

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

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADO DE *Bidens
mosaic virus* E TRIAGEM DE ALFACE PARA RESISTÊNCIA.**

JORGE MASSAKI HASEGAWA

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

BOTUCATU - SP
Janeiro - 2006

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

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADO DE *Bidens
mosaic virus* E TRIAGEM DE ALFACE PARA RESISTÊNCIA.**

JORGE MASSAKI HASEGAWA

Orientador: Prof. Dr. Norberto da Silva

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo Agenor Pavan

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

BOTUCATU - SP
Janeiro - 2006

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

H347i Hasegawa, Jorge Massaki, 1973-
Identificação e caracterização de isolado de Bidens mosaic vírus e
triagem de alface para resistência / Jorge Massaki Hasegawa. - Botucatu :
[s.n.], 2006.
viii, 44 f. : il. color., tabs.

Dissertação (mestrado)-Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2006

Orientador: Norberto da Silva
Co-Orientador: Marcelo Agenor Pavan
Inclui bibliografia

1. Alface. 2. Plantas - Resistência. 3. Vírus de plantas. 4. Hortaliças -
Melhoramento genético. 5. Identificação. I. Silva, Norberto da. II. Pavan,
Marcelo Agenor. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
(Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

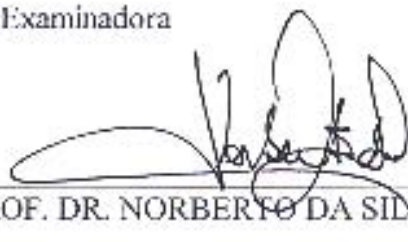
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADO DE *Bidens Mosaic virus* E TRIAGEM DE ALFACE PARA RESISTÊNCIA.

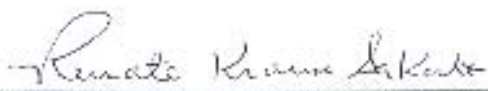
ALUNO: JORGE MASSAKI HASEGAWA

ORIENTADOR: PROF. DR. NORBERTO DA SILVA

Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. NORBERTO DA SILVA



PROFA. DRA. RENATE KRAUSE SAKATE



PROF. DR. ALEXANDRE DE MOURA GUIMARÃES

Data da Realização: 27 de janeiro de 2006.

Ao Professor Doutor **Norberto da Silva**, *sensei*,
diante de quem me verei para sempre genuflexo.
A minha homenagem ao homem que certamente
gostaria de ter sido, se não me faltasse o brilho.

Dedicado à **Regina Kaori Suda**, a quem
devotei todo o meu amor, “na alegria e na
tristeza, na riqueza e na pobreza”. Saudades.
Fica postergada à eternidade a eloquência do
meu amor, o calor incontido da *velha chama* que
retenho no meu mais profundo silêncio e os
sonhos que ainda estão em nós. “*Porque metade
de mim é partida... e a outra metade é
saudade.*”

Ofereço aos meus pais, **Yaeko Hasegawa** e
Shunji Hasegawa - pelo amor incondicional e
irrestrito - e a minha irmã, **Alice Hasegawa**,
pela inocência de nossa infância, da qual jamais
me esquecerei. Que Deus os acompanhe, aonde
quer que o caminho os leve.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora **Renate Krause Sakate**, cujo brilho suplanta qualquer forma de dor e de desesperança; alguém de quem jamais me esquecerei e que me fez resgatar a fé nos homens e em Deus. Creio que os sonhos, como as lágrimas, são feito dos mesmos ingredientes: de esperanças, às vezes revogadas, mas renovadas e implícitas em cada nascimento.

Ao Professor Doutor **Marcelo Agenor Pavan**, sob cujos ensinamentos aprendi a compreender a perfeição do mundo na imperfeição dos menores dos seres.

Ao Professor **Yukiharu Suzukawa** e à **Áurea Massako Ichioka Suzukawa**, o reconhecimento atrasado de um eterno aluno que jamais se verá maior do que seus mestres.

À **Denise Nakada Nozaki**, minha amiga nesta confraria de lágrimas que é a vida, da qual sairemos vitoriosos, pelo equilíbrio silencioso e sereno que aprendi a resgatar ao seu lado apesar da dor.

À **Márcia Aparecida Cezar, Márcio Sanches, Gerson Suzuki, Ana Carolina Firmino e Marco Cotrim**, todos vencedores. Sinto que perdi muito de mim por não tê-los ao meu lado.

Aos Professores **Antônio Carlos Maringoni, Romy Goto e Antônio Ismael Cardoso**, pelo apoio ao longo destes anos. “Nenhum caminho é tão áspero porque vocês pisaram primeiro”.

A **André Hideyuki Hirano**, a minha fidelidade irrestrita ao amigo que gostaria de ter ao meu lado em meus momentos finais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (**CNPq**), pela concessão da bolsa de mestrado.

À todos os funcionários do Departamento de Produção Vegetal, amigos anônimos que despercebidamente fazem parte de nossas conquistas e vitórias; todos imprescindíveis.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS	VII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
1 RESUMO	1
2 SUMMARY	3
3 INTRODUÇÃO	5
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	7
4.1 Aspectos gerais do <i>Bidens mosaic virus</i>	7
4.2 Transmissão	7
4.3 Círculo de hospedeiras e sintomatologia	8
5 MATERIAL E MÉTODOS	11
5.1 Localização dos experimentos.....	11
5.2 Coleta de isolados de BiMV.....	11
5.3 Inoculação em alface e girassol	13
5.4 Manutenção dos isolados.....	14
5.4.1 Manutenção dos isolados <i>in vivo</i>	14
5.4.2 Manutenção dos isolados <i>in vitro</i>	14
5.5 Identificação e caracterização dos isolados obtidos	15
5.5.1 Microscopia eletrônica	15
5.5.2 Isolamento e caracterização através de testes biológicos	15
5.5.2.1 Comparação da agressividade dos isolados monolesionais e seleção do isolado mais agressivo.....	16
5.5.2.2 Reação de hospedeiros diferenciais.....	16
5.5.3 Identificação do isolado por testes moleculares.....	17
5.5.3.1 Extração de RNA e amplificação por transcrição reversa/ reação de polimerização em cadeia (RT-PCR) utilizando-se oligonucleotídeos universais para LMV	17
5.5.3.2 Minipurificação, Extração de RNA viral de isolados de	

BiMV e amplificação por transcrição reversa/ reação de polimerização em cadeia (RT-PCR) utilizando-se oligonucleotídeos degenerados para <i>Potyvirus</i>	18
5.6 Triagem de materiais de alface para a resistência a BiMV.....	20
5.6.1 Recuperação do isolado viral por retroinoculação.....	22
5.7 Determinação da herança para a resistência a BiMV.....	23
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
6.1 Identificação do isolado viral	24
6.1.1 Análise dos dados obtidos	24
6.2 Reação de acessos de alface ao isolado de BiMV.....	34
6.3 Determinação da herança para a resistência a BiMV.....	34
7 CONCLUSÕES.....	38
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
	42

LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 01 - Círculo de hospedeiras do BiMV distribuídas por famílias.	9
QUADRO 02 - Reações de espécies vegetais utilizadas na identificação dos vírus que causam mosaico, mosqueado e necrose em alface.	9
QUADRO 03 - Identificação de plantas de picão-preto coletadas no campo com sintomas de mosaico e respectivas procedências e regiões de origem (2003).....	12
QUADRO 04 - Acessos de alface submetidos a triagem sob inoculação de isolado de BiMV. Primeiro teste. São Manuel, 2004	20
QUADRO 05 - Acessos de alface submetidos a triagem sob inoculação de isolado de BiMV. Segundo teste. São Manuel, 2005	21
QUADRO 06 - Reação de alface ‘White Boston’ e girassol ‘Catissol 1’ à inoculação mecânica de supostos isolados virais provenientes de amostras de picão-preto com sintomas.....	25
QUADRO 07 - Reação comparativa de alface ‘White Boston’, girassol ‘Catissol 1’ e <i>C. quinoa</i> à inoculação mecânica de isolados monolesionais.....	27
QUADRO 08 - Reações de espécies vegetais utilizadas na identificação do <i>Bidens mosaic virus</i> (BiMV).....	27

QUADRO 09 - Reações de espécies vegetais utilizadas na identificação do <i>Bidens mosaic virus</i> (BiMV), <i>Bidens mottle virus</i> (BiMoV) e comparação com o isolado IBI-03.....	32
QUADRO 10 - Reações de espécies vegetais utilizadas na identificação de vírus de importância na cultura da alface e comparação com o isolado IBI-03.....	33
QUADRO 11 - Reação de acessos de alface do primeiro teste submetidos a triagem sob inoculação de isolado de BiMV e sintomas após a retroinoculação em girassol e <i>Chenopodium quinoa</i> . São Manuel, 2004.	34
QUADRO 12- Reação de acessos de alface do segundo teste submetidos a triagem sob inoculação de isolado de BiMV e sintomas após a retroinoculação em girassol e <i>Chenopodium quinoa</i> . São Manuel, 2005	35
QUADRO 13 - Reação do acesso AH-529 de alface da segunda semeadura submetidos a triagem sob inoculação de isolado de BiMV.....	38
QUADRO 14 - Teste de qui-quadrado (χ^2) para a frequência esperada de 4 : 1 de plantas suscetíveis para resistentes.	40

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - Plantas de <i>Bidens pilosa</i> com sintomas de mosaico e deformação foliar.....	12
FIGURA 02 - À esquerda: planta sadia de alface “White Boston”; à direita: sintomas de mosaico e deformação foliar quando inoculada com o isolado IBI-03.	26
FIGURA 03 - Girassol “Catissol 1” apresentando lesões cloróticas sistêmicas com posterior necrose das folhas.....	26
FIGURA 04 - Sintoma exibido em folhas de <i>C. quinoa</i> aos 7 dias após a inoculação.....	29
FIGURA 05 - No centro: evolução dos sintomas em <i>C. quinoa</i> aos 30 dias após a inoculação.....	29
FIGURA 06 - Reação de <i>Nicotiana tabaccum</i> “Turkish” aos 20 dias após a inoculação.....	30
FIGURA 07 - Reação de <i>Bidens pilosa</i> aos 40 dias após a inoculação	30
FIGURA 08- Lesões cloróticas sistêmicas em <i>C. quinoa</i> à esquerda e lesões cloróticas locais em <i>C. amaranticolor</i> à direita.....	31
FIGURA 09- Reação de <i>Pisum sativum</i> aos 27 dias após a inoculação. Folha sadia no canto inferior direito.	32
FIGURA 10 - Mosaico intenso em folhas de alface repolhuda crespa Summertime aos 30 dias após a inoculação.....	39

FIGURA 11 - Alface repolhuda crespa Salinas 88 após retroinoculação em *C. quinoa*: ausência de sintomas. 39

1 RESUMO

O *Bidens mosaic virus* (BiMV) é um *Potyvirus* relatado pela primeira vez no Brasil, no Estado de São Paulo, onde foram realizados estudos através de microscopia eletrônica por Kitajima et al.(1961). É um vírus que causa sintomas em espécies de importância econômica como o girassol, a alface e a ervilha, além de algumas plantas ornamentais. Atualmente, embora se conheça o seu mecanismo de transmissão, a sua sintomatologia, as suas propriedades biológicas e físico-químicas e o seu círculo de hospedeiras, pouco se sabe sobre a importância do BiMV para a cultura da alface e as possíveis fontes de resistência em *Lactuca sativa*. O presente trabalho teve como objetivos a coleta de isolados de BiMV de diferentes regiões produtoras de alface no Estado de São Paulo, sua caracterização biológica, identificação por meio de técnicas moleculares e triagem de materiais de alface para resistência. Isolados virais coletados em plantas de picão-preto de regiões produtoras do Estado de São Paulo foram submetidos a diferentes metodologias de identificação e caracterização. Testes biológicos em hospedeiros diferenciais permitiram a diferenciação dos isolados de outros vírus de importância para a cultura da alface e a caracterização biológica de alguns isolados como BiMV. Foram vistas partículas flexuosas alongadas ao microscópio eletrônico de transmissão, sugerindo a participação de um *Potyvirus* na manifestação dos sintomas. O sequenciamento direto de produtos de PCR de um isolado mostrou identidade de 96% com a sequência de um isolado de BiMV coletado de ervilha. Isolados monolesionais multiplicados de BiMV foram inoculados em 89 cultivares de alface

de diferentes grupos varietais. A maioria das cultivares se mostrou resistente ao BiMV, exceto no caso das nacionais do tipo repolhuda lisa, que foram todas suscetíveis. Como as principais cultivares comerciais dos grupos repolhuda americana e folhas crespas apresentaram resistência, a importância do BiMV em alface está limitada a regiões em que predominam o cultivo de alface do tipo repolhuda lisa. Não foi notada correlação entre genes de tolerância a LMV-II e resistência ao BiMV.

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AN ISOLATE OF *Bidens mosaic virus* AND SCREENING OF LETTUCE CULTIVARS FOR RESISTANCE. Botucatu, 2006. 44p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: JORGE MASSAKI HASEGAWA

Adviser: NORBERTO DA SILVA

Co-adviser: MARCELO AGENOR PAVAN

2 SUMMARY

Bidens mosaic virus (BiMV) belongs to the genus *Potyvirus* and was originally described in São Paulo, Brazil, under examinations by electron microscopy made on exudates obtained from infected plants by Kitajima et al.(1961). Some of the affected plants with economic importance are sunflower, lettuce, peas and bedding plants. Until now, transmission mechanisms, symptomatology on host plants, physical properties and host range had been reported, but few information are available about the importance of BiMV to commercial lettuce fields. At the present time there is no information on resistant cultivars in *Lactuca sativa*. The aims of this work was to collect isolates of BiMV from different commercial fields in São Paulo State; to determine their biological characterization and their identification by molecular methods and identify sources of resistance in lettuce by the screening of accessions for resistance. Virus isolates originated from different regions were submitted to various methods of detection and characterization. Tests on experimental host range provided data to differentiate one lettuce-infecting species to the others and the virus identification based upon symptom expression. Flexuous rods were observed in leaf extracts from infected plants, showing the presence of a *Potyvirus* as the causal agent of the symptoms. Direct nucleotide sequencing from amplified PCR products showed 96% of identity compared to an accession of BiMV at GenBank. Monolesional isolates of BiMV properly maintained and multiplied in propagational host were inoculated in 89 cultivars of lettuce of different horticultural types. The great number of them showed resistance to BiMV, except in the case

of the Brazilian butterhead types, all susceptible. At present, as the most important commercial lettuce cultivars exhibit high degrees of BiMV resistance, mainly in leafy and iceberg types, it is possible to affirm that BiMV is usually a minor disease of lettuce though it can be a significant problem in butterhead type-growing regions. There were not any correlation between tolerance genes to LMV-II and resistance to BiMV.

Keywords: *Bidens mosaic virus*, lettuce, *Lactuca sativa*, resistance.

3 INTRODUÇÃO

Dentre as hortaliças cultivadas no Brasil, a alface (*Lactuca sativa* L.) é uma das mais importantes do ponto de vista de produção e área plantada, com cerca de 30.000 ha plantados, sendo que o Estado de São Paulo é o principal produtor, com uma área cultivada de aproximadamente 8.000 hectares e produção de 73.800 toneladas (AGRIANUAL, 2004). O valor total da produção paulista de alface foi estimado em R\$ 31.454.574,49 no ano de 2003 (TSUNECHIRO et al., 2004). É suscetível a mais de 75 doenças de diversas causas e etiologias, sendo fatores limitantes para a produção na ausência de cultivares resistentes. Segundo Kobori (2004), a alface possui um patossistema com um número estimado de pelo menos 46 agentes causais de doenças conhecidos, em que 15 são de etiologia fúngica, 5 são bactérias, 20 são vírus, 5 são nematóides e 1 fitoplasma. Dentre elas, as viroses caracterizam-se por estarem entre as mais importantes devido a suas implicações epidemiológicas e pela dificuldade de controle, além da ampla gama de hospedeiros alternativos, podendo ser responsáveis por perdas de até 100% em cultivos de alface, dependendo das condições ambientais e dos cuidados dispensados à cultura (RESENDE; CUPERTINO, 1995). Colariccio e Vicente (2000) citam o *Lettuce mosaic virus* (LMV), o *Lettuce mottle virus* (LeMoV) (caracterizado também por Chaves em 1999 como um vírus isométrico causador de mosqueado em alface), o *Cucumber mosaic virus* (CMV), o *Turnip mosaic virus* (TuMV), o complexo do vira-cabeça e um possível vírus do gênero *Rhabdovirus* como as principais doenças de etiologia viral que ocorrem no Brasil. Stangarlin (1995)

acrescenta ainda o *Bidens mosaic virus* (BiMV), enquanto que Sanches et al.(2004) e Lima Neto et al.(2004) dão evidências da importância do complexo do *big vein* na cultura da alface em condições de clima ameno nestes últimos anos.

O picão-preto (*Bidens pilosa* L.) é uma asterácea anual, herbácea, extremamente eficiente em seu aspecto reprodutivo, originária da América tropical, mas difundida amplamente em aproximadamente 40 países. É um dos mais sérios infestantes de lavouras anuais e perenes do Centro-Sul do país, sendo a mais relevante planta infestante de hortaliças no Brasil. A principal importância do picão-preto, no entanto, está na sua condição de hospedeira alternativa de fungos, nematóides e vírus fitopatogênicos.

Na cultura da alface, doenças de etiologia viral associadas ao picão-preto são o *Bidens mosaic virus* (BiMV), o *Bidens mottle virus* (BiMoV) e o *Sonchus yellow net virus* (SYNV) (CHRISTIE et al., 1974). Destes, o BiMV assume especial importância por ter sido relatado pela primeira vez no Brasil, no Estado de São Paulo, onde foram realizados estudos através de microscopia eletrônica (KITAJIMA et al., 1961). Atualmente, conhece-se o seu mecanismo de transmissão, a sua sintomatologia, as suas propriedades biológicas e o seu círculo de hospedeiras. O BiMV é comumente encontrado infectando campos de girassol, causando redução no tamanho das plantas e das inflorescências; em ervilha, causando mosaico e mosqueado verde escuro nas folhas e em margarida-amarela (*Coreopsis* sp.), causando mosaico nas folhas. O BiMoV apresenta propriedades muito semelhantes ao BiMV como morfologia de partículas, transmissão por afídeos, indução de inclusões típicas de *Potyvirus* e ambos infectam girassol, tabaco, *C. amaranticolor* e *Bidens pilosa*. Porém, não foi verificado se ambos são sorologicamente relacionados. O BiMoV foi relatado apenas na Flórida e não existem dados moleculares para este vírus (CHRISTIE et al., 1968).

O presente trabalho teve como objetivos a coleta de isolados de BiMV de diferentes regiões produtoras de alface no Estado de São Paulo, sua caracterização biológica, identificação por meio de técnicas moleculares e triagem de materiais de alface para resistência.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Aspectos gerais do *Bidens mosaic virus*

O *Bidens mosaic virus* é um fitovírus do gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*, medindo 720 nm de comprimento por 12 a 13 nm de diâmetro, descrito pela primeira vez em 1961 sob microscopia eletrônica a partir de exsudatos de plantas de *Nicotiana tabacum*, girassol, erva-de-Santa-Maria, *Physalis floridana*, *Chenopodium amaranticolor*, fedegoso, cordão-de-frade e picão, previamente inoculadas com o vírus proveniente de plantas de picão (KITAJIMA et al., 1961). É inativado em extrato foliar mantido entre 55 a 60° C por 10 minutos e nas diluições acima de 10^{-3} ou ainda quando conservado por 5 dias a 24 a 26°C e a 21 dias entre 4 a 5°C (KUHN et al., 1982). As culturas de importância econômica afetadas pelo BiMV são o girassol, a alface e a ervilha, além de algumas ornamentais como a *Zinnia elegans* e a margarida-amarela.

4.2 Transmissão

A transmissão por vetores ocorre de maneira não-circulativa por *Myzus persicae*, *Aphis coreopsidis* e *Dactynotus* sp. Não ocorre transmissão do vírus por sementes de picão, falsa-serralha, girassol e alface (KUHN et al., 1980).

Embora seja facilmente transmitido por inoculação mecânica pelo preparo do inóculo com tampão fosfato de 0,01 M a 0,5 M, numa faixa de pH entre 6,5 a 8,0, Kuhn et al. (1980) obtiveram melhores resultados com tampão fosfato na molaridade entre 0,01 a 0,03 M e pH entre 7,0 e 7,5, além de constatarem que a adição de Na₂SO₃ ou 2-mercaptoetanol não teria melhorado a transmissão.

Kuhn et al.(1980) testaram a transmissão do BiMV pelo pulgão *Myzus persicae* e verificaram variação na eficiência de transmissão em função da cultivar. Assim, encontraram porcentagens de infecção de 20 % para as cultivares ‘Grand Rapids’ e ‘Babá’, 23,3% para a ‘Crespa Hanson’, 60% para a ‘Brasil 48’, 70% para a ‘White Boston’ e 80% para a ‘Brasil 221’.

4. 3 Círculo de hospedeiras e sintomatologia.

O círculo de hospedeiras do BiMV é bastante amplo. Além do picão, outras invasoras são infectadas naturalmente pelo BiMV, como a *Emilia sonchifolia*, o carrapicho (*Acanthospermum hispidum*) e, possivelmente, o caruru e a maria-pretinha (KUHNS et al., 1980), ambas amplamente disseminadas e importantes do ponto de vista de hospedeiras alternativas. Rodrigues et al. (1991) relatou a ocorrência de BiMV em margarida amarela (*Coreopsis lanceolata*), mas os resultados de transmissão mecânica diferiram em parte dos de Kuhn et al. (1980). Kuhn et al. (1980) inocularam mecanicamente 88 espécies e cultivares pertencentes a 13 famílias taxonômicas, constatando que, destas, 36 espécies em 5 famílias foram hospedeiras do BiMV, conforme o quadro 1.

Quadro1. Círculo de hospedeiras do BiMV distribuídas por famílias segundo Kuhn et al. (1980).

FAMÍLIA	Espécies ou cultivares inoculadas		TOTAL
	Não-infectadas	Infectadas	
<i>Amarantaceae</i>	1	1	2
<i>Asteraceae</i>	3	13	16
<i>Chenopodiaceae</i>	4	2	6
<i>Brassicaceae</i>	8	0	8
<i>Cucurbitaceae</i>	5	0	5
<i>Euphorbiaceae</i>	1	0	1
<i>Poaceae</i>	4	0	4
<i>Fabaceae</i>	16	5	21
<i>Liliaceae</i>	1	0	1
<i>Malvaceae</i>	1	0	1
<i>Portulacaceae</i>	1	0	1
<i>Solanaceae</i>	6	15	21
<i>Scrophulariaceae</i>	1	0	1
Total	52	36	88

Dentre as plantas de interesse econômico, destacam-se o girassol, a alface (COSTA, dados não publicados, segundo KUHN et al., 1980) e a ervilha (NAGATA et al., 1995), que são bastante afetadas.

A reação biológica esperada de espécies indicadoras diferenciadoras a BiMV e a diferentes vírus em alface pode ser observada no quadro 2.

Quadro 2. Reações de espécies vegetais utilizadas na identificação dos vírus que causam mosaico, mosqueado e necrose em alface. Adaptado de Stangarlin, O. S. (1995).

Hospedeiros	Vírus						
	LeMoV	LMV	BiMoV	BiMV	CMV	TuMV	TSWV
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LL/S	LL	LL/MaC/S	LL	LL	LL	LN
<i>Chenopodium quinoa</i>	LL/S	LL/S	MaC/S	LL	LL	LL	LC
<i>Cucurbita pepo</i>	-	+	-	*	+	MaC	LC
<i>Datura stramonium</i>	-	-	-	-	S	+	MaN
<i>Gomphrena globosa</i>	LL	LL	-	-	LL/S	+	LL
<i>Helianthus annuus</i>	-	-	Mq	MaC	+	+	*

(Continuação)

<i>Lactuca sativa</i>	Mq	S/MS	MaC/S/Mq	M	M/Mq	Mac	AN/Mq
<i>Nicotiana clevelandii</i>	-	LL	+/Mq	*	+	+	LL/S
<i>Nicotiana glutinosa</i>	-	-	-	MaC/S	S/LL	+	MaC/MaN
<i>Nicotiana tabacum</i> TNN	-	-	*	MaC/S	*	*	*
<i>Petunia hybrida</i>	*	-	+	MaC/S	+	+	LL
<i>Pisum sativum</i>	-	M	-	M	+	+	AN
<i>Zinnia elegans</i>	Lat	M	Mq	M	LN	+	MaC/Mq

Legendas: AN – anel necrótico; Mq – mosqueado; M- mosaico; LN- lesão necrótica; Lat – latente; S- sistêmico; LL – lesão local; MaC – mancha clorótica; MaN – mancha necrótica; LC – lesão clorótica; -: não hospedeira; +: hospedeira; *: não encontrada.

Kuhn et al. (1980) verificaram sintomas variados em folhas inoculadas com o vírus nas hospedeiras *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana debneyi*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana tabacum* cultivares ‘White Burley’, ‘BS’, ‘Havana 38’, ‘Havana 42’, *Petunia hybrida*, *Physalis floridana*, *Nicotiana tabacum* ‘TNN’, ‘Turkish’, ‘Xanthi NC’, ‘Xanthi NN’, *Solanum nigrum*, *Amaranthus* sp. , *Zinnia elegans*, *Nicotiana hybrida*, *Emilia sonchifolia*, *Callistephus chinensis*, *Acanthospermum hispidum*, *Bidens pilosa*, *Lupinus angustifolius*, *Lupinus albus*, *Cassia occidentalis*, *Chenopodium amaranticolor* e *Chenopodium chinoa*.

Em alface, Kuhn et al. (1980) verificaram que as cultivares ‘Babá’, ‘Crespa Hanson’ e ‘Grand Rapids’ apresentaram manchas cloróticas arredondadas aos 10 a 12 dias após inoculação mecânica do vírus, mas com sintomas pouco perceptíveis e baixa transmissão, enquanto que as cultivares ‘Brasil 221’, ‘Brasil 48’ e ‘White Boston’ reagiram com numerosas manchas cloróticas aos 7 a 10 dias da inoculação, evoluindo sistemicamente para as folhas em desenvolvimento, ocorrendo, posteriormente, mosaico, clareamento das nervuras e deformação das folhas novas.

Além das hospedeiras descritas anteriormente, Rodrigues et al. (1991) relataram sintomas de mosaico e manchas anulares causadas pelo BiMV em folhas de margarida-amarela (*Coreopsis lanceolata*) coletadas no Distrito Federal, enquanto que Nagata et al.(1995) observaram sintomas de mosqueado amarelo em isolados de BiMV coletados de campos de produção comercial de ervilha em Brasília, DF.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Localização dos experimentos

Os trabalhos foram conduzidos no Departamento de Produção Vegetal, Seção de Defesa Fitossanitária, e na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Produção de São Manuel, pertencentes à Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP de Botucatu.

5.2 Coleta de isolados de BiMV

Foram coletadas amostras foliares de plantas de picão-preto que apresentavam sintomas de mosaico, clareamento das nervuras, manchas cloróticas e deformações nas folhas novas, conforme figura 1. Os isolados não foram coletados em alface para se evitar a possibilidade da ocorrência de infecções mistas e pela dificuldade de se identificar o BiMV apenas com base no quadro sintomatológico em *L. sativa*, visto que várias são as espécies de vírus que podem causar sintomas semelhantes. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, transferidas para o interior de caixas de isopor com gelo e, nessa condição, transportadas para o laboratório, quando coletadas na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Produção de São Manuel. Em virtude da rusticidade de plantas de *Bidens pilosa*, algumas amostras com sintomas foram transplantadas em vasos plásticos, principalmente as das regiões de Ibiúna e Ribeirão Preto. As plantas de picão-preto com sintomas foram

coletados na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Produção de São Manuel, em campos de cultivo de alface de Ibiúna e Biritiba-Mirim, no Cinturão verde de São Paulo e em campos de cultivo de hortaliças nas regiões de Bragança Paulista, Bauru e Ribeirão Preto (Quadro 3).



Figura 1. Plantas de *Bidens pilosa* com sintomas de mosaico e deformação foliar.

QUADRO 03 - Identificação de plantas de picão-preto coletadas no campo com sintomas de mosaico e respectivas procedências e regiões de origem (2003).

AMOSTRA	PROCEDÊNCIA	REGIÃO
IBI-01	Jorge Nakatsu	Ibiúna - SP
IBI-02	Jorge Nakatsu	Ibiúna - SP
IBI-03	Eizo Watanabe	Ibiúna - SP
IBI-04	Eizo Watanabe	Ibiúna - SP
IBI-05	João Dias	Ibiúna - SP
IBI-06	João Dias	Ibiúna - SP
BIR-01	Marco Okamuro	Biritiba Mirim - SP
BIR-02	Marco Okamuro	Biritiba Mirim - SP
BIR-03	Hiroshi Shintate	Biritiba Mirim - SP
BIR-04	Hiroshi Shintate	Biritiba Mirim - SP
BIR-05	Felício Kazunori Suzuki	Biritiba Mirim - SP
BIR-06	Felício Kazunori Suzuki	Biritiba Mirim - SP
RIB-01	Shunji Hasegawa	Cajuru - SP

(Continuação)

RIB-02	Shunji Hasegawa	Cajuru - SP
RIB-03	Shunji Hasegawa	Cajuru - SP
RIB-04	Roberto Shinji Shiramizu	Guatapar - SP
RIB-05	Roberto Shinji Shiramizu	Guatapar - SP
RIB-06	Roberto Shinji Shiramizu	Guatapar - SP
BRA-01	William Hamamura	Bragan Paulista - SP
BRA-02	William Hamamura	Bragan Paulista - SP
BRA-03	William Hamamura	Bragan Paulista - SP
SML-01	FEPP - Unesp	So Manuel - SP
SML-02	FEPP - Unesp	So Manuel - SP
SML-03	FEPP - Unesp	So Manuel - SP
SML-04	FEPP - Unesp	So Manuel - SP
SML-05	Erika Yamauti	Bauru
SML-06	Erika Yamauti	Bauru

5.3 Inoculao em alface e girassol.

Todas as amostras coletadas foram inoculadas mecanicamente em plantas de alface ‘White Boston’, cultivar bastante suscetvel ao BiMV (KUHN et al, 1980), na fase de duas folhas definitivas e girassol ‘Catissol 1’, na fase cotiledonar.

Para a inoculao, o preparo do inculo consistiu da macerao das amostras foliares em um almofariz, na presena de tampo fosfato 0,01 M em pH 7,2, dentro da faixa em que se pode obter melhores resultados para BiMV (KUHN et al., 1980), na proporo de 1g de folha fresca para 5 ml de tampo. O almofariz com o inculo foi submetido a baixa temperatura durante o seu preparo, manipulao e inoculao. Foram inoculadas 3 plantas de alface, cultivar White Boston e 3 plantas de *Helianthus annuus*, cultivar Catissol 1, para cada isolado, mantendo-se 3 plantas de cada espcie como controle negativo. Como abrasivo, foi utilizado o carborundum (600 mesh) misturado ao inculo aps o seu preparo. As inoculaes foram feitas friccionando-se o inculo na superfcie das folhas das plantas, com o dedo indicador, lavando-as em seguida com gua corrente.

5. 4 Manutenção dos isolados.

Os isolados IBI-01, IBI-03 e RIB-01, que apresentaram sintomas tanto em alface quanto em girassol, foram mantidos *in vivo* nas casas de vegetação da Seção de Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agronômicas e *in vitro* no Laboratório de Virologia do Setor de Defesa Fitossanitária.

5. 4. 1 Manutenção dos isolados *in vivo*

A manutenção *in vivo* dos isolados selecionados foi feita pela inoculação mecânica de amostras de plantas de girassol infectadas como resultado do item 5. 3 em plantas de *Chenopodium quinoa*. Concomitantemente, os isolados foram multiplicados em plantas de girassol cultivar Catissol 01 por não serem hospedeiras de *Lettuce mosaic virus* (LMV) e *Lettuce mottle virus* (LeMoV), dois dos mais importantes vírus para a cultura da alface, sendo predominante nas principais regiões produtoras do Estado de São Paulo (STANGARLIN, 1995).

As plântulas de *Chenopodium quinoa* foram inoculadas com 22 dias da sementeira e as de girassol com 14 dias da sementeira, tomando-se o cuidado de coincidir a data das inoculações.

Os isolados selecionados foram mantidos *in vivo* alternando-se os hospedeiros *Helianthus annuus*, *Chenopodium quinoa* e *Lactuca sativa* ‘White Boston’, de forma a evitar a inoculação sucessiva de uma mesma espécie de hospedeiro.

5. 4. 2 Manutenção dos isolados *in vitro*

Foram mantidas apenas as plantas sintomáticas de *Chenopodium quinoa* cujo isolado inoculado também causou sintomas em girassol nas inoculações simultâneas, excluindo-se, com isso, a possibilidade de ocorrência de LMV e/ou LeMoV. Embora a *C. quinoa* reaja com sintomas de lesões locais com evolução sistêmica quando

inoculada mecanicamente com ambos os vírus, o girassol comporta-se como não-hospedeiro tanto de LMV como de LeMoV (CHAVES et al., 2004).

As amostras foram cortadas em tiras finas e armazenadas em dessecadores, com sílica gel, em refrigerador à temperatura de 4° C para a desidratação das folhas, por 7 dias. O armazenamento foi feito em pequenos frascos esterilizados preparados com uma fina camada de sílica gel no fundo, sobreposta com algodão e papel de filtro. Os frascos foram vedados, etiquetados e armazenados a -20° C (BOS, 1977), na tentativa de se preservar a infectividade original.

5. 5 Identificação e caracterização dos isolados obtidos

5. 5. 1 Microscopia eletrônica

Para a observação da morfologia das partículas de vírus presentes, utilizou-se a técnica de imersão foliar rápida (*Leaf Dip*), na qual as folhas de *C. quinoa* infectadas provenientes do item 5. 4. 1 foram trituradas com tampão fosfato 0,01 M pH 7,0 contendo 0,01 M de sulfito de sódio e contrastadas com acetato de uranila a 3% por 5 minutos, segundo metodologia de Kitajima (1965). A observação foi feita no microscópio eletrônico de transmissão do Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária da FCA da UNESP de Botucatu.

5. 5. 2 Isolamento e caracterização através de testes biológicos

Pela possibilidade da ocorrência de infecções mistas, foi necessário realizar o isolamento monolesional por meio de folhas de *Chenopodium quinoa* infectadas, que reagem inicialmente com lesões locais à inoculação mecânica com BiMV (KUHN et al., 1982). Após o aparecimento das lesões, estas foram destacadas das folhas com o auxílio de uma lâmina de barbear previamente flambada e trituradas individualmente em plaquinhas plásticas de identificação contendo 20 µl de tampão fosfato 0,05 M, pH 7,2. A suspensão viral

foi friccionada com abrasivo sobre cotilédones de mudas sadias de *Helianthus annuus*, hospedeira multiplicadora do BiMV, sendo lavadas logo após com água corrente.

5. 5. 2. 1 Comparação da agressividade dos isolados monolesionais e seleção do isolado mais agressivo.

Os isolados monolesionais obtidos foram devidamente mantidos *in vivo* e *in vitro* observando-se o item 5. 4. Para fins de comparação da agressividade entre os três isolados selecionados, foram inoculadas mecanicamente 20 plantas de girassol ‘Catissol 1’, 20 plantas de alface ‘White Boston’ e 20 plantas de *C. quinoa* para cada isolado monolesional multiplicado em girassol, tomando-se o cuidado de se manter 5 plantas de cada hospedeira como controle negativo, estas inoculadas apenas com tampão fosfato 0,01 M em pH 7,2 na presença de abrasivo.

5. 5. 2. 2 Reação de hospedeiros diferenciais.

O isolado monolesional selecionado conforme o item 5. 5. 2. 1 foi multiplicado em girassol e inoculado mecanicamente em hospedeiros diferenciais para *Potyvirus*.

Dentre as espécies diferenciadoras utilizadas por Kuhn et al.(1980), foram escolhidos os hospedeiros diferenciais *Nicotiana tabacum* ‘Turkish’, hospedeira de BiMV, com resultados negativos para LeMoV, LMV, BiMoV e possivelmente para TuMV; *Brassica rapa* para verificação da ocorrência de TuMV e *Helianthus annuus* para verificar a ocorrência de BiMoV no Brasil. Além disso, foram inoculadas também as espécies *Pisum sativum*, *Cucurbita pepo* ‘Caserta’, *Cucumis melo*, *Chenopodium amaranticolor*, *Capsicum annuum* ‘Casca Dura Ikeda’, *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris*, *Bidens pilosa*, *Nicandra physaloides*, *Brassica oleracea* var. *capitata* ‘YR Rampo’, *Nicotina clevelandii*, *Nicotiana occidentalis*, *Nicotiana rustica*, *Citrullus lanatus*, *Gomphrena globosa*, *Raphanus sativus*, *Chenopodium quinoa* e *Datura stramonium*.

5. 5. 3 Identificação do isolado por testes moleculares.

Amostras do isolado monolesional multiplicado em girassol conforme o item 5. 5. 2. 2 foram submetidos a identificação pelo uso de métodos moleculares. Assim, as técnicas utilizadas foram a minipurificação; extração do RNA viral; amplificação por RT-PCR; seqüenciamento direto a partir de produto de PCR e comparação com seqüências disponíveis no GenBank.

5. 5. 3. 1 Extração de RNA e amplificação por transcrição reversa/ reação de polimerização em cadeia (RT-PCR) utilizando-se oligonucleotídeos universais para LMV.

Para se excluir a possibilidade da ocorrência do LMV, amostras dos isolados IBI-01, IBI-03 e RIB-01 provenientes de *C. quinoa* inoculadas e sintomáticas do item 5. 4. 1 foram submetidas a extração de RNA total de acordo com o procedimento descrito por Bertheau et al.(1998) e amplificação por transcrição reversa/ reação de polimerização em cadeia (RT-PCR) utilizando-se oligonucleotídeos universais para LMV. Amostras de RNAs totais de plantas de *C. quinoa* sadias também foram extraídas como controle negativo. Como controle positivo, utilizou-se uma amostra de RNA extraído de *C. quinoa* reconhecidamente infectada pelo LMV.

Para a detecção de LMV foi utilizada a técnica de Transcrição Reversa e Reação de polimerização em cadeia (RT-PCR) com os oligonucleotídeos (primers) LMV 9171 (5'GCGTTGATGTCGTCATCYTT 3') e LMV 8894 (5' CCGTACATAGCIGARTGTGCT 3'). Para a reação de PCR foram utilizados 5 µl de RNA total; 2,5 µl de tampão da reação; 3,5 mM de MgCl₂; 0,17% de Triton X-100; 1 mM de cada oligonucleotídeo; 0,25 mM de dNTPs; 0,5 U de *Taq* DNA Polimerase; 0,75 U da transcriptase reversa do AMV (*Avian myeloblastosis virus*) e quantidade suficiente de água DEPC para completar 25 µl. A condição da reação de RT-PCR foi de 42°C por 15 minutos para

transcrição reversa; desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos; 40 ciclos de anelamento a 54°C por 20 segundos; 40 ciclos de polimerização a 72°C por 40 segundos e polimerização final por 10 minutos a 72°C.

O produto da RT-PCR (5 µl) foi visualizado em gel de agarose a 1%, em tampão TBE (0,1 M de ácido bórico; 0,02 mM EDTA pH 8,3) corado com 0,1µl/ml de Brometo de Etídio juntamente com o marcador molecular 1kb Ladder (Invitrogen). Controles positivo, negativo e branco (reação de PCR com água substituindo o RNA) foram incluídos na extração e nas reações de PCR a fim de validar e confirmar e especificidade do método utilizado.

5. 5. 3. 2 Minipurificação, Extração de RNA viral de isolados de BiMV e amplificação por transcrição reversa/ reação de polimerização em cadeia (RT-PCR) utilizando-se oligonucleotídeos degenerados para *Potyvirus*.

Para a minipurificação, foi utilizado a metodologia de Lane (2001). Foram trituradas 2 g de folhas infectadas por vírus em 15 ml de tampão de extração (citrato de amônia 0,1 M, pH 6,5), 150 µl de iodoacetamida 0,25 M e 150 µl de NaDIECA a 0,1M, filtradas em em gaze dentro de um tubo corex de 30 ml e centrifugadas a 8. 000 rpm/10min. A seguir, os sobrenadantes foram transferidos para um tubo de policarbonato contendo 1 ml de triton X-100 e misturados até a dissolução completa do triton. Com uma pipeta de 5 ml , formou-se uma almofada de 5 ml de sacarose a 20 % no fundo de cada tubo, sendo que a sacarose foi colocada lentamente. Depois, as amostras foram centrifugadas a 35. 000 rpm por 90 minutos (rotor 70 Ti). Descartou-se o sobrenadante e lavou-se cuidadosamente as paredes do tubo com água destilada. Foram adicionados 500 µl de tampão de fosfato de sódio 50 mM em cada tubo para ressuspensão do ‘pellet’ durante a noite. O sobrenadante foi então transferido um tubo de microcentrífuga de centrifugado a 7. 000 rpm durante 5 min. Finalmente, o sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e armazenado a 4° C.

A extração do RNA foi realizada a partir do minipurificado. Em 200 µl de vírus purificado, foram adicionados 50 µl de tampão de extração de RNA (glicina a 0,2 M; NaCl a 0,2 M; EDTA a 20 mM; pH 9,0); 20 µl de SDS a 20% e 2,7 µl de proteinase K (20 mg/ml). A seguir, as amostras foram submetidas a incubação a 37° C por 1 hora. Em gelo, foram adicionadas às amostras o equivalente a um volume (272,7 µl) de fenol/clorofórmio, misturados por 30 segundos e centrifugados a 14.000 rpm por 15min. A fase aquosa foi então transferida para um tubo limpo e repetiu-se a extração com fenol/clorofórmio. A seguir, a fase aquosa foi transferida para um tubo limpo em que se adicionou 1/20 volume de NaOAC a 3M, pH 5,5 e 2,5 volumes de EtOH. As amostras foram incubadas à -20° C, por pelo menos 1 hora. Depois, foram centrifugadas a 14.000 rpm durante 30 minutos. O sobrenadante foi descartado. Nessa fase, o RNA precipitado formou um 'pellet' branco visível no fundo do tubo. Esse 'pellet' foi lavado com 1 ml de EtOH a 70 % e centrifugado por 2 min. O sobrenadante foi descartado e o 'pellet' foi secado a vácuo por 5 minutos. Finalmente, o 'pellet' foi ressuscitado em 20 µl de água DEPC e armazenado a -80° C.

A RT-PCR foi realizada com os primers WCIEN e PV 1, que amplificam um fragmento em torno de 800 pares de bases (gentilmente cedidos por Ricardo Gioria – Sakata Seed Sudamerica), utilizando-se 2,5 µl de tampão da reação; 3,5mM de MgCl₂; 0,17% de Triton X-100; 1mM de cada oligonucleotídeo; 0,25 mM de dNTPs; 1,25 U de *Taq* DNA Polimerase; 2,25 U de transcriptase reversa do AMV; 3 µl de RNA extraído a partir de minipurificado e quantidade suficiente de água DEPC para completar 50 µl. A condição da RT-PCR foi de 94°C por 2 minutos de desnaturação inicial; 1 ciclo de 94°C por 30 segundos, 60°C por 45 segundos, 72°C por 55 segundos; 1 ciclo de 94°C por 30 segundos, 57°C por 55 segundos, 72°C por 55 segundos; 1 ciclo de 94°C por 30 segundos, 54°C por 45 segundos, 72°C por 55 segundos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 45 segundos, 72°C por 55 segundos e polimerização final a 68°C por 7 minutos.

O produto da RT-PCR juntamente com o marcador molecular 1kb Ladder (Invitrogen) foi visualizado em gel de agarose a 1%, em tampão TBE (0,1 M de ácido bórico; 0,02 mM EDTA pH 8,3) corado com 0,1µl/ml de Brometo de Etídio.

A sequência obtida a partir do produto de PCR foi analisada utilizando-se o programa BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

5.6 Triagem de materiais de alface para a resistência a BiMV.

A triagem de materiais de alface para resistência ao *Bidens mosaic virus* consistiu de 2 testes de cultivares comerciais de alface pertencentes aos grupos varietais romana, latina, folhas lisa, folhas crespas, folhas mimosas, repolhuda americana, repolhuda lisa e repolhuda batávia em duas épocas distintas de semeadura. Foram testados 36 acessos de alface no primeiro teste (Quadro 4), ocorrido em agosto de 2004, e 53 acessos no segundo teste (Quadro 5), ocorrido em janeiro de 2005. As inoculações foram feitas em alface na fase de muda com três folhas definitivas, repetindo-se a cada três dias para evitar escape, num total de três inoculações.

Procurou-se incluir cultivares com tolerância ao LMV nos diferentes grupos visando correlacionar com uma eventual resistência ao BiMV.

QUADRO 04. Acessos de alface submetidos a triagem sob inoculação de isolado de BiMV.

Primeiro teste. São Manuel, 2004.

Acessos	Grupo varietal	Resistência a viroses
Gisele	Folhas crespas	LMV-2*
1998	Folhas crespas	
1397	Folhas crespas	
Balady Aswan	Folhas lisas	
Krizet	Folhas mimosas	LMV-2
Gallega de Invierno	Latina	LMV-2
Calona	Repolhuda americana	LMV-2
Vanguard 75	Repolhuda americana	LMV-2
Salinas 88	Repolhuda americana	LMV-2
Classic	Repolhuda americana	LMV-2
Challenge	Repolhuda americana	
Mohawk	Repolhuda americana	
Sonoma	Repolhuda americana	
Winterset	Repolhuda americana	LMV-2
JP 11	Repolhuda americana	
Summertime	Repolhuda americana	
Sun Devil	Repolhuda americana	
Ithaca	Repolhuda americana	
Raider	Repolhuda americana	
Lucy Brown	Repolhuda americana	
Tainá	Repolhuda americana	
4183	Repolhuda americana	

(Continuação)		
Elisa	Repolhuda lisa	LMV-2
Brasil48	Repolhuda lisa	LMV-2
Divina	Repolhuda lisa	LMV-2
Balisto	Repolhuda lisa	LMV-2
Elvira	Repolhuda lisa	LMV-2
Brasil 303	Repolhuda lisa	LMV-2
Áurea	Repolhuda lisa	LMV-2
Glória	Repolhuda lisa	LMV-2
Carina	Repolhuda lisa	LMV-2
Floresta	Repolhuda lisa	LMV-2
White Boston	Repolhuda lisa	
Regina	Repolhuda lisa	
Pavane	Romana	
Conquistador	Romana	LMV-2

*: *Lettuce mosaic virus* patótipo II.

QUADRO 05. Acessos de alface submetidos a triagem sob inoculação de isolado de BiMV.
Segundo teste. São Manuel, 2005.

Acessos	Grupo varietal	Resistência a viroses
Gorga	Batávia	
Canastra	Batávia	
La Brillante	Batávia	
Doree de Printemps	Batávia	
Blonde a bord rouge	Batávia	
Sierra	Batávia	
Pierre Benite	Batávia	
Vera Lote: 29. 682	Folhas crespas	
Verônica Lote: 28. 495	Folhas crespas	
Hortência Lote: 31. 314	Folhas crespas	
Ainoa	Folhas crespas	
Balady Aswan	Folhas lisas	
Bambino	Folhas mimosas	
Kristina	Folhas mimosas	
Florence	Folhas mimosas	
Gallega de Invierno	Latina	LMV-2*
Onondaga	Repolhuda americana	
Classic	Repolhuda americana	LMV-2
Lady	Repolhuda americana	
Calona	Repolhuda americana	
Julia	Repolhuda americana	
Cool Guard	Repolhuda americana	
Desert Queen	Repolhuda americana	

(Continuação)

Lorca	Repolhuda americana	
Jackall	Repolhuda americana	
Tânia	Repolhuda americana	
Fall Green	Repolhuda americana	
Niner	Repolhuda americana	
Paloma	Repolhuda americana	
Robinson	Repolhuda americana	
Haven	Repolhuda americana	
Summertime	Repolhuda americana	
Salinas 88	Repolhuda americana	LMV-2
Transat	Repolhuda lisa	
Regina 01-404 - 2	Repolhuda lisa	LMV-2
Regina 01-404 - 3	Repolhuda lisa	LMV-2
Regina 01-404 - 4	Repolhuda lisa	LMV-2
Regina 01-405 - 1	Repolhuda lisa	LMV-2
Regina 01-405 - 2	Repolhuda lisa	LMV-2
Regina 01-405 - 3	Repolhuda lisa	LMV-2
Brasil 48 (2004)	Repolhuda lisa	LMV-2
Brasil 303	Repolhuda lisa	LMV-2
Elisa	Repolhuda lisa	LMV-2
Luisa	Repolhuda lisa	
Regina 2000	Repolhuda lisa	LMV-2
Babá de Verão	Repolhuda lisa	
Maravilha das Quatro Estações	Repolhuda lisa	
Rouge Grenoblaise	Repolhuda lisa	
White Boston	Repolhuda lisa	
Valmaine 03-125 - 1	Romana	
Valmaine 03-125 - 2	Romana	
Valmaine 03-125 - 3	Romana	

*: *Lettuce mosaic virus* patótipo II.

A metodologia de inoculação adotada foi a mesma utilizada no item 5.3.

5. 6. 1 Recuperação do isolado viral por retroinoculação.

Aos 35 dias após a primeira inoculação, foram coletadas amostras dos acessos sintomáticos e assintomáticos e retroinoculadas mecanicamente em mudas de girassol e *C. quinoa* previamente preparadas para este fim.

5.7 Determinação da herança para a resistência a BiMV.

Com base nos resultados do primeiro teste, foram inoculadas mecanicamente 120 plantas da geração F2 do acesso AH-529, cruzamento entre Summertime e Salinas 88, cultivares respectivamente suscetível e resistente ao BiMV. Todas as amostras, sintomáticas e assintomáticas, foram retroinoculadas em girassol ‘Catissol 1’ e *C. quinoa*.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Identificação do isolado viral.

A maioria das amostras sintomáticas de picão-preto não apresentaram sintomas na alface ‘White Boston’ e no girassol, ambas hospedeiras altamente suscetíveis ao BiMV (KUHN et al., 1980). Os isolados virais coletados em plantas de picão-preto com sintomas e que expressaram sintomas quando inoculados mecanicamente tanto em alface quanto em girassol mostraram-se pouco frequentes nas amostras (Quadro 6). Stangarlin (1995) também verificou uma baixa prevalência de isolados virais que causaram sintomas tanto em girassol quanto em alface quando inoculados mecanicamente, provenientes de alface com sintomas de mosaico de diferentes regiões produtoras do Estado de São Paulo.

Todas as plantas utilizadas como controle negativo se mostraram sadias até a última avaliação, realizada aos 50 dias da inoculação mecânica.

QUADRO 06 - Reação de alface ‘White Boston’ e girassol ‘Catissol 1’ à inoculação mecânica de isolados virais provenientes de amostras de picão-preto sintomáticas.

AMOSTRA	Alface cultivar White Boston*	Girassol cultivar Catissol 1*
IBI-01	3/3	2/3
IBI-02	0/0	0/0
IBI-03	3/3	3/3
IBI-04	1/3	0/0
IBI-05	0/0	0/0
IBI-06	1/3	0/0
BIR-01	0/0	0/0
BIR-02	1/3	0/0
BIR-03	0/0	0/0
BIR-04	3/3	0/0
BIR-05	0/0	0/0
BIR-06	1/3	0/0
RIB-01	3/3	2/3
RIB-02	0/0	0/0
RIB-03	0/0	0/0
RIB-04	0/0	0/0
RIB-05	0/0	0/0
RIB-06	0/0	0/0
BRA-01	1/3	0/0
BRA-02	0/0	0/0
BRA-03	0/0	0/0
SML-01	0/0	0/0
SML-02	1/3	0/0
SML-03	0/0	0/0
SML-04	0/0	0/0
SML-05	0/0	0/0
SML-06	2/3	0/0

* Resultados expressos em número de plantas com sintomas de mosaico / número de plantas inoculadas.

Dos 27 isolados coletados no campo, foram selecionados apenas três por causarem sintomas em alface e em girassol ao mesmo tempo. Os isolados virais obtidos foram o IBI-01 e o IBI-03, originários de Ibiúna e o RIB-01, proveniente da região de Ribeirão Preto. Destes, o isolado mais agressivo foi o IBI-03, causando manchas cloróticas com mosaico sistêmico e deformação foliar em alface ‘White Boston’ (Figura 2) e lesões cloróticas sistêmicas com posterior necrose das folhas em girassol ‘Catissol 1’ (Figura 3).

A ocorrência de necrose em folhas de girassol permite diferenciar o BiMV do *Bidens mottle virus* (BiMoV) (PURCIFULL, 1971), outro *Potyvirus* que afeta alface, girassol, *C. quinoa* e picão-preto, entre outras hospedeiras em comum.



Figura 2. À esquerda: planta sadia de alface ‘White Boston’; à direita: sintomas de mosaico e deformação foliar quando inoculada com o isolado IBI-03.



Figura 3. Girassol ‘Catissol 1’ apresentando lesões cloróticas sistêmicas com posterior necrose das folhas.

Ao microscópio eletrônico de transmissão, conforme o item 5. 5. 1, foram vistas partículas flexuosas longas de aproximadamente 700 nm de comprimento nas telinhas correspondentes às amostras dos isolados obtidos de *C. quinoa* utilizadas na manutenção *in vivo* segundo o item 5. 4. 1.

Os isolados IBI-01, IBI-03 e RIB-01 provenientes de *C. quinoa* inoculadas e sintomáticas submetidas à extração de RNA total de acordo com o procedimento descrito por Bertheau et al.(1998) e amplificação por transcrição reversa/ reação de polimerização em cadeia (RT-PCR) utilizando-se oligonucleotídeos universais para LMV não mostraram amplificação, exceto no caso do controle positivo.

Dos isolados monolesionais obtidos conforme o item 5. 5. 2, escolheu-se o proveniente do isolado IBI-03 pela baixa ocorrência de escape, conforme os resultados do quadro 7.

QUADRO 7 - Reação comparativa de alfaca ‘White Boston’, girassol ‘Catissol 1’ e *C. quinoa* à inoculação mecânica de isolados monolesionais

	White Boston*	Catissol 1*	<i>C. quinoa</i>
IBI-01	9/20	16/20	11/20
IBI-03	19/20	16/20	20/20
RIB-01	11/20	13/20	15/20
Tampão+abrasivo	0/5	0/5	0/5

* Resultados expressos em número de plantas com sintomas de mosaico / número de plantas inoculadas.

O isolado monolesional de IBI-03, quando inoculado nos hospedeiros diferenciais, apresentou reações conforme o quadro 8.

QUADRO 08. Reações de espécies vegetais utilizadas na identificação do *Bidens mosaic virus* (BiMV).

Espécies	Sintomas
<i>Bidens pilosa</i>	M / S
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> ‘YR Rampo’	-
<i>Brassica rapa</i>	-
<i>Capsicum annuum</i> ‘C. Ikeda’	-
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LC local com contorno avermelhado

(Continuação)

<i>Chenopodium quinoa</i>	LC / M / S
<i>Citrullus lanatus</i> ‘Crimson Sweet’	-
<i>Cucumis melo</i> ‘Amarelo CAC’	-
<i>Cucurbita pepo</i> ‘Caserta’	-
<i>Datura stramonium</i>	-
<i>Gomphrena globosa</i>	-
<i>Helianthus annuus</i> ‘Catissol 1’	M / S / necrose nas folhas mais velhas
<i>Lactuca sativa</i> ‘White Boston’	LC local / M / S
<i>Nicandra physaloides</i>	-
<i>Nicotiana clevelandii</i>	MC / S
<i>Nicotiana rustica</i>	Cl / S
<i>Nicotiana occidentalis</i>	MC / S
<i>Nicotiana tabaccum</i> ‘Turkish’	MC / S
<i>Phaseolus vulgaris</i> ‘Pérola’	-
<i>Pisum sativum</i> ‘TT – AF’	M / S
<i>Raphanus sativus</i> ‘Coral’	-
<i>Sonchus oleraceus</i>	-
<i>Vigna unguiculata</i>	-

LC: lesões cloróticas ; MC: manchas cloróticas; Cl: clareamento das nervuras; M: mosaico; S: sistêmico; –: não hospedeira.

A principal dificuldade no isolamento de *Potyvirus* está na ocorrência de infecções mistas com relativa frequência em condições naturais. Nas infecções mistas podem acontecer relações sinérgicas, causando aumento ou decréscimo na concentração dos vírus na planta, modificação nos sintomas da doença associadas ou não a alteração na movimentação sistêmica dos vírus (OLIVEIRA et al., 2000). Assim, para o BiMV, várias hospedeiras foram utilizadas como uma tentativa de se identificar o vírus e evitar a ocorrência de infecções mistas.

Em *C. quinoa*, verificou-se a manifestação de sintomas do tipo lesão local clorótica aos 7 dias após a inoculação (Figura 4), evoluindo posteriormente para clorose sistêmica, mosaico e distorção das folhas novas aos 30 dias (Figura 5), sintomas estes atribuídos ao BiMoV. Os sintomas causados por BiMV em *C. quinoa* descritos por Kuhn et al.(1980) são de lesões locais cloróticas entre os 6 e 8 dias após a inoculação. É possível, entretanto, que estes autores não tenham acompanhado a evolução dos sintomas em *C. quinoa*. A reação diferencial dos sintomas em *C. quinoa* é utilizada para diferenciar o BiMV do BiMoV (BRUNT et al., 2005a; BRUNT et al., 2005b).



Figura 4. Sintoma exibido em folhas de *C. quinoa* aos 7 dias após a inoculação.



Figura 5. No centro: evolução dos sintomas em *C. quinoa* aos 30 dias após a inoculação.

Em *N. tabacum* 'Turkish', foram observadas manchas cloróticas sistêmicas (Figura 6) conforme verificadas por Kuhn et al.(1980). A ocorrência de sintomas nesta hospedeira descarta a possibilidade da ocorrência de infecção mista com o LeMoV, que

não causa sintomas nesta hospedeira (CHAVES, 1999). Christie et al.(1968b) verificaram que a *N. tabacum* 'Turkish' não é infectada pelo BiMoV, de forma que pode ser utilizada como hospedeira para diferenciação de BiMV e BiMoV.



Figura 6. Reação de *Nicotiana tabacum* 'Turkish' aos 20 dias após a inoculação.



Figura 7. Reação de *Bidens pilosa* aos 40 dias após a inoculação.

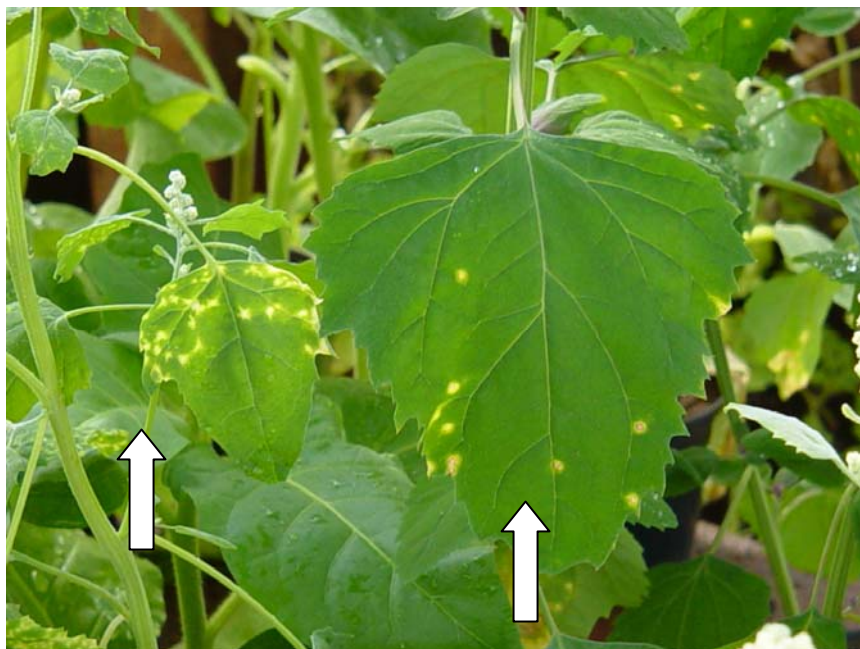


Figura 8. Lesões cloróticas sistêmicas em *C. quinoa* à esquerda e lesões cloróticas locais em *C. amaranticolor* à direita.

Os resultados obtidos de reação de hospedeiros diferenciais com a inoculação do isolado estão de acordo com Kuhn et al.(1980) para alface ‘White Boston’, ervilha, *C. amaranticolor*, girassol, *N. tabacum* ‘Turkish’, *B. pilosa*, *C. annuum*, *D. stramonium*, *N. physaloides*, *G. globosa*, *P. vulgaris*, *V. unguiculata*, *B. oleracea* var. *capitata*, *B. rapa*, *R. sativus*, *C. melo* e *C. lanatus*. Entretanto, os sintomas divergiram no caso de *C. quinoa*, sendo que foram observadas lesões cloróticas locais que evoluíram para lesões cloróticas sistêmicas, não se limitando a lesões locais (Figura 8). No caso de *N. rustica*, não foram observadas manchas cloróticas sistêmicas, mas clareamento sistêmico das nervuras. Plantas novas de picão-preto (Figura 7) apresentaram mosaico sistêmico a partir dos 18 dias depois inoculadas, mostrando que o isolado não perdeu a sua infectividade mesmo sendo mantido em girassol.

Embora os isolados selecionados tenham sido submetidos a RT-PCR com oligonucleotídeos universais para LMV conforme o item 5. 5. 3. 1, foram realizadas inoculações em hospedeiras diferenciais para ratificação da ausência de LMV; assim, os resultados em *Gomphrena globosa*, *Helianthus annuus*, *Datura stramonium* e *Nicotiana*

tabacum descaracterizaram o LMV como agente etiológico pela ausência de sintomas nestes hospedeiros.

A reação diferencial de *P. Sativum* (Figura 9), *C. amaranticolor*, *N. tabacum* ‘Turkish’ e *H. annuus* ao isolado permitiu diferenciá-lo de BiMoV. As comparações dos resultados obtidos com os encontrados na literatura podem ser observadas no quadro 9.

QUADRO 09. Reações de espécies vegetais utilizadas na identificação do *Bidens mosaic virus* (BiMV), *Bidens mottle virus* (BiMoV) e comparação com o isolado IBI-03.

Espécie	BiMV ¹	BiMoV ²	Isolado IBI-03
<i>C. amaranticolor</i>	LL	LL / MaC / S	LL
<i>H. annuus</i>	M/ S/ com necrose	Mq/ S/ sem necrose	M/ S/ com necrose
<i>P. sativum</i>	M/ S	-	M/ S
<i>N. tabacum</i> ‘Turkish’ ²	MaC/S	-	MaC/S

LL: lesão local; M: mosaico; Mq: mosqueado; MaC: mancha clorótica; S: sistêmico; -: não hospedeira
1: Fonte: KUHN, G. B. et al., 1980.

2: Fonte: PURCIFULL, D. E. et al., 1971.



Figura 9. Reação de *Pisum sativum* aos 27 dias após a inoculação. Folha sadia no canto inferior direito.

A ausência de sintomas em *G. globosa*, *C. pepo* e *D. stramonium* excluiu a ocorrência de LeMoV, TuMV e CMV, respectivamente, quando confrontada com o quadro 2 do item 4. 3, bem como a ocorrência do complexo do vira-cabeça para estas mesmas três hospedeiras, que se mostram assintomáticas para BiMV.

A ocorrência de sintomas em alface e em ervilha permite diferenciar o isolado do Sunflower chlorotic mottle virus (SuCMoV), um *Potyvirus* que causa sintomas muito similares aos do BiMV em girassol e picão-preto, mas que não infecta *L. sativa* e *P. sativum* (DUJOVNY et al., 1998).

Com base nos resultados das reações diferenciais das hospedeiras utilizadas no ensaio (Quadro 8) e comparadas como no quadro 10, pode-se concluir que o isolado IBI-03 é o *Bidens mosaic virus*. Variações na sintomatologia dentro das espécies é aceitável se considerarmos a variabilidade natural do hospedeiro e a própria variabilidade do vírus, daí a possível explicação para a manifestação diferencial dos sintomas quando comparados com resultados de Kuhn et al.(1980) e Nagata et al.(1995), em cujos trabalhos foram verificadas apenas lesões locais em *C. quinoa*.

QUADRO 10 - Reações de espécies vegetais utilizadas na identificação de vírus de importância na cultura da alface e comparação com o isolado IBI-03.

Hospedeiro	V Í R U S							
	LeMoV ¹	LMV ¹	BiMoV ¹	BiMV ¹	CMV ¹	TuMV ¹	TSWV ¹	IBI-03
<i>C. amaranticolor</i>	LL / S	LL	LL/ MaC/ S	LL	LL	LL	LN	LL
<i>C. quinoa</i>	LL / S	LL / S	MaC / S	LL	LL	LL	LC	LL/LCS
<i>C. pepo</i>	-	+	-	*	+	MaC	LC	-
<i>D. stramonium</i>	-	-	-	-	S	+	MaN	-
<i>G. globosa</i>	LL	LL	-	-	LL / S	+	LL	-
<i>H. annuus</i>	-	-	Mq	MaC / MaN	+	+	*	MaC / MaN
<i>L. sativa</i>	Mq	S/ MS	MaC/ S/ Mq	M	M / Mq	MaC	AN / Mq	MaC/ S/ Mq
<i>N. clevelandii</i>	-	LL	+ / Mq	*	+	+	LL / S	MaC/S
<i>N. tabacum</i>	-	-	-	MaC / S	*	*	*	MaC/S
<i>Pisum sativum</i>	-	M	-	M	+	+	AN	M/S

AN: anel necrótico; Lat: latente; LC: lesão clorótica; LL: lesão local; LN: lesão necrótica; M: mosaico; MaC: mancha clorótica; MaN: mancha necrótica; Mq: mosqueado; S: sistêmico; -: não hospedeira; +: hospedeira; *: não encontrada.

¹: Adaptado de Stangarlin, O. S. (1995).

6. 1. 1 Análise dos dados obtidos

O fragmento amplificado de cerca de 800 pares de bases (que correspondeu a parte da Nib e da CP dos *Potyvirus*) com a utilização dos primers WCIEN e PV1 e seqüenciado como RKS-139 Poty W a partir do produto purificado de PCR conforme o item 5. 5. 3 apresentou identidade de 96% com a seqüência do isolado BiMV-p proveniente de ervilha, depositada no Gen Bank como AY960150 .

6. 2 Reação de acessos de alface ao isolado de BiMV

Os resultados verificados nos diferentes acessos mostraram diferenças entre e dentro dos diferentes grupos varietais, conforme os quadros 11 e 12.

QUADRO 11. Reação de acessos de alface do primeiro teste submetidos a triagem sob inoculação de isolado de BiMV e sintomas após a retroinoculação em girassol e *Chenopodium quinoa*. São Manuel, 2004.

Acessos	Grupo varietal	Resultados*	Retroinoculação	Resistência a viroses
Gisele	Folhas crespas	0/6	-	LMV-2
1998	Folhas crespas	0/8	-	
1397	Folhas crespas	0/2	-	
Balady Aswan	Folhas lisas	1/7	-	
Krizet	Folhas mimosas	2/6	+	LMV-2
Gallega de Inv.	Latina	8/8	+	LMV-2
Calona	Repolhuda americana	0/6	-	LMV-2
Vanguard 75	Repolhuda americana	0/6	-	LMV-2
Salinas 88	Repolhuda americana	0/6	-	LMV-2
Classic	Repolhuda americana	0/6	-	LMV-2
Challenge	Repolhuda americana	0/8	-	
Mohawk	Repolhuda americana	0/8	-	
Sonoma	Repolhuda americana	2/7	+	
Winterset	Repolhuda americana	1/3	+	LMV-2
JP 11	Repolhuda americana	0/7	-	
Summertime	Repolhuda americana	7/7	+	

(Continuação)

Sun Devil	Repolhuda americana	2/7	+	
Ithaca	Repolhuda americana	0/6	-	
Raider	Repolhuda americana	0/6	-	
Lucy Brown	Repolhuda americana	0/6	-	
Tainá	Repolhuda americana	0/6	-	
4183	Repolhuda americana	0/6	-	
Elisa	Repolhuda lisa	4/6	+	LMV-2
Brasil48	Repolhuda lisa	5/6	+	LMV-2
Divina	Repolhuda lisa	0/2	+	LMV-2
Balisto	Repolhuda lisa	0/2	+	LMV-2
Elvira	Repolhuda lisa	0/2	-	LMV-2
Brasil 303	Repolhuda lisa	2/2	+	LMV-2
Áurea	Repolhuda lisa	4/4	+	LMV-2
Glória	Repolhuda lisa	4/4	+	LMV-2
Carina	Repolhuda lisa	6/6	+	LMV-2
Floresta	Repolhuda lisa	3/3	+	LMV-2
White Boston	Repolhuda lisa	6/6	+	
Regina	Repolhuda lisa	1/6	+	
Pavane	Romana	0/6	-	
Conquistador	Romana	3/7	-	LMV-2

* Resultados observados aos 20 dias após a primeira inoculação e expressos em número de plantas com sintomas de mosaico / número de plantas inoculadas.

+: presença de sintomas em pelo menos uma planta/ parcela; -: ausência de sintomas.

QUADRO 12. Reação de acessos de alface do segundo teste submetidos a triagem sob inoculação de isolado de BiMV e sintomas após a retroinoculação em girassol e *Chenopodium quinoa*. São Manuel, 2005.

Acessos	Grupo varietal	Resultados*	Retroinoculação	Resistência a viroses
Gorga	Batávia	2/8	+	
Canastra	Batávia	7/7	+	
La Brillante	Batávia	0/8	-	
Doree de Print. s	Batávia	0/6	-	
Blonde a b. rouge	Batávia	0/7	-	
Sierra	Batávia	5/5	+	
Pierre Benite	Batávia	0/5	-	
Vera	Folhas crespas	0/0	-	
Verônica	Folhas crespas	0/0	-	
Hortência	Folhas crespas	0/0	-	
Ainoa	Folhas crespas	0/8	-	

(Continuação)				
Balady Aswan	Folhas lisas	0/8	-	
Bambino	Folhas mimosas	0/2	-	
Kristina	Folhas mimosas	7/7	+	
Florence	Folhas mimosas	0/4	-	
Gallega de Inv.	Latina	6/6	+	LMV-2
Onondaga	Repolhuda americana	0/6	-	
Classic	Repolhuda americana	0/7	-	LMV-2
Lady	Repolhuda americana	0/5	-	
Calona	Repolhuda americana	0/7	-	
Julia	Repolhuda americana	0/7	-	
Cool Guard	Repolhuda americana	0/6	-	
Desert Queen	Repolhuda americana	0/6	-	
Lorca	Repolhuda americana	0/8	-	
Jackall	Repolhuda americana	0/8	-	
Tânia	Repolhuda americana	0/8	-	
Fall Green	Repolhuda americana	3/7	+	
Niner	Repolhuda americana	0/7	-	
Paloma	Repolhuda americana	0/7	-	
Robinson	Repolhuda americana	0/6	-	
Haven	Repolhuda americana	0/6	-	
Summertime	Repolhuda americana	6/7	+	
Salinas 88	Repolhuda americana	0/6	-	LMV-2
Transat	Repolhuda lisa	3/3	+	
Regina 01-404 - 2	Repolhuda lisa	3/3	+	LMV-2
Regina 01-404 - 3	Repolhuda lisa	5/5	+	LMV-2
Regina 01-404 - 4	Repolhuda lisa	7/7	+	LMV-2
Regina 01-405 - 1	Repolhuda lisa	4/4	+	LMV-2
Regina 01-405 - 2	Repolhuda lisa	6/6	+	LMV-2
Regina 01-405 - 3	Repolhuda lisa	5/5	+	LMV-2
Brasil 48 (2004)	Repolhuda lisa	5/5	+	LMV-2
Brasil 303	Repolhuda lisa	1/1	+	LMV-2
Elisa	Repolhuda lisa	4/4	+	LMV-2
Luisa	Repolhuda lisa	1/1	+	
Regina 2000	Repolhuda lisa	1/1	+	LMV-2
Babá de Verão	Repolhuda lisa	3/3	+	
M. Q. Estações	Repolhuda lisa	0/3	-	
Rouge Grenob.	Repolhuda lisa	0/7	-	
White Boston	Repolhuda lisa	4/4	+	
Valmaine 3-125-1	Romana	0/8	-	
Valmaine 3-125-2	Romana	0/8	-	
Valmaine 3-125-3	Romana	0/8	-	

* Resultados observados aos 20 dias após a primeira inoculação e expressos em número de plantas com sintomas de mosaico / número de plantas inoculadas.

+: presença de sintomas em pelo menos uma planta/ parcela; -: ausência de sintomas.

No grupo das repolhudas americanas, entre as 29 cultivares testadas, apenas Summertime, Sundevil e Fall Green foram suscetíveis. As cultivares Calona (moI^1), Vanguard 75 (moI^1 e Mo2), Salinas 88 (moI^2), Classic e Winterset apresentam tolerância ao LMV-II e mostraram resistência ao isolado de BiMV, exceto no caso do Winterset, que se mostrou variável, com uma planta suscetível em três plantas inoculadas. Como são cultivares comerciais com ‘pedigree fechado’, não existe a possibilidade de inferências sobre os motivos. A cultivar Ithaca, que se mostrou resistente ao isolado de BiMV neste trabalho, é considerada suscetível ao BiMoV (ZITTER; GUZMAN, 1974).

No grupo das batávias e das folhas, a maioria se mostrou resistente a BiMV.

Entre as romanas, Conquistador, que tem tolerância ao LMV-II, se mostrou suscetível, embora Pavane e Valmaine tenham se mostrado resistentes. A cultivar Valmaine é considerada como resistente ao BiMoV (ZITTER; GUZMAN, 1974). Entretanto, como a maioria das cultivares se mostrou resistente ao BiMV, não se pode discutir a identidade entre BiMV e BiMoV com base na resistência de Valmaine.

O resultado mais interessante é a variabilidade observada no grupo repolhuda lisa. Todas as cultivares nacionais, independentes de serem tolerantes a LMV-II como a Brasil 48 (NAGAI, 1979), Glória (DELLA VECCHIA; KIKUCHI, 1989) e Elisa (DELLA VECCHIA et al., 1992) ou suscetíveis como a Brasil 303, Babá de Verão e White Boston foram suscetíveis ao isolado de BiMV. A suscetibilidade das cultivares nacionais pode ser explicada pela sua genealogia, pois a maioria apresenta no pedigree a White Boston e a Gallega de Invierno (moI^1), ambas suscetíveis ao BiMV. Neste caso, pode-se checar as linhagens de Regina testadas, que apesar de possuírem em sua genealogia uma cultivar francesa (Monstreuse Ronde d’etè), de reação desconhecida a BiMV, também são resultantes de cruzamentos com Gallega de Invierno e White Boston. As cultivares de origem européia testadas, embora com menor número de plantas, foram tolerantes ao BiMV, tendo ou não tolerância a LMV-II.

O BiMV não é um vírus aparentemente importante na cultura da alface pela baixa predominância nas principais regiões produtoras do Estado de São Paulo. Isso pode ser explicado pela utilização de cultivares resistentes dos grupos de folhas crespas e repolhudas americanas que são resistentes ao BiMV. Em algumas regiões em que o grupo

varietal mais plantado é do tipo repolhuda lisa, como Nova Friburgo e Teresópolis, ambos no Estado do Rio de Janeiro, o BiMV pode ser um problema.

6.3 Determinação da herança para a resistência a BiMV

O acesso AH-529, geração F2 do cruzamento entre Summertime e Salinas 88, parentais respectivamente suscetível e resistente ao BiMV, mostrou a frequência verificada no quadro 13 quando inoculada com o isolado de BiMV. O Summertime foi o acesso do tipo repolhuda crespa que apresentou os sintomas mais drásticos, com manchas cloróticas sistêmicas, deformação e mosaico do limbo foliar e nanismo da planta (Figura 10), enquanto que o Salinas 88 se mostrou resistente ao vírus, mostrando plantas saudias e ausência de resgate de sintomas em C. quinoa e girassol quando retroinoculada (Figura 11).

QUADRO 13. Reação do acesso AH-529 de alface da segunda sementeira submetidos a triagem sob inoculação de isolado de BiMV.

AH-529 (Summertime X Salinas 88)	Número de plantas com sintomas	Número de plantas saudias
Avaliação inicial	66	34
Segunda avaliação	66	33
Terceira avaliação	67	15



Figura 10. Mosaico intenso em folhas de alface repolhuda crespa Summertime aos 30 dias após a inoculação.



Figura 11. Alface repolhuda crespa Salinas 88 após retroinoculação em *C. quinoa*: ausência de sintomas.

Os resultados de números de plantas suscetíveis para resistentes, submetidos a prova de aderência pelo teste de qui-quadrado para a frequência de 3 para 1 de suscetíveis e resistentes, respectivamente, se mostraram não-significativos para 1 grau de liberdade e 5% de probabilidade ($\chi^2=3,841$). Assim, os dados podem ser um indicativo da ação de um par de alelos recessivos para a resistência ao BiMV em alface, mas há a necessidade de estudos baseados em testes de progênie.

QUADRO 14. Teste de qui-quadrado (χ^2) para a frequência esperada de 3 : 1 de plantas suscetíveis para resistentes.

Fenótipo	Observado	Esperado	Diferença	(Diferença)²	χ^2
Suscetível	67	61,5	5,5	30,25	0,49187
Resistente	15	20,5	-5,5	30,25	1,47561
	82	82			$\chi^2 o = 1,967$

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- O BiMV não é um vírus tão importante na cultura da alface, visto que a predominância é baixa nas principais regiões produtoras de alface do Estado de São Paulo.
- A maioria das cultivares são resistentes ou tolerantes ao BiMV.
- Não há correlação entre os genes de resistência a LMV-II com a resistência ao BiMV.
- Todas as cultivares do grupo repolhuda lisa nacionais se mostraram suscetíveis ao BiMV.
- A resistência a BiMV em alface pode ser conferida por um par de alelos recessivos, exigindo, contudo, estudos envolvendo testes de progênie, retrocruzamentos ou cruzamentos-teste para confirmar a hipótese.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**, 2004. São Paulo: Argos Comunicações, 2003. 496 p.

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

BOS, L. Persistence of infectivity of three viruses in plant material dried over CaCl₂ and stored under different conditions. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 83, p. 217-220, 1977.

BRUNT, A. A. et al. Descriptions and lists from the VIDE database: *Bidens mosaic virus*. **Plant Viruses Online**, Ago. 1996. Disponível em: < <http://image.fs.uidaho.edu/vidе/descr097.htm>>. Acesso em: 26 mar. 2005a.

BRUNT, A. A. et al. Descriptions and lists from the VIDE database: *Bidens mottle virus*. **Plant Viruses Online**, Ago. 1996. Disponível em: < <http://image.fs.uidaho.edu/vidе/descr098.htm>>. Acesso em: 26 mar. 2005b.

CHAVES, A. L. R. **Caracterização de um vírus isométrico causador de mosqueado em alface (*Lactuca sativa* L.)**. 1999. 120 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, SP.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Faculdade de Ciências Agrônômicas. **Normas para elaboração de dissertações e teses**. Botucatu, 2002. 25 p.

CHAVES, A. L. R. et al. Propriedades biológicas, físico-químicas e imunológicas do vírus do mosqueado da alface, um possível *Sequiviridae*. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v. 71, n. 2, p. 163-166, abr. / jun. 2004.

CHRISTIE, S. R. ; CHRISTIE, R. G. ; EDWARDSON, J. R. Transmission of a baciliform virus of sowthistle and *Bidens pilosa*. **Phytopathology**, St Paul, v. 64, p. 840-845, 1974.

CHRISTIE, S. R. ; EDWARDSON, J. R. ; ZETTLER, F. W. Characterization and electron microscopy of a virus isolated from *Bidens* and *Lepidium*. **Plant Disease Reporter**, v. 52, n. 10, p. 763-776, 1968.

COLARICCIO, A. ; VICENTE, M. Principais viroses que ocorrem na cultura da alface no Estado de São Paulo. In: IMENES, S. L. et al. **Manejo integrado de pragas e doenças da alface**. São Paulo: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, v. 7, nov. 2000, 51 p.

DELLA VECCHIA et al. Elisa: Nova cultivar de alface para o cultivo de verão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 10, n. 1, p. 44, mai. 1992.

DELLA VECCHIA, P. T. ; KIKUCHI, M. Glória: Nova cultivar de alface lisa resistente ao florescimento prematuro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 7, n. 2, p. 29, nov. 1989.

DUJOVNY, G. et al. Characterization of a potyvirus infecting sunflower in Argentina. **Plant Disease**. v. 82, n. 5, p. 470-474, mai. 1998.

KITAJIMA, E. W. ; CARVALHO, A. M. B. ; COSTA, A. S. Morfologia do vírus do mosaico do picão. **Bragantia**, Campinas, v. 20, n. 13, p. 503-512, 1961.

KITAJIMA, E. W. A rapid method to detect particles of spherical plant viruses in fresh preparations. **Journal of Electron Microscopy**, v. 20, p. 502-512, 1965.

KOBORI, R. F. Doenças em plantas olerícolas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 1, p. 179-181, jan. /mar. 2004. (Palestra).

KUHN, G. B. ; LIN, M. T. ; COSTA, C. L. Transmissão, círculo de hospedeiras e sintomatologia do vírus do mosaico do picão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 5, p. 39-50, 1980.

KUHN, G. B. ; LIN, M. T. ; KITAJIMA, E. W. Algumas propriedades do vírus do mosaico do picão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 7, p. 185-195, 1982.

LANE, L. Minipurification for plant virus diagnosis. Ago. 2001. Disponível em: < <http://plantpath.unl.edu/llane/text/minipurprotocol.html> >. Acesso em: 10 mar. 2005.

- LIMA NETO, V. C. et al. Ocorrência de *Varicosavirus* e *Ophiovirus* associados ao espessamento clorótico das nervuras da alface no Estado do Paraná. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 1, p. 83-84, jan. /mar. 2004. (Resumo).
- NAGAI, H. Alface Brasil 48: Registro de cultivar. **Revista de Olericultura**, Viçosa, MG, v. XVII, p. 23-24, 1979.
- NAGATA, T. ; INOUE, A. K. ; DUSI, A. N. ; KITAJIMA, E. W. *Bidens mosaic potyvirus* newly isolated from pea, its characteristics and serological relationship with other potyviruses. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 473-478, 1995.
- OLIVEIRA, V. B. , LIMA, J. A. A. , VALE, C. C. & PAIVA, W. O. Caracterização biológica e sorológica de isolados de potyvirus obtidos de cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 3, p. 628-636, 2000.
- PURCIFULL, D. E. et al. Natural infection of lettuce and endive by *Bidens mottle virus*. **Plant Disease Reporter**. v. 35, n. 12, p. 1061-1063, dez. 1971.
- RESENDE, J. A. M. ; CUPERTINO, E. P. Doenças em hortaliças. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, p. 18-27, 1995.
- RODRIGUES, M. G. R. ; MARINHO, V. L. A. ; RIBEIRO, S. G. ; KITAJIMA, E. W. Mosaico em margarida-amarela (*Coreopsis lanceolata*) causada pelo Vírus do Mosaico do Picão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, n. 1, p. 114-117, 1991.
- SANCHES, M. M. ; KRAUSE-SAKATE, R. ; ROSALES, M. et al. Detecção molecular do *Lettuce big-vein virus* e Mirafiori lettuce virus provenientes de alface do Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 37. , ago. 2004, Gramado. Resumos... **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 128-129, ago. 2004.
- STANGARLIN, O. S. **Identificação dos vírus causadores de mosaico em cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) resistentes ao Vírus do mosaico da alface nas regiões produtoras do Estado de São Paulo**. 1995. 72 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, SP.
- TSUNECHIRO, A. et al. Valor da produção agropecuária do Estado de São Paulo em 2003. **Informações Econômicas**. São Paulo, v. 34, n. 3, p. 49-60, mar. 2004.
- ZITTER, T. A. ; GUZMAN, V. L. Incidence of lettuce mosaic and *Bidens mottle* viruses in lettuce and escarole fields in Florida. **Plant Disease Reporter**. v. 58, n. 12, p. 1087-1091, dez. 1974.