

Incidência do vírus do Mosqueado Plumoso em coleção de batata-doce e cultura de Meristema para obtenção de clones sadios

Josélia Oliveira MARQUES¹, Gilvan PIO-RIBEIRO², José Barbosa CABRAL³, Lauren Michelle HOLLOU-KIDO⁴

RESUMO: Cultivares de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) da coleção de germoplasma da Empresa Pernambuco de Pesquisa Agropecuária foram indexadas através de enxertia em *I. setosa* Ker. e pelo teste "direct antigen coating enzyme-linked immunosorbent assay" (DAC-ELISA), utilizando anti-soro contra o vírus do mosqueado plumoso da batata-doce (SPFMV). Os resultados revelaram que 31 das 33 cultivares indexadas estavam infectadas pelo SPFMV. Visando a obtenção de clones sadios deste material, meristemas com 0,2 a 0,3mm, foram cultivados em um meio de cultura base (M1), contendo os sais de MS, suplementados com tiamina (2,0mg/l), mio-inositol (100mg/l), BAP (1,0mg/l), ANA (0,01mg/l), GA₃ (0,1mg/l), PVP 40 (40mg/l) e sacarose (30g/l). Na tentativa de se alcançar um melhor desenvolvimento dos meristemas "in vitro" foi testado, em 10 cultivares, o acréscimo ao meio base de 100mg/l de arginina em combinação com 20 ou 60mg/l de putrescina (meios M2 e M3, respectivamente). Avaliações feitas durante 34 dias de cultivo, analisadas pelo teste de Tukey, indicaram que a adição destas substâncias não diminuiu a formação de calos, nem melhorou a regeneração de plântulas, sendo ainda, na concentração elevada (M3), inibitória ao crescimento da parte aérea. O material regenerado "in vitro" foi indexado pelos testes DAC-ELISA e enxertia em *I. setosa*, observando-se reação negativa em 60,32% dos clones testados. Pela cultura de meristemas foi possível obter clones sadios das cultivares Angico, Balão Roxo, BR 05, Branca da Serra, Branca de Talo Roxo, CO Branca, CO Copinha, CR 06, Olho de Urubu, Paulistinha, Rainha, Rainha de Penedo, Rainha da Praia, São Paulo e Talo Roxo.

Palavras-chave: batata-doce, SPFMV, meristema, ELISA

INTRODUÇÃO

A batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) é a segunda hortaliça em volume de produção (FAO, 1994), sendo cultivada em praticamente todos os países de clima tropical, sub-tropical e em algumas regiões temperadas (Clark e Moyer, 1988). No Brasil é produzida em vários Estados e, embora apresente características de cultura de subsistência, são plantados mais de 67.000ha, com um rendimento médio de 10,2t/ha (Anuário Estatístico do Brasil, 1994). Sua produção é pouco exigente em investimentos financeiros e apresenta também poucos riscos agrônômicos, pela sua conhecida rusticidade. Estas condições fazem com que o produto seja acessível a todas as faixas da população, inclusive àquelas de menor poder aquisitivo (Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro - EMATER - RIO, 1989.).

As doenças de etiologia viral em batata-doce são particularmente importantes, uma vez que esta espécie é propagada vegetativamente, o que tende a aumentar a incidência de vírus durante os sucessivos cultivos, resultando numa significativa queda de produção (Pozzer et al., 1994). Dentre os vírus

que infectam naturalmente esta cultura, o vírus do mosqueado plumoso da batata-doce (SPFMV) é o mais comumente encontrado em todo o mundo, ocorrendo em todas as regiões onde se cultiva esta hortaliça (Clark e Moyer, 1988).

Cultura de meristemas, associado ou não à quimio e termoterapia, têm sido empregadas na obtenção de plantas de batata-doce livre de vírus, a partir de plantas infectadas (Alconero et al., 1975; Gama, 1988) o que possibilita uma multiplicação massal de mudas sadias para iniciar a cultura, resultando em ganhos significativos na produção.

Este trabalho teve por objetivo verificar a incidência do SPFMV na coleção de batata-doce da Empresa Pernambuco de Pesquisa Agropecuária (IPA) e obtenção de material livre de vírus através do cultivo de meristemas apicais, não associado a tratamento térmico ou químico.

MATERIAL E MÉTODO

Os testes foram realizados em 33 cultivares de batata-doce da coleção de germoplasma do IPA, mantidas em condições de casa-de-vegetação. Visando determinar a

¹ Bolsista de Aperfeiçoamento de Atividades de Pesquisa -CNPq - IPA

² Bolsista do CNPq

³ Pesquisador da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária -IPA

⁴ Bolsista de Desenvolvimento Técnico Regional - CNPq - IPA

incidência do SPFMV, de ocorrência já registrada nesta coleção (Andrade et al., 1993), procederam-se análises sorológicas e biológicas das cultivares.

O teste sorológico utilizado foi "direct antigen coating enzyme-linked immunosorbent assay" (DAC-ELISA), descrito por Hobbs et al. (1987). A avaliação foi feita visualmente, sendo comparada a intensidade de reação colorimétrica das amostras com aquelas exibidas pelos controles positivos (planta com SPFMV) e negativo (planta sadia). No teste biológico, fragmentos de caules de batata-doce foram enxertadas em plantas de *I. setosa* Ker. O registro da eventual presença de vírus baseou-se no desenvolvimento ou não de sintomas no porta enxerto.

Na tentativa de obtenção de clones sadios do material indexado, meristemas apicais de 0,2 a 0,3mm, foram cultivados no meio básico de Murashige e Skoog (1962), com as vitaminas substituídas por tiamina (2,0mg/l) e mio-inositol (100mg/l), acrescido de ácido giberélico - GA₃ (0,1mg/l), 6-benzilamino-purina - BAP (0,1mg/l), ácido naftaleno acético - ANA (0,01mg/l), polivinil pirrolidone 40 (100mg/l) e sacarose (30g/l). Os meristemas excisados foram postos em tubos de ensaio, sobre um suporte de algodão embebido com o meio, e incubados em sala de crescimento à temperatura de 25±2°C e fotoperíodo de 16 h (luz do dia plus - 40W).

Objetivando um melhor desenvolvimento dos meristemas, foi testado em 10 cultivares, o acréscimo ao meio base (M1) de 100mg/l de arginina, combinada com 20 ou 60mg/l de putrescina (meios M1 e M2, respectivamente).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com duas repetições (meristemas). Para a área dos calos (cm²) e altura dos brotos (cm), procedeu-se a análise de variância e comparação pelo teste de Tukey.

A indexação dos clones regenerados "in vitro" foi efetuada após a aclimação pelos testes sorológico e biológico, com o mesmo procedimento realizado na indexação das plantas doadoras de meristemas.

RESULTADOS

Os resultados dos testes sorológico e bio-lógico, utilizados na indexação das plantas doadoras de meristemas, estão reunidos na Tabela 1.

De todo material de batata-doce indexado, apenas as cultivares BR 05 e Jacaré não apresentaram reação indicativa da presença de vírus. No teste biológico observou-

se clorose das nervuras e mosaico (Figura 1), além de cordão de sapato nas enxertias correspondentes às cultivares RC 01 e Rainha.

Os primeiros indícios de diferenciação dos meristemas foram observados cinco dias após a incubação, sendo verificada uma estrutura intumescida, cônica e cor verde-clara na maioria dos meristemas de todas as cultivares.

Aos 34 dias de cultivo a percentagem média de diferenciação foi de 70,6%, considerando-se as 10 cultivares usadas na escolha do meio de cultivo.

As médias do tamanho dos brotos e da área dos calos, nos diferentes meios, encontram-se na Tabela 2.

Todos os meristemas desenvolveram-se indiretamente, passando pela fase de calo antes de haver desenvolvimento de plântulas (Figura 2). Esse comportamento foi observado de maneira geral, independente da dosagem de arginina e putrescina utilizada.

Considerando-se a formação de brotos, o tratamento com ausência de arginina e putrescina (M1) e o de menor concentração de putrescina associada a arginina (M2), foram os que apresentaram o melhor desenvolvimento (Figura 2), o que sugere serem essas substâncias inibitórias, em concentrações elevadas, para o crescimento da parte aérea em culturas de meristemas de batata-doce.

De 121 meristemas isolados, foram regeneradas plântulas de 63, cujos resultados da indexação apresentaram reação negativa em 38 amostras. A eficiência média de eliminação de vírus foi de 60,32%. Pela cultura de meristemas apicais, foi então possível obter clones sadios das cultivares Angico, Balão Roxo, BR 05, Branca da Serra, Branca de Talo Roxo, CO Branca, CO Copinha, CR 06, Olho de Urubu, Paulistinha, Rainha, Rainha de Penedo, Rainha da Praia, São Paulo e Talo Roxo.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos evidenciaram uma alta incidência do SPFMV na coleção de germoplasma do IPA, com 31 cultivares infectadas das 33 testadas. Ficou claro também a necessidade de se analisar as demais cultivares e a urgência de se obter clones livres de vírus, visando a renovação de toda a coleção.

Os dois métodos, sorológico e biológico, funcionaram de maneira complementar no processo de indexação. O teste DAC-ELISA, realizado com amostras das matrizes de batata-doce, evidenciou a presença do SPFMV em 24 cultivares, enquanto que a enxertia em *I. setosa*, embora não

determinando a identidade viral, permitiu a detecção da presença de vírus em mais sete cultivares além das 24 que reagiram positivamente no teste DAC-ELISA.

Diversas reações negativas, assim como as reações fracas observadas no DAC-ELISA, podem estar relacionadas com a menor concentração viral nas amostras do tecido foliar utilizado, resultante da distribuição irregular do vírus em batata-doce, fato amplamente registrado na literatura (Esbenshade e Moyer, 1982; Abad e Moyer, 1992).

Por outro lado, a grande sensibilidade do teste de infectividade, para indexação de vírus nessa espécie, tem sido comprovada experimentalmente, não sendo superada nem pela hibridização de ácidos nucleicos, considerada por Abad e Moyer (1992), como altamente eficiente.

O sintoma de cordão de sapato, observado em plantas de *I. setosa* enxertadas com as cultivares RC 01 e Rainha, é possivelmente devido a presença de uma infecção mista do SPFMV e SPDAV (Gueiros Júnior *et al.*, 1995).

A percentagem de diferenciação de plântulas obtidas a partir do cultivo de meristemas superou as médias obtidas por alguns autores (Gama, 1988).

As precursoras de poliaminas arginina e putrescina não interferiram na resposta dos meristemas quanto à formação de calo, o que pode ser atribuído a outros fatores não explorados neste trabalho. De acordo com Love *et al.*, (1985), a formação de calo em batata-doce, com ou sem emissão de brotos, é um problema comum nesta cultura, podendo ser atribuído a diversos fatores, sendo que a resposta da planta depende muito do seu genótipo. Segundo Grattapaglia e Machado (1990), o calo não é desejável na cultura "in vitro", por possibilitar o surgimento de variação somaclonal.

A indexação das plantas oriundas de meristemas, após aclimação, se faz necessária para a identificação dos clones que estão seguramente livres de vírus. A quantidade de vírus, ainda que presente, poderia ser muito baixa e difícil de ser detectada em plântulas na condição "in vitro". Um aumento da concentração viral poderia ocorrer com o desenvolvimento das plântulas, vindo a ser comprovado um menor índice de eliminação viral após sua aclimação.

ABSTRACT

Cultivars of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) of the germoplasm collection of the Empresa Pernambucana de Pesquisa

Agropecuária were indexed by grafting on *I. setosa* Ker. and by the direct antigen coating enzyme-linked immunosorbent assay (DAC-ELISA), using antiserum against the sweet potato feathery mottle virus - SPFMV. The results revealed that 31 of the 33 indexed cultivars were SPFMV infected. In order to obtain virus free clones from that materials, meristems-tip ("apical dome") approximately 0,2 to 0,3mm in length were excised and grown in a basal medium M1 containing the MS salts, complemented with thiamine (2,0mg/l), myo-inositol (100mg/l), BAP (0,1mg/l), NAA (0,01mg/l), GA₃ (0,1mg/l), PVP 40 (100mg/l), and sucrose (30g/l). In attempt to improve the growth of the meristems "in vitro", the effect of the addition to the medium of arginine (100mg/l) in combination with putrescine (20mg/l - medium M2 and 60mg/l - medium M3) was evaluated. Reading at 34 days after inoculation, analyzed by Tukey test, indicated no influence on callus formation and plant regeneration by these substances, being at higher concentration (M3) inhibitory to the aerial part growth. The "in vitro" regenerated material was indexing by DAC-ELISA and grafting on *I. setosa*, observing negative reaction in 60,32% of the tested clones. By meristem culture it was possible to obtain virus free clones of the cultivares Angico, Balão Roxo, BR 05, Branca da Serra, Branca de Talo Roxo, CO Branca, CO Copinha, CR 06, Olho de Urubu, Paulistinha, Rainha, Rainha de Penedo, Rainha da Praia, São Paulo, and Talo Roxo.

Key words: sweet-potato, SPFMV, meristem-tip, ELISA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABAD, J. A.; MOYER, J.W. Detection and distribution of sweet potato feathery mottle virus in sweet potato by "in vitro" transcribed RNA probes (Riboprobes), membrane immunobinding assay, and direct blotting. *Phytopathology*, St. Paul, v. 82, n. 3, p. 300-350, 1992.
- 2 ALCONERO, R.; SANTIAGO, A. G.; MORALES, F.; RODRIGUEZ, F. Meristem tip culture and virus indexing of sweet potato. *Phytopathology*, St. Paul, v. 65, Jul. p. 769-773, 1975.
- 3 ANDRADE, G. P.; ILARRAZ, E. S.; PIO-RIBEIRO, G. et al. Detecção do "sweet potato feathery mottle virus" na coleção de germoplasma de batata-doce na Universidade Federal Rural de Pernambuco e Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2., 1993, Recife. Resumos ... Recife : UFRPE, 1993. p. 57.

- 4
ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL 1991. Rio de Janeiro : IBGE, v. 51, p. 510, 1994.
- 5
 CLARK, C. A.; MOYER, J. W. **Compendium of sweet potato diseases.** St. Paul : The American Phytopathological Society, 1988. 74 p.
- 6
 EMATER - RIO; PESAGRO - RIO. **Recomendações para a cultura da batata-doce.** Niterói, 1989. 16 p. (Informe técnico, 19).
- 7
 ESBENSHADE, P. R.; MOYER, J. W. Indexing system for sweet potato feathery mottle virus in sweet potato using enzyme-linked immunosorbent assay. **Plant Disease**, St. Paul, v. 66, p. 911-913, 1982.
- 8
 FAO **Production yearbook**, 1991. Roma, v. 48, 1994. p.91 (FAO Statistics Series, 125).
- 9
 GAMA, M. I. C. S. Produção de plantas de batata-doce livre de vírus por termoterapia e cultura de meristema. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 13, n.3, p. 283-286, out. 1988.
- 10
 GRATTAPLAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In : TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília : Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas, 1990. p. 99-169.
- 11
 GUEIROS JÚNIOR, F.; ANDRADE, G.P.; ILARRAZ, E.S. et al. Detecção do "sweet potato feathery mottle potyvirus" em áreas produtoras de batata-doce (*Ipomoea batatas*) em Pernambuco e Paraíba, seleção e distribuição de germoplasma indexados. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 20, p. 308, ago. 1995. Suplemento.
- 12
 HOBBS, H. A.; REDDY, D. V. R.; RAJESWARI, R.; et al. Use of direct antigen coating and protein A coating ELISA procedures for detecting of three peanut viruses. **Plant Disease**, St. Paul, v. 71, p. 747-749, 1987.
- 13
 LOVE, S. L.; RHODES, B. B.; MOYER, J. W. **Meristem-tip culture and virus indexing of sweet potatoes.** Rome : International Board for Plant Genetic Resources, 1987. 46 p.
- 14
 MURASHIGE, T. E.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, abr. 1962.
- 15
 POZZER, L.; DUSI, A. N.; SILVA, J. B. C. et al. Avaliação da taxa de reinfecção de plantas de batata-doce livres de vírus pelo "sweet potato feathery mottle virus", em condições de campo. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v.19, n. 2, p. 231-234, jun. 1994.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA) e a J. W. Moyer, da North Carolina State University (NCSU), pela doação do anti-soro.

TABELA 1- Reações de cultivares de batata-doce da coleção de germoplasma da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, em testes de indexação sorológica e biológica

Cultivar	Métodos de indexação	
	DAC-ELISA* (anti-soro contra o SPFMV)	Enxertia em <i>I. setosa</i> **
Angico	+	+
Balão Roxo	+	+
Batateira	+	+
BR 05	-	-
Branca da Serra	+	+
Branca de Talo Roxo	-	+***
Cana Brava	+	+
Carpinteira	+	+
CO Branca	-	+***
CO Copinha	+	+
Cordão de Ouro	+	+
Cooperativa	+	+
CR 02	-	+***
CR 06	+	+
CR 09	-	+***
CR25	++	+
Estrela de Natal	+	+
Japonesa	++	+
Jacarei	-	-
Lilás	++	+
Mãe de Família Branca	+	+
Olho de Urubu	++	+
Pedra 02 Batata Recife	-	+***
Paulistinha	++	+
Rainha	+	++
Rainha de Penedo	++	+
Rainha da Praia	-	+***
RC 01	++	++
RC 03	+	+
RC 98	-	+
São Paulo	++	+
Sem Nome	+	+
Talo Roxo	+	+

* ++ = reação positiva forte; + = reação positiva fraca; - = reação negativa

** ++ = clorose das nervuras, mosaico e cordão de sapato; + = clorose das nervuras e mosaico; - = sem sintoma

*** Amostras colhidas dos porta-enxertos e analisadas pelo teste DAC-ELISA revelaram a presença do SPFMV

TABELA 2 - Média do tamanho dos brotos e área dos calos dos meristemas de batata-doce regenerados "in vitro", nos meios contendo diferentes concentrações de arginina e putrescina, em 34 dias de cultivo

Cultivar	Meio*					
	M1		M2		M3	
	brotos(cm)/	calos(cm ²)	brotos(cm)/	calos(cm ²)	brotos(cm)/	calos(cm ²)
Branca de Talo Roxo	0.00	0.18	0.00	0.20	0.00	0.17
Co Branca	0.10	0.13	0.00	0.05	0.30	0.22
CO Copinha	1.85	0.34	0.05	0.12	0.05	0.10
Cooperativa	0.80	0.05	0.00	0.01	0.60	0.15
Olho de Urubu	0.50	0.21	0.20	0.12	0.20	0.26
Paulistinha	0.25	0.17	0.00	0.13	0.25	0.30
RC 01	0.00	0.00	0.05	0.11	0.00	0.00
RC 03	0.20	0.04	0.00	0.01	0.00	0.00
Rainha da Praia	1.15	0.42	0.00	0.16	0.10	0.31
Rainha de Penedo	0.30	0.33	2.10	0.50	0.25	0.18
Média(%)**	51.5 aA	18.7 aA	24.0 abA	14.1 aA	17.5 bA	16.9 aA
D.M.S. (médias/calos)	5% = 11,50;	1% = 14,70				
D.M.S (médias/broto)	5% = 37,91;	1% = 48,44				

* M1 = arginina - 0,0mg/l, putrescina - 0,0mg/l; M2 = arginina - 100,0mg/l, putrescina = 20,0mg/l; M3 = arginina - 100,0mg/l, putrescina = 60,0mg/l

**Média de duas repetições por tratamento. Médias seguidas de mesma letra, maiúscula ou minúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

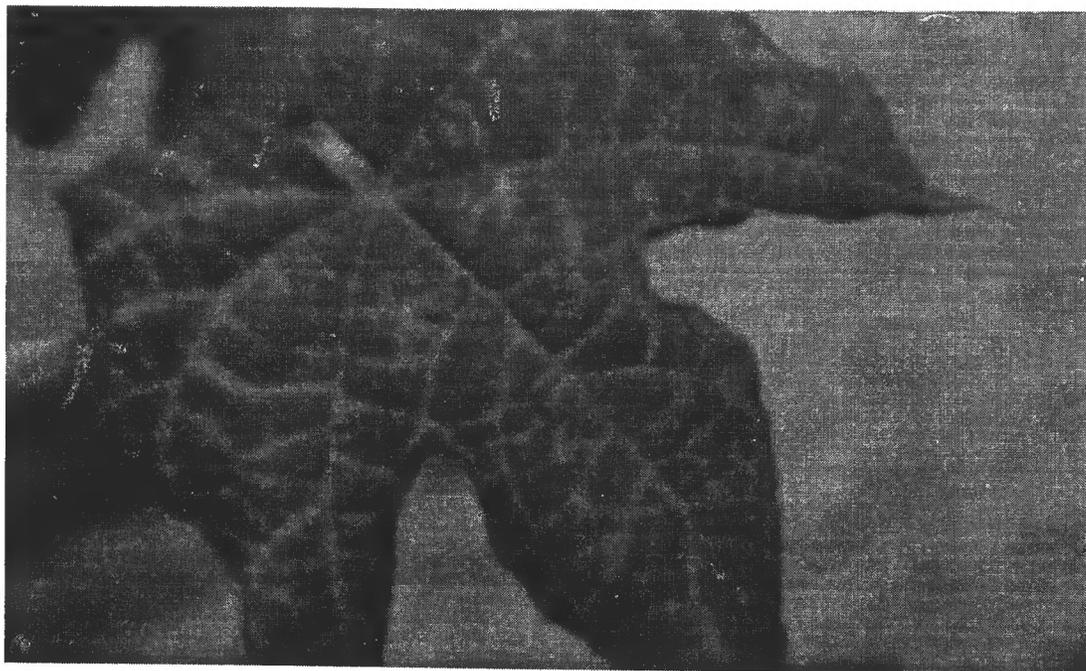


FIGURA 1 - Sintoma do vírus do mosqueado plumoso da batata-doce em folhas de *I. setosa*, apresentando mosaico e clorose das nervuras

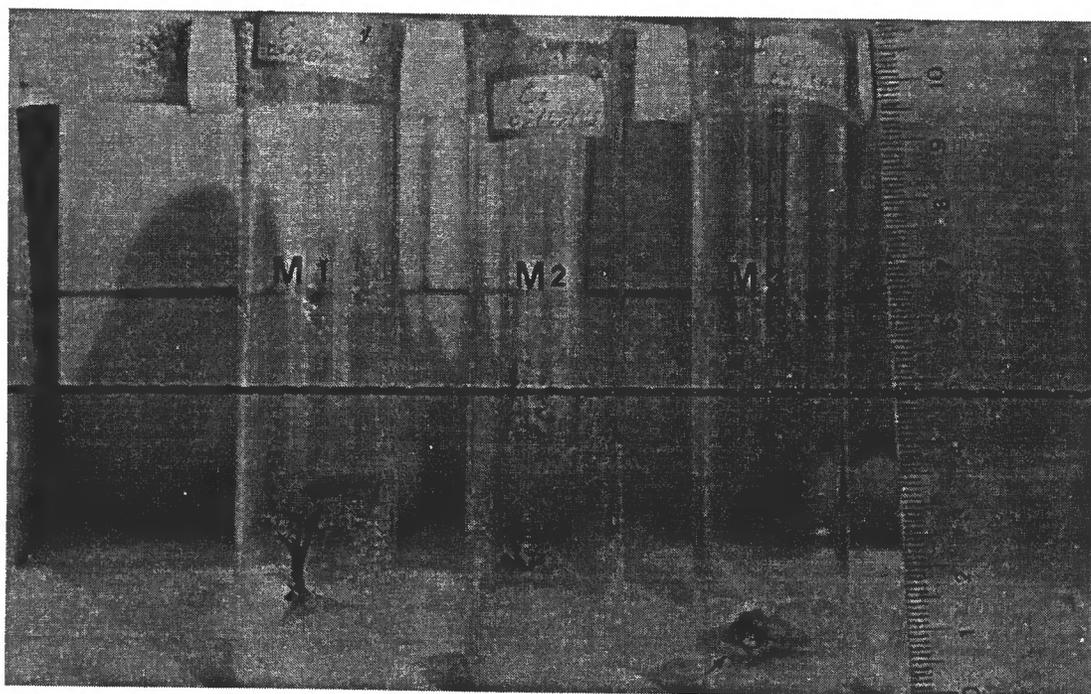


FIGURA 2 - Plântulas de batata-doce regeneradas "in vitro", por cultura de meristema, em meios contendo arginina e putrescina, apresentando morfogênese indireta. Seta mostrando a formação do calo. M1 = arginina - 0,0mg/l, putrescina - 0,0mg/l; M2 = arginina - 100,0mg/l, putrescina = 20,0mg/l ; M3 = arginina - 100,0mg/l, putrescina = 60,0mg/l