

Desempenho de Acessos de Alface em Campo Quanto à Incidência de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Lettuce mosaic virus* (LMV)

Mirtes Freitas Lima¹, Camila Bariolli²; Tadeu Souza³, Giovani Bernardo Amaro¹,
Fábio Akiyoshi Suinaga¹

Resumo

As espécies de tospovírus que causam a doença vira-cabeça, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e o potyvírus *Lettuce mosaic virus* (LMV) são responsáveis pelas maiores perdas na cultura da alface no Brasil. Visando identificar fontes de resistência a esses vírus, avaliou-se o desempenho de 49 acessos de alface tipo Crespa Verde e tipo Americana do Banco de Germoplasma de Alface da Embrapa Hortaliças, quanto à incidência de TSWV, GRSV, TCSV e LMV, em ensaio a campo. O delineamento experimental foi blocos ao acaso com quatro repetições e 12 plantas por parcela. As amostras, 3-15 por genótipo, foram coletadas 44 dias após o transplante das mudas para o campo. A análise foi em dot- e DAS-ELISA (*Double antibody sandwich - Enzyme-linked immunosorbent assay*). Conjugados e antissoros foram empregados na diluição 1:1000. Também foi realizado o monitoramento desses vírus com a detecção sorológica de TSWV, GRSV, TCSV e LMV em 620 plantas de alface, incluindo os tipos Crespa, Americana e Lisa, coletadas no Distrito Federal e nos estados de Minas Gerais e Bahia. Na avaliação de materiais visando a busca de fontes de resistência, foi avaliado o total de 574 plantas de 305 plantas tipo Crespa Verde e 269 tipo Americana. Os vírus mais frequentes foram TSWV (133; 23,17%) e GRSV (65; 11,32%). O TCSV e o LMV ocorreram em baixa frequência. Em alface tipo Crespa Verde, predominaram o GRSV e o TSWV, ocorrendo cada espécie, em 20,7% das plantas avaliadas. O TCSV ocorreu em 3,3% do total de plantas e o LMV em 26 plantas (8,5%). Em alface tipo Americana houve predominância de TSWV, ocorrendo em 70 amostras, representando 26,0% do total de plantas. O GRSV foi identificado em três plantas. Os acessos CNPH03, CNPH17 e CNPH27 de alface tipo Americana não apresentaram infecção por nenhum dos vírus. Esses genótipos são fontes de resistência, em potencial, a esses vírus e que podem ser utilizados em Programa de Melhoramento de Alface, após confirmada a resistência desses materiais a esses vírus em condições controladas. Na análise de amostras no monitoramento de vírus, 250 plantas testaram positivo contra um ou mais dos antissoros e 370 testaram negativo. O TSWV e o GRSV foram detectados em 54,4% (142 amostras) e 29,9% (78) plantas, respectivamente. TCSV (10%) e LMV (5,8%) ocorreram em baixa frequência. Esses resultados indicam a importância desses vírus para a alface cultura nas áreas amostradas e ressaltam a importância da adoção de medidas de manejo desses patógenos, visando reduzir os prejuízos verificados em plantios comerciais.

Introdução

A alface (*Lactuca sativa* L.) está entre as hortaliças folhosas mais produzidas e mais consumidas no Brasil, com destaque para os estados de São Paulo e Minas Gerais como os maiores produtores. Diversas doenças afetam a cultura, entre as quais, aquelas de origem viral, geralmente associadas a sintomas de mosaico e também necroses e bronzeamento das folhas. Entre os vírus que infectam a alface destacam-se como os mais importantes três espécies do gênero *Tospovirus* (Família *Bunyaviridae*): *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e uma espécie do gênero *Potyvirus* (Família: *Potyviridae*), *Lettuce mosaic virus* (LMV), sendo os responsáveis pelas maiores perdas na cultura no Brasil.

Os tospovírus causam a doença conhecida como vira-cabeça e todas as três espécies, TSWV, GRSV e TCSV ocorrem no Brasil (Ávila *et al.*, 1993, 1996; Colariccio *et al.*, 1995). As espécies GRSV e TCSV são as mais comuns no Estado de São Paulo (Colariccio *et al.*, 2003), enquanto que GRSV se destaca região

¹ Pesquisador da Embrapa Hortaliças, Cx. Postal 218, 70359-970, Brasília-DF. e-mail: mirtes.lima@embrapa.br; Fabio.suinaga@embrapa.br; geovani.amaro@embrapa.br

² Graduanda do Curso de Biologia na Universidade Paulista, Brasília-DF. e-mail: camila.bariolli@gmail.com

³ Graduado em Ciências Biológicas. Bolsista CNPq. e-mail: tadeu.souza@hotmail.com

Nordeste (Ávila *et al.*, 1996). Os tospovírus são transmitidos por tripes de maneira persistente circulativa e, nesse caso, o inseto adquire o vírus no segundo *instar* larval; o vírus se multiplica no vetor e o adulto torna-se apto a transmitir o vírus por todo o seu ciclo de vida (Wijkamp, 1995). O LMV é transmitido por diversas espécies de afídeos, de maneira não persistente, entre as quais *Myzus persicae* é considerada a espécie mais eficiente. Também é transmitido por sementes, meio de transmissão a longas distâncias com o intercâmbio de materiais, em porcentagem de até 16% (Dinant & Lot, 1992).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho de acessos de alface tipo Crespa Verde e tipo Americana do Banco de Germoplasma de Alface da Embrapa Hortaliças, quanto à incidência de três espécies de tospovírus (TSWV; GRSV; TCSV) e uma de potyvírus (LMV) em plantas no campo. Também é objetivo deste trabalho realizar a detecção e ocorrência desses vírus na cultura em amostras coletadas em áreas produtoras.

Material e Métodos

Monitoramento de viroses em alface. O total de 620 amostras de alface foi coletado de plantios convencionais e de cultivo hidropônico, de mudas em viveiro e de plantas estabelecidas em campo, incluindo os tipos Crespa, Americana e Lisa, em áreas produtoras do Distrito Federal e dos estados de Minas Gerais e Bahia. As amostras foram testadas contra antissoros policlonais produzidos contra a capa proteica de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) em DAS-ELISA (*Double antibody sandwich - Enzyme-linked immunosorbent assay*) e *Lettuce mosaic virus* (LMV), em dot-ELISA; Clark & Adams, 1977). Antissoros e conjugados foram empregados na diluição 1:1000 e a leitura da absorbância feita no comprimento de onda 405 nm, cerca de 15 a 30 minutos após a adição do substrato da enzima. Os controles positivos e negativos foram constituídos por plantas mecanicamente inoculadas com cada um dos vírus e plantas não inoculadas, respectivamente. A amostra foi considerada positiva, quando o valor da absorbância da amostra em teste foi pelo menos três vezes maior que o valor da absorbância do controle negativo.

Campo. O experimento foi instalado no Campo Experimental da Embrapa Hortaliças, em 05 de setembro de 2012. A correção da área de plantio foi realizada segundo resultados da análise de solo. Não foi necessária a aplicação de calcário e potássio. Foram aplicados 330 kg de ureia/ha, de forma parcelada: 70 kg no transplantio e as demais aplicações aos 15 dias (70 kg), 30 dias (80 kg) e 40 dias (80 kg) dias após o transplantio. Aplicou-se 2.200 kg de superfosfato simples/há e ainda, 30 toneladas de esterco de curral curtido por hectare, 30 dias antes do transplantio. A adubação de cobertura com ureia, por parcela de 1m, foi feita como segue: 7g, 10 dias após o transplantio, 7 g aos 20 dias e 8 g a cada 45 dias.

Os tratamentos consistiram de 49 acessos de alface pertencentes a dois grupos, Crespa Verde (25) e Americana (24) (**Tabela 1**) do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças. O delineamento experimental do ensaio foi blocos ao acaso com quatro repetições. A parcela experimental foi constituída por doze plantas dispostas em três fileiras de quatro plantas cada, espaçadas 0,25 m entre plantas e 0,25 m entre fileiras, totalizando 1,0m². Amostras foram coletadas (**Tabela 1**) e testadas utilizando-se antissoros policlonais anteriormente citados, contra TSWV, GRSV e TCSV em DAS-ELISA e LMV, em dot-ELISA. Coletaram-se 3-15 amostras de folhas/genótipo exibindo ou não exibindo sintomas, por parcela, aos 44 dias do plantio. Antissoros e conjugados foram utilizados nas diluições, anteriormente, assim como o controle positivo e o controle negativo.

Resultado e Discussão

Monitoramento. Das 620 amostras coletadas, 250 plantas reagiram positivamente contra um ou mais dos antissoros testados e 370 plantas testaram negativo para esses antissoros. A frequência de detecção dos vírus nas amostras analisadas encontra-se ilustrado na **Figura 1**. O TSWV e o GRSV foram os mais frequentes, tendo sido detectados em 54,4% (142 amostras) e 29,9% (78 amostras) das plantas amostradas. TCSV e LMV ocorreram em baixa frequência, 10% e 5,8%, respectivamente. Em plantas provenientes de hidroponia, coletadas na região do Distrito Federal identificou-se infecção por GRSV em todas as 10 amostras analisadas. Também em mudas provenientes de sementeiras coletadas no Estado de Minas Gerais encontrou-se GRSV. As demais plantas analisadas foram provenientes de plantio convencional. Esses resultados indicam a importância

desses vírus para a alfacultura nas áreas amostradas. Ávila *et al.*, (1996) e Colariccio *et al.* (2003) estudaram a ocorrência de viroses na alface e também relataram incidência significativa dessas espécies de tospovírus e de LMV em áreas produtoras da região Nordeste e do Estado de São Paulo. Esses resultados indicam a necessidade da adoção de medidas de controle desses vírus nas áreas amostradas.

Campo. Foi observado, nas plantas a campo, grande variação em sintomatologia, considerando-se os diversos genótipos avaliados. Os resultados dos testes sorológicos encontram-se na **Tabela 1**, onde é apresentado o número de plantas com resultado positivo para cada vírus por genótipo. Foram avaliadas 574 plantas, sendo 305 tipo Crespa Verde e 269 tipo Americana. De forma geral, os vírus com maiores frequências foram TSWV (133; 23,17%) e GRSV (65; 11,32%). O TCSV ocorreu em apenas 10 plantas (1,74%) e o LMV para o qual foram testadas apenas amostras de alface tipo Crespa Verde ocorreram em 26 plantas (8,5%).

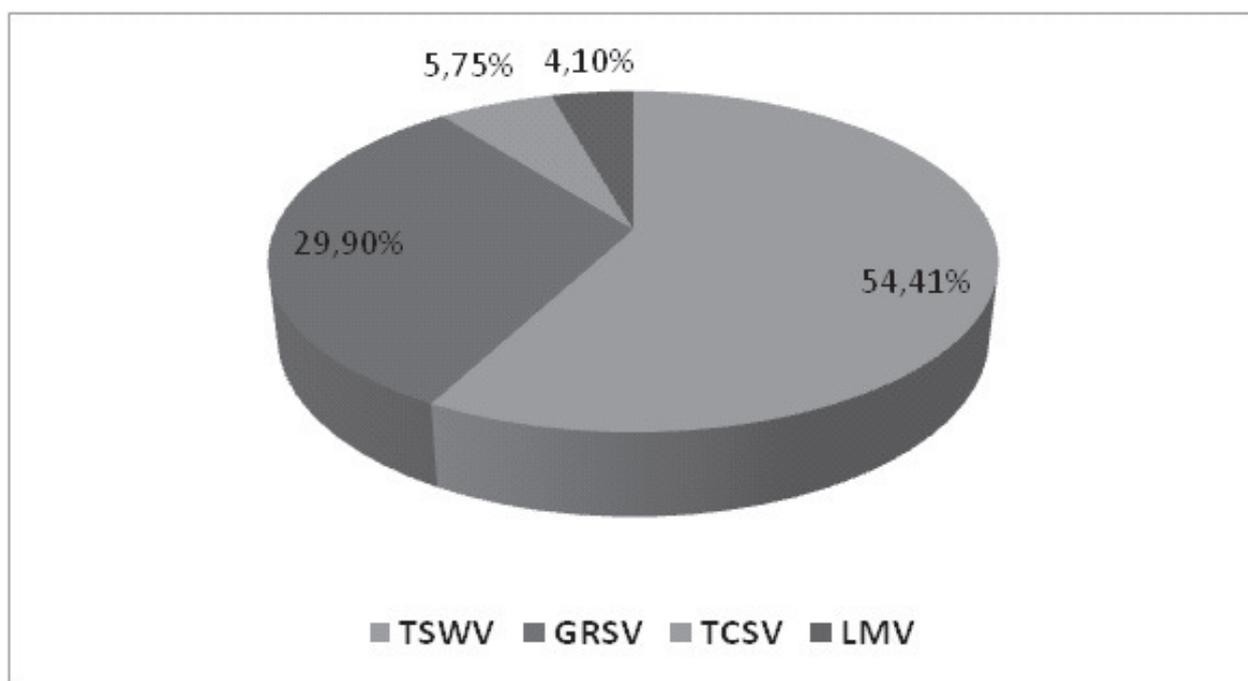


Figura 1. Distribuição de espécies de vírus em amostras de alface coletadas no Distrito Federal, Bahia e Minas Gerais. Embrapa Hortaliças, 2012-2013.

Tabela 1. Análise da incidência de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Lettuce mosaic virus* (LMV) em cultivares de alface tipo Crespa Verde, utilizando-se anti-soros policlonais, em DAS-ELISA. Brasília, DF - Embrapa Hortaliças, 2012.

Acesso (Identificação)	Tipo	Taxa de infecção/vírus (%)			
		GRSV	TSWV	TCSV	LMV
CNPH 29	Crespa	1/13(7,7%)*	4/13(7,7%)	0/13(0%)	1/13(7,7%)
CNPH 30	Crespa	2/13(15,4%)	1/13(7,7%)	0/13(0%)	0/13(0%)
CNPH 31	Crespa	5/12(41,7%)	4/12(33,33%)	0/12(0%)	0/12(0%)
CNPH 32	Crespa	2/14(14,3%)	2/14(14,3%)	3/14(21,4%)	2/14(14,3%)
CNPH 33	Crespa	3/12(23,1%)	2/13(15,4%)	0/13(0%)	2/13(15,4%)
CNPH 34	Crespa	3/15(20%)	6/15(40%)	0/15(0%)	0/15(0%)
CNPH 35	Crespa	2/12(16,7%)	3/12(25%)	0/12(0%)	0/12(0%)

CNPH 36	Crespa	3/12(25%)	3/12(25%)	0/13(0%)	0/13(0%)
CNPH 40	Crespa	2/13(15,4%)	2/13(15,4%)	0/13(0%)	1/13(7,7%)
CNPH 41	Crespa	2/12(16,7%)	2/12(16,7%)	0/12(0%)	0/12(0%)
CNPH 43	Crespa	3/15(20%)	2/15(13,3%)	1/15(6,7%)	4/15(26,7%)
CNPH 44	Crespa	1/12(8,33%)	3/12(25%)	0/12(0%)	0/12(0%)
CNPH 46	Crespa	3/12(25%)	1/13(7,7%)	0/13(0%)	5/13(38,5%)
CNPH 48	Crespa	3/12(25%)	3/12(25%)	0/13(0%)	2/13(15,4%)
CNPH 49	Crespa	3/10(30%)	3/10(30%)	0/10(0%)	0/10(0%)
CNPH 50	Crespa	3/12(25%)	1/12(8,33%)	0/12(0%)	3/12(25%)
CNPH 51	Crespa	3/12(25%)	3/12(25%)	1/12(8,33%)	1/12(8,3%)
CNPH 52	Crespa	2/13(15,4%)	2/13(15,4%)	0/13(0%)	1/13(7,7%)
CNPH 53	Crespa	3/12(25%)	3/12(25%)	0/13(0%)	0/13(0%)
CNPH 54	Crespa	3/12(25%)	3/12(25%)	0/12(0%)	2/12(16,7%)
CNPH 55	Crespa	5/15(33,3%)	1/15(6,7%)	1/15(6,7%)	0/15(0%)
CNPH 56	Crespa	5/12(41,7%)	1/12(8,33%)	0/12(0%)	1/12(8,3%)
CNPH 38	Crespa	0/6(0%)	3/6(50%)	0/6(0%)	0/6(0%)
CNPH 39	Crespa	0/6(0%)	3/6(50%)	0/6(0%)	0/6(0%)
CNPH 47	Crespa	1/11(9,1%)	2/11(18,2%)	4/11(36,4%)	1/11(9,1%)

*Número de plantas positivas/número total de plantas.

Na avaliação das alfaces tipo Crespa Verde, a incidência de duas espécies de tospovírus foi predominante nas plantas avaliadas: GRSV (63 plantas) e TSWV (63 plantas), ocorrendo cada uma das espécies, em 20,7% das plantas avaliadas (**Tabela 1**). O TCSV ocorreu apenas em 3,3% do total de plantas e o LMV considerado um dos mais importantes da alface foi detectado em 26 plantas (8,5%). Na avaliação das alfaces tipo Americana, houve predominância de TSWV, ocorrendo em 70 amostras, representando 26,0% do total de plantas (**Tabela 2**). GRSV ocorreu em apenas 3 plantas. Essas cultivares não foram testadas para o LMV. Os acessos CNPH03, CNPH17 e CNPH27 de alface tipo Americana não apresentaram infecção por nenhum dos vírus. Esses genótipos são fontes de resistência, em potencial, a esses vírus e que podem ser utilizados em Programa de Melhoramento de Alface, depois de confirmada a resistência desses materiais a esses vírus em condições controladas.

Tabela 2. Análise da incidência de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Lettuce mosaic virus* (LMV) em cultivares de alface tipo Americana, utilizando-se anti-soros policlonais, em DAS-ELISA. Brasília, DF - Embrapa Hortaliças, 2012.

Acesso (Identificação)	Tipo	Taxa de infecção/vírus (%)			
		GRSV	TSWV	TCSV	LMV
CNPH 02	Americana	0/12(0%)	1/12(8,33%)	0/12(0%)	nt
CNPH 03	Americana	0/6(0%)	0/6(0%)	0/6(0%)	nt
CNPH 06	Americana	0/12(0%)	4/12(33,33%)	0/12(0%)	nt
CNPH 07	Americana	0/12(0%)	4/12(33,33%)	0/12(0%)	nt
CNPH 08	Americana	0/9(0%)	3/9(33,3%)	0/9(0%)	nt
CNPH 10	Americana	0/12(0%)	1/12(8,33%)	0/12(0%)	nt
CNPH 09	Americana	0/12(0%)	5/12(41,7%)	0/12(0%)	nt
CNPH 11	Americana	1/12(8,3%)	6/12(50%)	0/12(0%)	nt

CNPH 12	Americana	0/12(0%)	2/12(16,7%)	0/12(0%)	nt
CNPH 22	Americana	0/12(0%)	3/12(25%)	0/12(0%)	nt
CNPH 15	Americana	0/12(0%)	6/12(50%)	0/12(0%)	nt
CNPH 16	Americana	0/12(0%)	2/12(16,7%)	0/12(0%)	nt
CNPH 23	Americana	0/12(0%)	5/12(41,7%)	0/12(0%)	nt
CNPH 26	Americana	0/12(0%)	5/12(41,7%)	0/12(0%)	nt
CNPH 21	Americana	0/12(0%)	1/12(8,33%)	0/12(0%)	nt
CNPH 28	Americana	0/12(0%)	1/12(8,33%)	0/12(0%)	nt
CNPH 19	Americana	0/12(0%)	3/12(25%)	0/12(0%)	nt
CNPH 17	Americana	0/12(0%)	0/12(0%)	0/12(0%)	nt
CNPH 24	Americana	2/12(16,7%)	2/12(16,7%)	0/12(0%)	nt
CNPH 25	Americana	0/12(0%)	3/12(25%)	0/12(0%)	nt
CNPH 13	Americana	0/12(0%)	3/12(25%)	0/12(0%)	nt
CNPH 04	Americana	0/11(0%)	2/11(18,2%)	0/11(0%)	nt
CNPH 14	Americana	0/3(0%)	3/3(100%)	0/3(0%)	nt
CNPH 27	Americana	0/12(0%)	0/12(0%)	0/12(0%)	nt

*Número de plantas positivas/número total de plantas.

Referências

- Clark, MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, 34:475-483.
- Colariccio A, Chaves ALR, Eiras M, Roggero P, Palazzo SRL and Cossa AC (2003) Diversidade de fitovírus em asteráceas no cinturão verde de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, 29:63.
- Ávila AC, De Hann P, Smeets MLL Resende RO, Kitajima EW, Goldbach, RW and Peters D (1993) Distinct levels of relationship between tospovirus isolates. **Archives of Virology**, 128:211-227.
- Ávila AC, Lima MF, Resende RO, Pozzer L, Ferraz E, Maranhão EAA, Candeia JA and Costa ND (1996) Identificação de tospovirus em hortaliças no Submédio São Francisco utilizando DAS-ELISA e DOT-BLOT. **Fitopatologia Brasileira**, 21:503-508.
- Dinant, S.; LOT. H. (1992). Lettuce Mosaic Virus. **Plant Pathology**, 41:528-542.
- Wijkamp, I; Almarza, N; Goldbach, R and Peters, D (1995) Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. **Phytopathology**, 85:1069-1074.