P.; FERERES, A. Viabilidade de la utilización de cubiertas flotantes como método de control de virus de pimiento. **Phytoma**, v.82, p.36-40, 1996.
- BACKUS, E.A.; HUNTER, W.B. Comparison of feeding behavior of the potato leafhopper *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae) on alfafa and broad bean leaves. **Environmental Entomology**, v.18, p.473-480, 1989.
- BARRADAS, M.M. IB mantém coleção de fitovírus. **Comunicação da Pesquisa Agropecuária**, v.10, p.9, 1992.
- BARRADAS, M.M.; SILBERSCHMIDT, K.M. Conservação de vírus vegetais em tecidos secos de folhas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.40, p.375-379, 1973.

- BARRADAS, M.M.; SALAS, F.J.S.; BUITRÓN, I.P.G. Manutenção da infectividade de tymovírus em extrato de plantas. **Acta Botânica Brasílica**, v.6, p.15-26, 1992.
- BASKY, Z. The relationship between aphid dynamics and two prominent potato viruses (PVY and PLRV) in seed potatoes in Hungary. **Crop Protection**, v. 21, p. 823-827, 2002.
- BASKY, Z. Virus vector aphid activity and seed potato tuber virus infection in Hungary. **Journal of Pest Science**, v. 76, p. 83 – 88, 2003.
- BEEMSTER, A.B.R. Virus translocation and mature-plant resistance in potato plants. In: DEBOKY, A.; VANDER WANT, C. (Ed.). **Viruses of potatoes and seed-production**, Wageningen: Elsevier, 1987. p.116-125.
- BERGER, P.H.; TOLER, R.W.; HARRIS, K.F. Maize dwarf mosaic virus transmission by greenbug biotypes. **Plant Disease**, v.67, p.496-497, 1983.
- BLACKMAN, R. L.; EASTOP, V. F. Aphids on the world's crops: an identification guide. New York: John Wiley, 1984. 466 p.
- BLANCO-URGOITI, B.; TRIBODET, M.; LECLERE, S.; PEREZ DE SAN ROMAN, C.; PONZ, F.; LEGORBRU, J.; KERLAN, C. Characterization of potato potyvirus Y (PVY) isolates from seed potato batches. Situation of the NTN, Wilga and Z isolates. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, n.8, p.811-819, 1998.
- DE BOKX, J.A.; PIRON, P.M.G. Relative efficiency of a number of aphid species in the transmission of potato virus YN in the Netherlands. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.96, p.237-246, 1990.
- BOURDIN, D.; TERRADOT, L.; SIMON, J.C.; ROUZÉ, J.; TANGUY, S.; LETERME, N.; ROBERT, Y. Variation among both aphid clones and virus isolates regulate *Potato leafroll Luteovirus* transmission by vectors of the *Myzus persicae* group. In: INTERNATIONAL PLANT VIRUS EPIDEMIOLOGY SYMPOSIUM, 7., Almeria, 1999. **Abstracts**. p.53.
- BROADBENT, L. Aphid migration and the efficiency of the trapping method. **Annals of Applied Biology**, v.35, p.379-394, 1948.



- BRUNT, A.A.; CRABTREE, K.; GIBBS, A.J. **Viruses of tropical plants**. Wallingford: CAB International, 1990. 707p.
- CARTER, N.; HARRINGTON, R. Factors influencing aphid population dynamics and behavior and the consequences for virus spread. **Advances in Disease Vector Research**, v.7, p.19-51, 1991.
- CASTLE, S.J.; MOWRY, T.M.; BERGER, P.H. Differential settling by *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) on various virus infected host plants. **Annals of Entomological Society of America**, v.91, p.661-667, 1998.
- CHANG, V.C.S. Feeding activities of the sugarcane leafhopper: identification of electronically recorded waveforms. **Annals of Entomological Society of America**, v.71, p.31-36, 1978.
- CHAPMAN, R.F., BERNAYS, E.A.; SIMPSON, S.J. Attraction and Repulsion of the Aphid, *Cavariella aegopodii*, by plant odors. **Journal of Chemical Ecology**, v.7, p.881-888, 1981.
- CHEN, J. Q.; DELOBEL, B.; RAHBÉ, Y.; SAUVION, N. Biological and chemical characteristics of a genetic resistance of melon to the melon aphid. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.80, p. 250-253, 1996.
- CLARK, M.F.; ADAMS, A.M. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, v.34, p.475-483, 1977.
- COHEN, S.; MARCO, S. Reducing the spread of aphid-transmitted viruses in peppers by trapping the aphids on sticky yellow polyethylene sheets. **Phytopathology**, v.63, p.1207-1209, 1973.
- COHEN, S.; EYAL, H.; HANANIA, J. Ultrastructure, autofluorescence, callosa deposition and lignification in susceptible and resistant muskmelon leaves infected with powdery mildew fungus *Spherotheca fuliginea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.36, p.191-204. 1990.

- COLLARICCIO, A. Identificação do vírus Y da batata, estirpe comum (PVY<sup>o</sup>) em *Solanum palinacanthum* Dun. São Paulo, 1996. 110 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- CONVERSE, R.H.; MARTIN, R.R. ELISA methods for plant viruses. In: HAMPTON, R.; BALL, E.M.; DE BOER, S. (Ed.). **Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens**. St. Paul: APS Press, 1990. p. 179-196.
- COSTA, C.L. Variações sazonais da migração de *Myzus persicae* em Campinas nos anos 1967 a 1969. **Bragantia**, v.29, p.347-359, 1970.
- COSTA, C.L. Vetores de vírus de planta-1. Insetos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 6, p.103-171, 1998.
- COSTA, H.S.; ROBB, K.L.; WILEN, C.A. Field trials measuring the effects of ultraviolet-absorbing greenhouse plastic film on insect populations. **Journal of Economic Entomology**, v.95, p.113-120, 2002.
- CUPERTINO, F.P.; COSTA, C.L.; SILVA, A.M.R. Transmissão de três estirpes do vírus Y da batata por *Myzus nicotianae*. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, p.102-106, 1993.
- CUPERTINO, F.P.; COSTA, C.L.; MELO, A.B.P.; SUDO, S.; SILVA, A.M.R. Transmissão de estirpes de PVY vindas de batata, pimentão ou tomate por meio de *Myzus persicae*. **Fitopatologia Brasileira**, v.17, p.187, 1992.
- DANIELS, J. Avaliação de genótipos de batata para resistência ao vírus Y. **Horticultura Brasileira**, v.18, p.145-147, 2000.
- DANIELS, J. Incidência do vírus Y da batata (PVY) em lavouras e em lotes de tubérculos-semente de produtores de São Joaquim, SC e de Bom Jesus, RS, no período de 1995/6. In: REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DE PESQUISA E EXTENSÃO DA CULTURA DA BATATA NO RIO GRANDE DO SUL E SANTA CATARINA, 3., Santa Maria: UFSM, 1996. **Anais**. Santa Maria, p.12, 1996.
- DE BOKX, J.A.; HUTTINGA, H. Potato vírus Y. **Descriptions of Plant Viruses**, n. 242. 1981.

- DIXON, A.F.G. **Aphid ecology**. London: Chapman & Hall, 1988. 286 p.
- DORSCHNER, K.W.; KENNY, S.T. Occurrence of hop aphid phagostimulants in the honeydew of aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.65, p.49-55, 1992.
- DREYER, D.L.; CAMPBELL, B.C. Chemical basis of host-plant resistance to aphids. **Plant Cell Environment**, v.10, p.353-361, 1987.
- DUARTE, L. M. L. Efeito da infecção induzida pelo vírus X da batata no desenvolvimento e bioquímica de *Datura stramonium* L. São Paulo, 1997. 93p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- DUNN, J.A. The colonization by *Cavariella aegopodii* Scop. of carrot plants. **Environmental Entomology**, v.22, p.1260-1265, 1969.
- EDWARDS, P.J.; WRATTEN, S.D. **Ecologia das interações entre insetos e plantas**. São Paulo: E.P.U. EDUSP, 1981. 71p.
- ELLIS, P.; STACE-SMITH, R.; VILLIERS, G. Identification and geographic distribution of serotypes of potato virus Y. **Plant Disease**, v.81, p.481-484, 1997.
- FEBVAY, G., RAHBE, Y.; VAN HELDEN, M. MacStylet, software to analyse electrical penetration graph data on the Macintosh. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.80, p.105-108, 1996.
- FERERES, A. Caracterización de la resistencia de germoplasma de melón al pulgón *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). **Investigación Agrícola**, v.2, p.75-78, 1994.
- FERERES, A.; COLLAR, J.L. Electrical analysis of non-circulative virus transmission. In: INTERNATIONAL PLANT VIRUS EPIDEMIOLOGY, 7. Almería: Aguadulce, 1999. p.33.

- FERERES, A.; PONZ, J.L.S. SIDIPVY: una aplicación informática que permite la simulación de una epidemia y las pérdidas de cosecha producidas por el virus PVY en cultivo de pimiento al aire libre. **Phytoma**, v.138, p.67-71, 2002.
- FERERES, A.; PEREZ, P.; GAMENO, C.; PONZ, F. Transmission of Spanish pepper-PVY isolates by aphid vectors: epidemiological implications. **Environmental Entomology**, v.22, p.1260-1265, 1993.
- FIGUEIRA, A.R. Viroses da batata e suas implicações na produção de batata-semente no estado de Minas Gerais: histórico do problema e soluções. **Summa Phytopathologica**, v.21, p.268-269, 1995.
- FIGUEIRA, A.R.; PINTO, A.C. Estirpes necróticas do vírus Y da batata em sementes importadas está causando problemas ao bataticultor mineiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.299, 1995.
- FIGUEIRA, A.R.; PINTO, A.C.S.; MORAES, F.H.R. Alta incidência da nova estirpe necrótica do vírus Y da batata está ocorrendo em todos os estados produtores do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.425, 1996.
- FIGUEROA, C.C.; KOENIG, C.; ARAYA, C.; SANTOS, M.J.; NIEMEYER, H.M. Effects of dimboa, a hydroxamic acid from cereals, on peroxisomal and mitochondrial enzymes from aphids: evidence for the presence of peroxisomes in aphids. **Journal of Chemical Ecology**, v.25, p.2465-2475, 1999.
- FORBES, A.R. The morphology and fine structure of the gut of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae). **Memorials of the Entomological Society of Canada**, v. 36, p. 1-74, 1969.
- FURIATTI, R. S.; ALMEIDA, A. A. Flutuação da população dos afídeos *Myzus persicae* (Sulzer, 1778) e *Macrosiphum euphorbiae* (THOMAS, 1878) (HOMOPTERA, APHIDIDAE) e sua relação com a temperatura. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 37, p. 821 – 826, 1993.
- GABRYS, B., TJALLINGII, W. F. Y VAN BEEK, T. A. Analysis of EPG recorder probing by cabbage aphid on host plant parts with different glucosinolate contents. **Journal of Chemical Ecology**, 23, p. 1661-1673, 1997.

- GAMEZ, R.; WATSON, M.A. Failure of anesthetized aphids to acquire or transmit henbane mosaic virus when their stylets were artificially inserted into leaves of infected or healthy tobacco plants. **Virology**, v. 22, p. 539 - 547, 1964.
- GÁRZO, E.I.G. Selección y caracterización de germoplasma de melón resistente a *Aphis gossypii* (Glover) y a los virus que transmite. Madrid, 2002. 201p. Tesis (Doctoral). Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid.
- GIANOLI, E. Y NIEMEYER, H.M. Characteristics of hydroxamic acid induction in wheat triggered by aphid infestation. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, p. 2695-2705, 1997.
- GIBSON, R.W. Glandular hairs providing resistance to aphids in certain wild potato species. **Annals of Applied Biology**, v. 68, p.113 – 119, 1971.
- GIBSON, R.W. & PICKET, J.A. Wild potato repels aphids by release of aphid alarm pheromone. **Nature**, v. 302, p. 608 - 609, 1983.
- GIBSON, R.W.; RICE, A.D. Modifying aphid behavior. In: MINKS, A.K.; HARREWIJN, P. (Ed.) **World crop pests: aphids**. Elsevier Science, Amsterdam, 1989. v. 2C: p. 209-224.
- GIMENEZ, C.; OTTO, R.F.; CASTILLA, N. Productivity of leaf and root vegetable crops under direct cover. **Scientia Horticulturae**, v. 94, p. 1–11, 2002.
- GOMEZ, A.M.; CALVACHE, D; LLORIS, V. Control de virosis en tomate mediante la utilización de cubierta flotante. **Horticultura**, v. 63, p. 86–90, 1990.
- GOVIER, D.A.; KASSANIS, B. Evidence that component other than the virus particle is needed for aphid transmission of potato virus Y. **Virology**, v. 35, p. 597 – 600, 1974.
- GULDEMOND, J.A.; TIGGES, W.T.; DE VRIEJER, P.W.F. Host races of *Aphis gossypii* on cucumber and chrysanthemum. **Environmental Entomology**, v.23, p. 1235-1240. 1994.

- HALBERT, S.E.; CORSINI, D.L.; WIEBE, M.A. Potato virus Y transmission efficiency for some common aphids in Idaho. **American Journal of Potato Research**, v. 80, p. 87–91, 2003.
- HARREWIJN, P. Integrated control of potato aphids. In: MINKS, A.K.; HARREWIJN, P. (Ed.) **Aphids their biology, natural enemies and control**. Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 279-284.
- HARREWIJN, P.; DEN OUDEN, H.; PIRON, P.G.M. Polymer webs to prevent virus transmission by seed potatoes. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 58, p. 101–107, 1991.
- HARRINGTON, R.; GIBSON, R.W. Transmission of potato virus Y by aphids trapped in potato crops in southern England. **Potato Research**, v. 32, p. 167–174, 1989.
- HARRIS, K.F. An ingestion-egestion hypothesis of noncirculative virus transmission. In: HARRIS, K.F.; MARAMOROSCH, K. (Ed.). **Aphids as virus vectors**. New York: Academic Press, 1977. p. 165-220.
- HEATHCOTE, G.D. Cultural factors affecting colonization of sugar beet by different aphid species. **Annals of Applied Biology**, v. 63, p. 330-331, 1969.
- HERRBACH, E. Alarm pheromones and allelochemicals as a means of aphid control. **Netherland Journal of Plant Pathology**, v. 98, p. 63-71, 1992.
- HODKINSON, I.D. & HUGHES, M.K. **La fitofagia en los insectos**. Barcelona: Oikos-Tau, 1993. 99p.
- HOLBROOK, F.R. Aldicarb and thiofanox: effect on the feeding activity of green peach aphids. **Journal of Economic Entomology**, v.70, p. 742-744, 1977.
- HOLLINGS, M.; BRUNT, A.A. **Potyvirus group**. London: Commonw. Mycol. Inst.; Asso. Appl. Biol. 7p. (Description of Plant Viruses, 245), 1981.

- HOPKINS, R.J.; EKBOM, B.Y.; HENKOW, L. Glucosinolate content and susceptibility for the insect attack of tree populations of *Sinapis alba*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, p. 1203-1216, 1998.
- IRWIN, M.E.; RUESINK, W. G. Vector intensity: a product of propensity and activity. In: MACLEAN, G.D.; GARRET, R.G.; RUESINK, W.G. (Ed.). **Plant virus epidemics: monitoring, modeling and predicting outbreaks**, New York: Academic Press, 1986. p. 13-33.
- JANE, E.B.; BINTCLIFFE, B.; WRATTEN, S.D. Antibiotic resistance in potato cultivars to the aphid *Myzus persicae*. **Annals of Applied Biology**, v.100, p. 383-391, 1982.
- JANSON, R.K.; SMILOWITZ, Z. Influence of nitrogen on population parameters of potato insects: abundance, population growth, and within-plant distribution of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Homoptera : Aphididae). **Environmental Entomology**, v.15, p. 49 - 56, 1986.
- KENNEDY, J.S. The host plant in relation to insect behaviour and reproduction. **Plenum**, v. 121 - 123, 1976.
- KENNEDY, J.S.; FOSBROOKE, I.H.M. **The plant in the life of an aphid: insect/plant relationships**. Blakwell: Oxford. 1972. (Symposia of the Royal Entomological Society of London, 6).
- KENNEDY, J.S.; BOOTH, C.O.; KERSHAW, W.J.S. Host finding by aphids in the field. III. Visual attraction. **Annals of Applied Biology**, v. 49, p. 1-21, 1961.
- KENNEDY, J.S.; DAY, M.F.; EASTOP, V.F. **A conspectus of aphids as vectors of plant viruses**. London: Commonwealth Institute Entomology, 1962. 114p.
- KIMMINS, F.M.; TJALLINGII, W.F. Ultrastructure of sieve element penetration by aphid stylets during electrical recording. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 39, p. 135 - 141, 1985.
- KITAJIMA, E.W. (Org.) Lista de publicações sobre viroses e enfermidades correlatas de plantas no Brasil (1911 - 1985). **Fitopatologia Brasileira**, supl. especial, 1986.

- KITAJIMA, E.W. (Org.) Lista de publicações sobre viroses e enfermidades correlatas de plantas no Brasil (1986 - 1993). **Fitopatologia Brasileira**, supl. especial, 1995.
- KLINGAUF, F. A. Host plant finding and acceptance. In: MINKS, A.K.; HARREWIJN, P. (Ed.) **Aphids their biology, natural enemies and control**. Amsterdam, Elsevier, 1987. p. 209 - 223.
- KLINGAUF, F.A. Feeding, Adaptation and Excretion. In: MINKS, A.K.; HARREWIJN, P. (Ed.). **World Crop Pests: Aphids**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1989. p. 225-248.
- KLINGLER, J.; POWELL, G.; THOMPSON, G.A.Y.; ISAACS, R. Phloem specific aphid resistance in *Cucumis melo* line AR5: effects on feeding behaviour and performance of *Aphis gossypii*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 86, p. 79-88, 1998.
- KLOPPER, J.W.; TUZUN, S.; KUC, J. Proposed definitions related to induced disease resistance. **Biocontrol Science and Technology**, v.2, p. 349-351. 1992.
- KOENIG, R. Indirect ELISA for the broad specificity detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, v. 55, p. 53, 1981.
- KOGAN, M. **Ecological theory and integrated pest management**. New York: John Wiley, 1986. 362p.
- KOGAN, M. Natural chemicals in plant resistance to insects. **Iowa Journal of Research**, v. 60, p. 501 – 527, 1986.
- KOGAN, M.Y; PAXTON, J. Natural inducers of plant resistance to insects. In: HEDIN, P.A. (Ed.). **Plant resistance to insects**. Washington: American Chemical Society, 1983. p. 154-171.
- KRAMER, M. A degenerescência e a defesa da cultura da batatinha. **O Biológico**, v.5, p. 265 - 272, 1939.



- LA POINTE, S.L.; TINGEY, W.M. Feeding response of the green peach aphid (Homoptera: Aphididae) to potato glandular trichomes. **Journal of Economic Entomology**, v. 77, p. 386 - 389, 1984.
- LARA, F.M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. São Paulo: Ícone, 1991. 336p
- LECOQ, H.; PITRAT, M. Resistencia a virus transmitidos por pulgones em cultivos horticolas. In: GÓMEZ, I.M.C (Ed.). **Tendencias actuales sobre epidemiologia de virus de plantas**. Almeria: Gutenberg, 1999. p. 93 – 111.
- LEVIN, D.A. The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. **Annual Review Ecological Systematic**, v. 7, p. 121 - 159, 1976.
- LOURENÇO, A.; PINTO, J. Os níveis populacionais de afideos nas Searas do Alentejo anos de 1981 e 1982. **Agronomia Luzitana**, v. 43, p. 81 – 87, 1988.
- MARTÍN, B.; COLLAR, J.L.; TJALLINGII, W.F.; FERERES, A. Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. **Journal of General Virology**, v.78, p. 2701-2705, 1997.
- MATTHEWS, R.E.F. **Plant virology**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1991. 1001 p.
- MCLEAN, D.L.; KINSEY, M.G.A technique for electronically recording aphid feeding and salivation. **Nature**, v. 202, p. 1358-1359, 1964.
- MCLEAN, D.L.; KINSEY, M.G. Identification of electrically recorded curve patterns associated with aphid salivation and ingestion. **Nature**, v. 205, p. 1130-1131, 1965.
- MIHOVILOVICH, E.; SALAZAR, L.; F. SAGUMA; BONIERBALE, M.W. Survey of the durability of extreme resistance to PVY derived from *Solanum tuberosum* subsp. Andigena. **CIP Program Report (1997 – 1998)**, p. 123 – 128, 1998.

- MONTLLOR, C.B. The influence of plant chemistry on aphid feeding behavior. In: BERNAYS, E. (Ed.). **Insect-Plant Interactions**. London:CRS Press, 1991. p. 125-173.
- MORAES, F.H.R. Caracterização de isolados do vírus Y ("Potato virus Y" – PVY) provenientes de batata no Brasil. Lavras, 2003. 124 p. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Lavras.
- MORAES, F.H.R. Estudo comparativo de algumas propriedades biológicas de cinco isolados do vírus Y da batata ("Potato virus Y"- PVY). Lavras, 1997. 87p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Lavras.
- NATWICK, E.T.; DURAZNO, A. Polyester covers protect vegetables from whiteflies and virus disease. **California Agriculture**, v. 39, p. 21 – 22, 1985.
- NAULT, L.R. Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. **Annals of Entomological Society of America**, v. 90, p. 1–21, 1997.
- NOTTINGHAM, T.I.; STEPHEN, F.; HARDIE, J. Flight behaviour of the black bean aphid, *Aphis fabae*, and the cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae*, in host and non-host plant odour. **Physiological Entomology**, v. 18, p. 389-394, 1993.
- ORLANDO, A.; SILBERSCHMIDT, K. Estudos sobre a transmissão da doença de vírus de solanáceas "necrose das nervuras" por afídeos e algumas relações entre esse vírus e seu principal vector. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.16, p. 133 – 152, 1945.
- OTTO, R.F.; GIRALDEZ, J.V.; GIMENEZ, C.; PEREIRA, A.B. Modification of the termal regime of soil-plant systems Ander nonwoven polypropylene and external conditions. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 76, p. 216 – 223, 2001.
- PERRING, T., ROYALTY, R. Y FARRAR, C. Floating row covers for the exclusion of virus vectors and the effect on disease incidence and yield of cantaloupe. **Journal of Economic Entomology**, v.82, p. 1709-1715. 1989.
- PICKETT, J.A.; WADHAMS, L.J.; WOODCOCK, C.M.; HARDIE, J. The chemical ecology of aphids. **Annual Review of Entomology**, v.37, p. 67 – 90, 1992.

- PIERCE, W.H. The identification of certain viruses affecting leguminous plants. **Journal of Agricultural Research**, v. 51, p. 1017 – 1039, 1935.
- PINTO, C.A.B.P. Cultivares de batata resistentes a viroses. **Batata Show**, v. 3, p. 11. 2003.
- PIRONE, T.P.; BLANC, S. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, p. 227 - 247, 1996.
- PIRONE, T.P.; THORNBURY, D.W. Role of virion and helper component in regulating aphid transmission of tobacco etch virus. **Phytopathology**, v. 73, p. 872 – 875, 1983.
- PIRONE, T.P.; WANG, R.Y. Potyvirus transmission by aphids: virion-helper component-stylect interactions, p.34, In: INTERNATIONAL PLANT VIRUS EPIDEMIOLOGY SYMPOSIUM, 7., Almeria: Aguadulce. **Abstracts**, Almeria, 1999, 193p.
- POWELL, G.; PIRONE, T.; HARDIE, J. Aphid stylet activities during potyvirus acquisition from plants and an in vitro system that correlate with subsequent transmission. **European Journal of Plant Pathology**, v. 101, p. 411 – 420, 1995.
- PRADO, E. Aphid-plant interactions at phloem level, a behavioural study. Wageningen, 1997. 110p. Tese (Doutorado) – University of Wageningen.
- PRADO, E.; TJALLINGII, W.F. Aphid activities during sieve element punctures. **Entomological Experimentalis et Applicata**, v. 72, p. 157-165, 1994.
- RAHBÉ, Y.; FEBVAY, G.; DELOBEL, B.; BONNOT, G. Aminoacids and proteins as cues in interactions of aphids (Homoptera: Aphididae) and plants. In: WALKER, G.P. Y BACKUS, E.A. (Eds.). **Principles and Applications of Electronic Monitoring and Other Techniques in the Study of Homopteran Feeding Behavior**. Lanham: Entomological Society of America, 2000. p. 212-236.
- RAMAN, K.V.; TINGEY, W.M.; GREGORY, T. Potato glycoalkaloids: effect on survival and feeding behavior of the potato lefhopper. **Journal of Economic Entomology**, v. 72, p. 337 - 341, 1979.

- ROBERT, T.; WOODFORD, J.A.T.; DUCRAY-BOURDIN, D.G. Some epidemiological approaches to the control of aphid-borne virus diseases in seed potato crops in northern Europe. **Virus Research**, v. 71, p. 33 – 47, 2000.
- ROBERT, Y.; ROUZÉ-JOUAN, J. Recherches écologiques sur les pucerons *Aulacortum solani* Kltb., *Macrosiphum euphorbiae* Thomas et *Myzus persicae* Sulz. Dans l'ouest de la France. I.- Etude de l'activité de vol de 1967 à 1976 en culture de pomme de terre. **Annual Zoological Ecology Animal**, v. 10, p. 171 – 185, 1978.
- ROBERT, Y.; WOODFORD, J.A.T.; DUCRAY-BOURDIN, D.G. Some epidemiological approaches to the control of aphids-borne virus diseases in seed potato crops in northern Europe. **Virus Research**, v. 71, p. 33-47, 2000.
- RYBICKI E.P.; VON WECHMAR, M.B. The serology of the Bromoviruses, 1. Serological interrelationships of the Bromoviruses. **Virology**, v. 109, p. 309, 1981.
- SALAS, F.J.S Controle de insetos vetores de vírus em hortaliças. In: REUNIÃO INTINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO. 4., Ribeirão Preto: Instituto Biológico, **Anais**, Ribeirão Preto, 2001. p.162-166.
- SALAS, F.J.S.; BARRADAS, M.M. Transmissão de potyvirus por afídeos através da técnica de aquisição por membrana utilizando-se material foliar desidratado. **Ecossistema**, v.24, p.88-92, 1999.
- SALAS, F.J.S.; CHAVES, A.L.R.; STARIKOFF, N.R.; BARRADAS, M.M. Transmissão de três fitovírus pelo afídeo *Myzus persicae*. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 6., São Paulo: Instituto Biológico. **Anais**, São Paulo, 1993, p.34.
- SALAS, F.J.S; LOPES, M.V.F.; BARRADAS, M.M. The use of leaf disc local lesion test in the study of plant virus transmission. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY. 11., Foz do Iguaçu: EMBRAPA, Foz do Iguaçu, 2000. p. 817.

- SANFORD, L.L.; SLEESMAN, J.P. Genetic variation in a population of tetraploid potatoes: response to the potato leafhopper and potato flea beetle. **American Potato Journal**, v. 47, p. 19 – 34, 1970.
- SCHOONHOVEN, L.M.; DERKSEN-KOPPERS, I. Effects of some allelochemics on food uptake and survival of a polyphagous aphid, *Myzus persicae*. **Entomological Experimentalis et Applicata**, v. 19, p.52-56, 1976.
- SHINODA, T. Callose reaction induced in melon leaves by feeding of melon aphid, *Aphis gossypii* Glover, as possible aphid-resistant factor. **Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology**,v. 37, p. 145-152, 1993.
- SIEGEL, S. **Nonparametric statistic for the behavioral sciences**. New York: McGraw-Hill, 1956. 309p.
- SILBERSCHMIDT, K. A produção no Brasil de tubérculos-sementes de batatinhas como um problema de máxima urgência. **O Biológico**, v.5, p. 215 - 220, 1939a.
- SILBERSCHMIDT, K. Virus diseases of potatoes in Brazil. In: SILBERSCHMIDT, K (Ed.). Virus diseases of plants, São Paulo: Instituto Biológico, 1939b. p. 104 - 105.
- SILBERSCHMIDT, K. A degenerescência da batatinha.**O Biológico**, v.3, p. 247-254, 1937.
- SILBERSCHMIDT, K.; KRAMER, M. O vírus Y, uma das principais causas da degenerescência da batatinhas no estado de São Paulo. **O Biológico**, v.8, p. 39 – 47, 1942.
- SOUZA DIAS, J.A.C. Viroses de batata e suas implicações na produção de batata-semente no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.21, p. 264-266, 1995.
- SOUZA DIAS, J.A.C.; TRISTÃO, J.F. Rise of PVY incidence in seed-potato regions of São Paulo State (Brazil) associated with the introduction of “Atlantic” potatoes. **American Potato Journal**, v. 74, p. 469, 1997.

- STEIN, C.P. Resistência de cultivares de *Solanum tuberosum* e de híbridos de *S. tuberosum* x *S. berthaultii* a *Myzus persicae* (Sulzer), *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard), *Phthorimaea operculella* (Zeller) e pragas de solo. Piracicaba, 1998. 73 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- SWAIN, T. Secondary compounds as protective agents. **Annual Review of Plant Physiology**, v.28, p.479 - 501, 1977.
- TARN, T.R.; ADAMS, J.B. Aphid probing and feeding, electronic monitoring, and plant breeding. In: HARRIS, K.F.; MARAMOROSCH, K. (Ed.). **Pathogens, vectors and plant diseases**. New York: Academic Press, 1982. p. 110-126.
- TINGEY, W.M. Glycoalcaloids as pest resistance factors. **American Potato Journal**, v. 61, p. 157 – 167, 1984.
- TJALLINGII , W.F. Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. **Entomological Experimentalis et Applicata**, v. 38, p. 177-186, 1985.
- TJALLINGII, W. F.; HOGENESCH, T.H. Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. **Physiological Entomology**, v 18, p. 317 - 328, 1993.
- TJALLINGII, W.F. Continuous recording of stylet penetration activities by aphids. In: CAMPBELL, R. K.; EIKENBARY, R. D. (Ed.). **Aphid-plant genotype interaction**. Amsterdam: Elsevier, 1990. p. 89-99.
- TJALLINGII, W.F. Electronic recording of penetration behaviour by aphids. **Entomological Experimentalis et Applicata**, v. 24, p. 721-730, 1978.
- TRESH, J.M. The origins and epidemiology of some important plant virus diseases. **Applied Biology**, v. 5, p. 1 – 65, 1980.

- VAN HELDEN, H.; TJALLINGII, F. Experimental design and analysis in EPG experiments with emphasis on plant resistance research. In: WALKER, G.P.; BACKUS, E.A. (Ed.). **Principles and monitoring and other techniques in the study of homopteran feeding behavior**. San Diego: Entomological Society of America, 2000. p. 145–171.
- VAN HELDEN, M.Y.; TJALLINGII, W.F. Tissue localisation of lettuce resistance to the aphid *Nasonovia ribisnigri* using electrical penetration graphs. **Entomological Experimentalis et Applicata**, v. 68, p. 269-278, 1993.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. **Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses**. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2000. 1162p.
- VINCENT, C.; HALLMAN, G.; PANNETON, B.; FLEURAT-LESSARD, F. Management of agricultural insects with physical control methods. **Annual Review of Entomology**, v. 48, p. 261 – 281, 2003.
- VISSER, J.H.; TAANMAN, J.W. Odour-conditioned anemotaxis of apterous aphids (*Cryptomyzus korschelti*) in response to host plants. **Physiological Entomology**, v. 12, p. 473-479, 1987.
- WALKEY, D.G.A. **Applied Plant Virology**, San Diego: John Wiley, 1985. 329p.
- WATSON, M.A. The specificity of transmission of some non persistent viruses In: **International Congress of Entomology**, 10., Florida: USDA. **Proceedings**, Florida, 1958. p. 215–219.
- WEBB, S. E.; LINDA, S.B. Evaluation of spunbonded polyethylene row covers as a method of excluding insects and viruses affecting fall-grown squash in Florida. **Journal of Economic Entomology**, v. 85, p. 2344 – 2352, 1992.
- WHALON, M.E.; SMILOWITZ, Z. Temperature-dependent model for predicting field populations of green peach aphid, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). **The Canadian Entomologist**, v. 111, p. 1025 – 1032, 1979.

- WHITE, T.C.R. The abundance of invertebrate herbivories in relation to the availability of nitrogen in stressed food plants. **Oecologia**, v. 63, p. 90 – 105, 1984.
- WINER, B.J.. Statical principles in experimental design. 2. ed. New York: McGraw-Hill, 1971. 378p.
- YARWOOD, C.E. The phosphate effect in plant virus inoculations. **Phytopathology**, v.42, p.137 – 143, 1952.
- YARWOOD, C.E. Sulfite in plant virus inoculations. **Virology**, v.39, p.74–78, 1969.
- YATES, F. The analysis of multiple classifications with unequal numbers in the different classes. **Journal of American Statistical Association**, v. 29, p. 51-66, 1934.
- ZERBINI, F.M.; ZAMBOLIM, E.M. A família *Potyviridae*-Parte I. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.7, p.1-66,1999.