METODOLOGIA DE TRANSMISSÃO DA DOENÇA AZUL COM PULGÕES E USO PARA PURIFICAÇÃO DE NÚCLEOS GENÉTICOS

Ely Pires (Coodetec / ely@coodetec.com.br), Pierre Silvie (Cirad), Jean- Louis Bélot (Cirad), Osmério Pupim Júnior (Coodetec), Danielle Thomazoni (Coodetec)

RESUMO - Uma metodologia de transmissão da virose do mosaico-das-nervuras forma "Ribeirão Bonito" ("doença azul") pelos pulgões *Aphis gossypii*, está descrita neste resumo. Foi desenvolvida em casa de vegetação na Coodetec, em Cascavel-PR. As plantas foram avaliadas 46 dias após o plantio, ou seja, 28 dias após o primeiro dia da exposição aos pulgões. Esta metodologia se mostrou muito confiável na discriminação de plantas resistentes e sensíveis. Hoje, está aplicada em rotina, sendo usada entre outros experimentos para trabalhos de genética sobre a resistência à virose e também para re-selecionar núcleos genéticos puros de diversas variedades e linhagens da Coodetec.
Palavras-chave: transmissão, doença azul, núcleo genético.

BLUE DISEASE APHID TRANSMISSION METHODOLOGY AND ITS USE FOR GENETIC NUCLEI PURIFICATION

ABSTRACT - This summary describes an aphid (*Aphis gossypii*) transmission of a cotton virus ("mosaico-das-nervuras", "Ribeirão Bonito" type, also called "blue disease"). It was developped in greenhouse in Coodetec, Cascavel, Paraná State. Plants evaluation occured 46 days after planting, 28 days after the first exposure to the aphids. This method was very efficient to discriminate resistant and susceptible plants. Today, it is used routinely and used for others experimental genetical works such as virose resistance and also re selectioning pure genetic nuclei from various Coodetec's lines and varieties.
Key words: transmission, blue disease, genetic nucleus.

INTRODUÇÃO

Devido à importância econômica do mosaico-das-nervuras forma "Ribeirão Bonito" ("doença azul", DA), classificada como uma virose (CORRÊA *et al.*, 2004, 2005) veiculada naturalmente pelos pulgões *Aphis gossypii*, os melhoristas procuram criar novos cultivares resistentes a esta doença. Porém estes tem dificuldades nas avaliações em nível de campo devido a baixa pressão do vetor e/ou a não uniformidade da distribuição do inóculo nas plantas (FUZATTO *et al*., 1999) ou uma variabilidade inter anual forte (ROYO *et al*., 2003). Com o objetivo de dispor de uma metodologia confiável de avaliação dos algodoeiros, uma metodologia de transmissão, inspirada na metodologia da empresa Agritech (TONON, I. com. pess.) foi desenvolvida em casa de vegetação, na sede da Coodetec, em Cascavel-PR. Esta técnica experimental também já foi avaliada em laboratório (CAUQUIL e VAISSAYRE, 1971). Michelotto e Busoli (2003) avaliaram a eficiência da transmissão através de ninfas. Neste resumo, é apresentado um exemplo de uso desta metodologia, sendo expostos os resultados obtidos através da purificação de núcleos genéticos. Os materiais testados apresentam em sua genealogia genitores sensíveis submetidos a uma pressão de seleção natural para esta virose no Mato Grosso, que não foi suficiente para obter variedades totalmente resistentes.

MATERIAL E MÉTODOS

A fonte inicial de inóculo da "Doença Azul" provém da variedade susceptível CNPA-ITA 90 recuperada em Primavera do Leste–MT. Quatro plantas infectadas (duas em cada balde de 20 litros) foram trazidas para Coodetec em Cascavel-PR no final do mês de Janeiro de 2002. Os pulgões foram coletados em parcelas de algodão localizadas na área agrícola da Coodetec sendo multiplicados e usados para transmissão da doença. A doença instalou-se em casa de vegetação no mês de março de 2002. A mesma foi mantida nas variedades susceptíveis CNPA ITA 90 e FiberMax 966 com ajustes no decorrer do tempo a fim de permanecer no inverno. As plantas utilizadas como fonte de inóculo foram cultivadas em vasos de plásticos de 24 cm de diâmetro por 23 cm de profundidade. O substrato utilizado é composto de uma mistura 3:1 (terra / matéria orgânica).

A metodologia de inoculação da doença nas plantas de algodoeiro ocorreu da seguinte forma: para a multiplicação dos pulgões e obtenção da virose através da sucção de seiva, os afídeos foram colocados em plantas infectadas com a doença por um período de 15 dias. Após a aquisição da virose pelos pulgões, os mesmos foram coletados através de um aspirador de pó adaptado e transferidos para plantas sadias. A inoculação foi realizada com intervalo de 10 a 12 dias após o plantio. Neste período a planta já apresentava a primeira folha verdadeira bem desenvolvida. Os números de pulgões virulíferos inoculados em plantas sadias a serem avaliadas não são exatos, mas a distribuição ocorreu de forma homogênea para que todas as plantas obtivessem aproximadamente as mesmas quantidades de pulgões. Os pulgões virulíferos permaneceram nas plantas por um período de oito dias. Em seguida, foram eliminados das plantas através de inseticidas (Endossulfan), aplicando-se a dosagem de 40 ml de inseticida para 5 litros de água. Depois de eliminados os pulgões, as plantas permaneceram por um período de 20 dias de incubação. Após este período as avaliações dos sintomas seguiram de acordo com as anotações apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Escala de nota usada 28 dias após a exposição das plantas aos pulgões

Escala de notas	Descrição
1	Todas as folhas sem sintomas
2	Plantas apresentando os primeiros sintomas da doença
3	Plantas apresentando mais de 2 folhas com sintomas
4	Todas as folhas apresentando sintomas característicos

Para cada teste de material genético, testemunhas resistentes (CD 401) e susceptíveis (FM 966) foram cultivados juntos a fim de comprovar a qualidade da inoculação. Os resultados de diversos testes de transmissão na FM 966 são apresentados na Tabela 2.

Em relação aos trabalhos de purificação de núcleo genético de diversas variedades da Coodetec, foram avaliadas diversas sub-linhas da variedade CD 406 (Tab. 3) e de diversas linhagens CD em pré-lançamento. As plantas avaliadas foram cultivadas em bandejas de isopor com dimensão de 66 X 34 cm, contento 72 cavidades côncava de 5 X 5 de abertura e com 11 cm profundidade. O substrato (Plantimax®) utilizado para o desenvolvimento das plantas é composto de matéria orgânica (cascas, turfa e vermiculita) empregada na horticultura. Para cada avaliação foram utilizadas 24 plantas testemunha da FiberMax 966 (susceptível), e uma média de 24,2 plantas de cada sub- linha.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo Cauquil e Vaissayre (1971), Dyck (1979), Fuzatto *et al*. (1997), Freire *et al.* (1999), existem diversas escalas de notas para a descrição da sintomatologia nas plantas em campo ou laboratório. Na metodologia aplicada para desenvolvimento do experimento, a nota 3 poderia ser retirada, pois a mesma não está sendo usada freqüentemente devido ao estado de desenvolvimento vegetativo da planta. As notas consideradas como nível alto da doença (3 e 4) sugerem uma susceptibilidade maior de algumas plantas ou uma maior velocidade de desenvolvimento da doença. Devido à ausência de conhecimento sobre os mecanismos de evolução da virose no interior da planta e, sobretudo da quantidade de partículas do vírus inoculadas pelos pulgões, o uso desta escala de notas não demonstrou muita eficiência. O critério final utilizado é do tipo binário: planta resistente (nota 1), e plantas consideradas susceptíveis (notas 2, 3 ou 4).

O nanismo observado nas plantas testemunhas (FM966) foi um critério analisado como satisfatório atestando o sucesso da transmissão da virose.

Tabela 2. Resultados de transmissão da Doença Azul em plantas de FM966

Data	Porcentagem de plantas susceptíveis (notas 2,3 ou 4)
08/01/2004	100,0
16/01/2004	91,67
18/02/2004	95,83
28/01/2004	100,0
13/02/2004	95,83
18/02/2004	95,83
19/02/2004	100,0
02/03/2004	95,83
11/06/2004	100,0
20/09/2004	100,0

Nas condições de Primavera do Leste-MT, local no qual a COODETEC conduz trabalhos de seleção varietal, a porcentagem de plantas pertencentes à variedade susceptível CNPA ITA 90 apresentando sintomas de DA em seis ensaios de fitopatologia em condição de infestação natural, foram de 33.25, 26.75, 33.50, 30.0, 31.25 e 72.25%. Estes níveis de infestação não são considerados muito elevados apesar dos ensaios terem sido conduzidos sem o controle dos pulgões. Já a variabilidade demonstrou ser muito grande entre parcelas.

Os resultados presentes na Tabela 2 mostram que a metodologia de transmissão artificial em casa de vegetação é muito mais confiável, apresentando taxas de inoculação da virose acima de 90%.

A metodologia foi aplicada a fim de promover a re-seleção de núcleo genético, sendo os resultados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados do teste de susceptibilidade à Doença Azul em variedades e linhas da CD 406. (Cascavel- 2004).

Variedade ou linha	Sublinhas	Resultado
CD 406	41 sub linhas	100% R
CD-Prom1	11 sub linhas	100% R
CD-Prom2	10 sub linhas	100% R
CD-Prom3	12 sub linhas	100% R
CD-Prom4	1 sub linha	100% R
	1 sub linha	27,3% R
	4 sub linhas	50-80% R
	4 sub linhas	sup. 80% R

Todas as linhas puras avaliadas pertencentes à variedade CD 406 apresentaram 100% de resistência à DA, da mesma maneira que as variedades promissoras 1, 2 e 3. Isso significa que durante o processo de seleção em campo, a pressão de DA foi suficiente para isolar núcleos genéticos puros em relação a esta característica.

Em contrapartida, a variedade promissora 4 demonstrou uma segregação forte para a resistência a esta virose: uma sub linha foi totalmente resistente, outras apresentaram grande variação em relação a porcentagem de plantas consideradas resistentes. Esta metodologia permite então constituir núcleos genéticos, podendo assim contribuir para aumentar a eficiência do programa de melhoramento na obtenção de variedades totalmente resistentes à doença azul.

CONCLUSÃO

A metodologia aprimorada na Coodetec em Cascavel se revelou eficiente na avaliação da resistência à DA de populações de plantas de algodoeiro, permitindo a purificação de várias linhagens de algodoeiros. Constituiu-se também como uma ferramenta valiosa para trabalhos de Genética, em particular na determinação da herança da resistência à virose e na busca de marcadores moleculares da resistência à doença azul preconizada por Lacape *et al*. (2001).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAUQUIL, J. ; VAISSAYRE, M. La «maladie bleue» du cotonnier en Afrique: transmission de cotonnier à cotonnier par *Aphis gossypii* Gl. **Coton et Fibres Tropicales**, v. 26, p. 463-466,1971.

CORRÊA, R. L. ; SILVA, T. F. ; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; BARROSO, P. A.V.; VIDAL, M. S. ; VASLIN, M. F. S. Molecular characterization of a virus from the family Luteoviridae associated with cotton blue disease. **Arch. Virol**., 2005.

CORRËA, R. L. ; FRANCA, T. S. ; BARROSO, P. A. V. ; VIDAL, M. S. ; VASLIN, M. F. S. Development of molecular diagnosis assays for the cotton blue disease. Virus review and research. *In*: NATIONAL MEETING OF VIROLOGY, 15, 2004. **Proceedings**... v. 9, supplement 1, p. 244, 2004.

DYCK, J. M. La maladie bleue du cotonnier au Tchad. **Coton et Fibres Tropicales**, v. 34, p. 229-238, 1979.

FREIRE, E. C.; FARIAS, F. J. C.; DE ARAUJO, A. E.; AGUIAR, P. H. Efeitos da virose-Mosaico das nervuras f. Ribeirão Bonito- sobre plantas da cultivar CNPA ITA 90. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 2, 1999, Ribeirão Preto. **Anais**... Campina Grande: Embrapa CNPA, 1999. p. 449-451.

FUZATTO, M. G.; CIA, E.; BORTOLETTO, N.; ERISMANN, N. M. Variabilidade genética e potencial de seleção para resistência ao mosaico das nervuras em cultivar medianamente susceptível. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 2, 1999, Ribeirão Preto. **Anais**... Campina Grande: Embrapa CNPA, 1999. p. 476-477.

LACAPE, M.; VAISSAYRE, M.; SILVIE, P.; MICHEL, B.; HAU, B. The cotton blue disease : subject review and elements of a strategy to improve genetic resistance. *In*: SOUTH EAST ASIAN COTTON RESEARCH CONSORTIUM MEETING, 2, 2001, Ho Chi Minh City. **Proceedings**... Ho Chi Minh City, 2001. p. 155-163.

MICHELOTTO, M. D. ; BUSOLI, A. C. Eficiência de ninfas e adultos de Aphis gossypii Glov. na transmissão do vírus do mosaico das nervuras do algodoeiro. **Bragantia**, v. 2, p. 255-259, 2003.

ROYO, O. M.; ERAZZU, L.; BONACIC, I.; POISSON, J.; MONTENEGRO, A. Screening of cotton germplam for “blue disease” under natural field infestation. *In*: WORLD COTTON RESEARCH CONFERENCE, 3, 2003, Cape Town. **Proceedings**... Cape Town, 2003. p. 305-316.