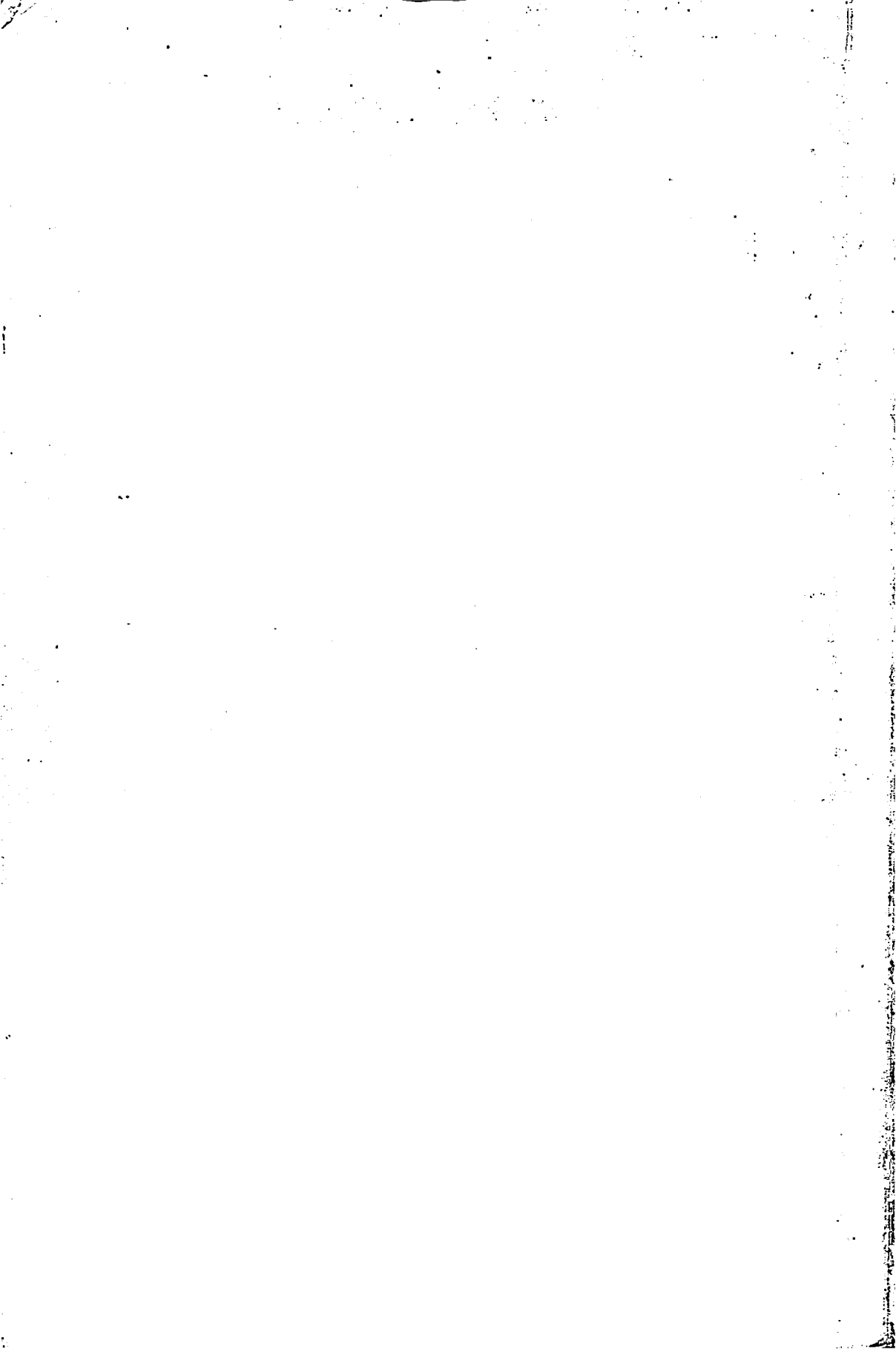


**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
UM ISOLADO DO VÍRUS DO MOSAICO DA
ALFACE (*Lettuce mosaic virus* – LMV)**

FREDERICO ALBERTO DE OLIVEIRA

1999



FREDERICO ALBERTO DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO DO
VÍRUS DO MOSAICO DA ALFACE (*Lettuce mosaic virus* – LMV)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora:

Prof.^a. Dr.^a. Antonia dos Reis Figueira

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1999

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Oliveira, Frederico Alberto de

Identificação e caracterização de um isolado de vírus do mosaico da alface (*Lettuce mosaic virus* - LMC) / Frederico Alberto de Oliveira. -- Lavras : UFLA/FAEPE, 1999.

64 p. : il.

Orientadora: Antonia dos Reis Figueira.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. vírus. 2. *Lettuce mosaic virus* – LMC. 3. Sequenciamento. 4. Potyvirus. 5. Alface. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.52998

-632.8

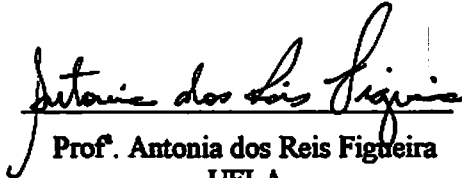
FREDERICO ALBERTO DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO DO
VÍRUS DO MOSAICO DA ALFACE (*Lettuce mosaic virus* – LMV)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA EM 21/07/1999

Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior	UFV
Pesq ^a . Alessandra de Jesus Boari	UFLA
Prof. Antonia dos Reis Figueira	UFLA



Prof.^a Antonia dos Reis Figueira
UFLA
(Orientadora)

Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior
UFV
(Co-orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Ofereço e dedico

Aos meus queridos pais José Rubens e Maria de Oliveira

Aos meus irmãos Flávio e Karla

A Viviane Talamini

Aos demais familiares e amigos

Pelo apoio e incentivo na realização deste trabalho

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Fitopatologia e a todas as pessoas que auxiliaram na realização deste trabalho.

À professora Antonia dos Reis Figueira e ao professor Francisco Murilo Zerbini Júnior, pela orientação e apoio prestados no decorrer deste trabalho.

A Alessandra Boari, pelas valiosas sugestões e contribuições para o enriquecimento deste trabalho.

Aos docentes do Departamento de Fitopatologia, pela contribuição a minha formação e ensinamentos recebidos.

A todos os colegas de curso e funcionários do Departamento de Fitopatologia, que partilharam os momentos bons e também os momentos difíceis desta etapa de minha vida.

Aos colegas Antônio Carlos, Denise, Marcos, Sérgio, Eliana e Aparecida, pelo auxílio e amizade prestadas no decorrer deste trabalho.

A Ellen e ao Carzinho pelas informações e ajuda, fundamentais para a realização deste trabalho.

À amiga e companheira Viviane, pelo incentivo nas etapas mais difíceis, pelo carinho, compreensão e ajuda em todos os momentos.

Finalmente, aos meus queridos pais José Rubens e Maria de Oliveira e aos meus irmãos Flávio e Karla, que sempre apoiaram e acreditaram nas minhas escolhas.

BIOGRAFIA

Frederico Alberto de Oliveira, filho de José Rubens de Oliveira e Maria de Oliveira, nasceu em Várzea da Palma, no Estado de Minas Gerais, em 25 de Maio 1973.

Concluiu o curso primário na Escola Estadual Juscelino Kubstchek no ano de 1988, e o curso científico na Escola Estadual Maurílio de Jesus Peixoto em 1991, na cidade de Sete Lagoas – MG.

Em 1992, ingressou na Escola Superior de Agricultura de Lavras – ESAL na cidade de Lavras – MG onde obteve o Título de Engenheiro Agrônomo no ano de 1996.

Em março de 1997 iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Lavras – MG, sob a orientação da Profª. Antonia dos Reis Figueira e Co-orientação do Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Vírus do mosaico da alface.....	4
2.1.1 Classificação, morfologia e organização genômica.....	4
2.1.2 Sintomatologia e gama de hospedeiras.....	6
2.1.3 Distribuição geográfica e mecanismos de disseminação.....	8
2.1.4 Fonte de resistência em alface e variabilidade dos isolados de LMV.....	10
2.1.5 Controle.....	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 Origem e manutenção dos isolados virais.....	17
3.2 Testes de transmissão mecânica.....	17
3.3 Testes de transmissão com o vetor.....	18
3.4 Teste sorológico ELISA.....	18
3.5 Caracterização inicial do isolado de LMV.....	19
3.6 Inoculação mecânica em diferentes espécies de plantas.....	19
3.6.1 Procura de hospedeiras alternativas.....	19
3.6.2. Estudo dos sintomas em plantas hospedeiras.....	20
3.7 Testes realizados com a nova hospedeira detectada, <i>Crepis</i> <i>japonica</i> (L.) Benth.....	20
3.7.1 Transmissibilidade do LMV pelas sementes de <i>C. japonica</i> (L.) Benth.....	21
3.7.2 Extração de RNA.....	21

3.8 Propriedades das partículas virais <i>in vitro</i>	22
3.9 Caracterização da patogenicidade dos isolados com base na reação induzida em cultivares de alface resistentes e suscetíveis.....	23
3.10 Microscopia eletrônica.....	23
3.11 Estudos moleculares.....	25
3.11.1 RT-PCR.....	25
3.11.2 Clonagem do fragmento de DNA amplificado.....	26
3.11.3 Purificação do plasmídeo e clivagem com enzima de restrição.....	27
3.11.4 Purificação do plasmídeo recombinante.....	27
3.11.5 Sequenciamento.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Inoculação em diferentes espécies de plantas.....	29
4.1.1 Procura de hospedeiras alternativas.....	29
4.1.2 Estudo comparativo dos sintomas induzidos pelos dois isolados de LMV em hospedeiras.....	30
4.2 Testes realizados com <i>Crepis japonica</i> (L.) Benth.....	35
4.2.1 Transmissão pelo inseto vetor <i>Myzus persicae</i>	35
4.2.2 Testes de transmissibilidade pelas sementes.....	36
4.2.3 Extração de RNA viral.....	37
4.3 Propriedades <i>in vitro</i> dos isolados de LMV.....	38
4.4 Patogenicidade do isolado LMV-Cf.....	39
4.4.1 Inoculação em cultivares diferenciadoras.....	39
4.4.2 Inoculação em cultivares comerciais de alface.....	40
4.5 Microscopia eletrônica.....	42
4.6 Estudos moleculares.....	47
4.6.1 RNA viral.....	47

4.6.2 Clonagem e sequenciamento dos fragmentos de RT-PCR.....	49
5 CONCLUSÃO.....	57
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

RESUMO

OLIVEIRA, Frederico Alberto de. Identificação e caracterização de um isolado do vírus do mosaico da alface (*Lettuce mosaic virus* – LMV). Lavras: UFLA, 1999. 64 p. (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia)*

Um vírus infectando alface, proveniente do Estado do Rio de Janeiro, denominado de isolado Cf, (Cf= cabeça fechada) por causa dos sintomas mostrados sobre alface da cv. Regina 579, foi identificado e algumas das suas propriedades biológicas e moleculares foram estudadas. Resultados da inoculação em diversas plantas cultivadas e selvagens, propriedades da partícula viral *in vitro*, transmissão através do vetor *Myzus persicae* Sulz., microscopia eletrônica e do teste sorológico ELISA revelaram ser ele um isolado do vírus do mosaico da alface (“lettuce mosaic virus” – LMV). Um outro isolado do LMV, denominado de LMV-AF198, pertencente ao patótipo II, foi utilizado como controle e os resultados obtidos foram comparados. Esses dois isolados de LMV foram inoculados em oito cultivares de alface brasileiras: Regina 71, Babá de verão, Salad-Bowl, tipo crespa, Hortência, Carolina, Tainá, e Monalisa e também em quatro cultivares de alface resistentes: Malika (*mol¹*), Gallega de Inverno (*mol¹*), Salinas (*mol²*) e Vanguard (*mol²* e Mo2), carregando diferentes genes de resistência usados para classificar isolados de LMV dentro de patótipos. Várias plantas daninhas e cultivadas foram inoculadas mecanicamente com LMV-Cf e LMV-AF198. Entre estas plantas a planta daninha denominada *Crepis japonica* (L) Benth., que foi encontrada nas proximidades de uma horta no município de Lavras – MG., foi infectada com ambos isolados de LMV. Essa planta, ainda não descrita na literatura como hospedeira para o LMV, pode ser considerada como mais uma hospedeira alternativa para esse vírus em condições de campo. Não se conseguiu a transmissão do LMV através das 1.068 sementes provenientes de plantas de *C. japonica* infectadas. Cinco das hospedeiras testadas (alface cv. Regina-579, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *C. japonica* e *Pisum sativum* cv. Torta de Flor Roxa) mostraram diferentes sintomas para cada isolado e permitiram fazer uma clara distinção entre a virulência de LMV-Cf e LMV-AF198. As propriedades *in vitro* do LMV-CF foram: ponto final de diluição: 10^{-3} , ponto de inativação térmica: 50°C; longevidade *in vitro* em três temperaturas: 21°C: 3 dias; 4°C: 14 dias e -20°C: 72 dias. O LMV-CF foi transmitido através do vetor *M. persicae* para plantas de

* Comitê Orientador: Antonia dos Reis Figueira - UFLA (Orientadora) e Francisco Murilo Zerbini Júnior - UFV.

alface e de *C. japonica*, quando ambas as plantas foram utilizadas como fonte de inóculo. Observações ao microscópio eletrônico permitiram a visualização de partículas filamentosas e flexíveis, em preparações de vírus semipurificados, e de inclusões do tipo cata-vento em cortes ultrafinos de tecidos alface infectados, que são características do gênero *Potyvirus*. As partículas virais de ambos os isolados, quando submetidos à técnica de microscopia eletrônica de imunoadsorção, mostraram a mesma intensidade de decoração, indicando que o LMV-CF e o LMV-AF198 devem ser estreitamente relacionados serologicamente. As oito cultivares de alface inoculadas foram suscetíveis ao LMV-CF e todas elas foram ELISA positivas quando inoculadas com o LMV-AF198, mas as cultivares Hortência e Tainá não apresentaram sintomas, indicando que estas cultivares tem uma alta tolerância a esse isolado. A inocula o dos dois isolados nas cultivares resistentes não induziram sintomas e o teste ELISA foi negativo. Baseado nesses resultados o isolado LMV-CF pode ser classificado nos patótipos I ou II. A concentra o de RNA viral, obtido de preparações minipurificadas a partir de tecidos infectados de *C. japonica*, foi bastante alta indicando a possibilidade de se fazer uso desta planta, para a multiplica o de LMV, visando a realiza o de estudos moleculares. O alinhamento da sequência genômica do terminal 5' da capa proteica do LMV-Cf mostrou uma alta homologia desse isolado com isolados de LMV da Califórnia e da França indicando que, provavelmente, todos eles devem ter a mesma origem geográfica.

ABSTRACT

Oliveira, Frederico Alberto de. Identification and characterization of an isolate of *Lettuce mosaic virus* - LMV. Lavras: UFLA, 1999. 64p. (Dissertation—Master Program in Phytopathology)

A lettuce virus coming from the State of Rio de Janeiro – Brazil, named Cf (Cf= cabeça fechada = closed head) because of the symptoms shown on the lettuce plant cv. Regina 579, was identified and some of its biological and molecular properties were studied. Results of the inoculation in several hosts, *in vitro* properties of virus particles, vector transmission, electron microscopy and ELISA tests demonstrated it was a lettuce mosaic virus (LMV) isolate. Another LMV isolate named LMV-AF198, belonging to pathotype II group, was used as control, and the properties of both were compared. Afterwards, these two LMV isolates were inoculated in eight Brazilian lettuce cultivars: Regina 71, Babá de verão, Salad-Bowl, Tipo crespa, Hortência, Carolina, Tainá and Monalisa and also in four resistant lettuce cultivars: Malika (*mol*¹), Gallega de Invierno (*mol*¹), Salinas (*mol*²) and Vanguard (*mol*² e Mo2), carrying different resistance genes used to classify LMV isolates into pathotype groups. Several weeds and cultivated plants were mechanically inoculated with LMV-cf and LMV-AF198. Among those plants, *Crepis japonica* (L), a weed which was found growing around lettuce fields in the municipality of Lavras-MG, Brazil, was infected with both LMV isolates, suggesting that it can be a new LMV alternative host at field conditions. This weed was not yet described as a host in the literature. In addition, five plant host species (lettuce cv. Regina-579, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *C. japonica* and *Pisum sativum* cv. Torta de Flor Roxa) showed different symptoms for each isolate and allowed to make a clear distinction between the virulence of LMV-Cf and LMV-AF198. The *in vitro* properties of LMV-cf were: thermal inactivation point: 50°C; final dilution point: 10⁻³; longevity *in vitro*: 3 days at 21°C, 14 days at 4°C and 72 days at -20°C. The LMV-cf was transmitted by *Myzus persicae* to lettuce and to *C. japonica* when both host plants were used as inoculum source. The LMV-Cf particles seen at electron microscopy were elongated and flexuous and the examination of ultrathin sections of lettuce infected tissues showed a lot of pinwheel inclusions, typical of the *Potyvirus* genus. Serologically specific electron microscopy of both LMV isolates showed no difference between the

* Guidance Committee: Antonia dos Reis Figueira - UFLA (Major Professor) and Francisco Murilo Zerbini Júnior - UFV

particles decoration indicating that they might be closely related. The eight Brazilian lettuce cultivars were susceptible to LMV-Cf isolate and all of them were ELISA positive for LMV-AF198 isolate but the cultivars Hortência and Tainá showed no symptoms, which means they are highly tolerant to LMV-AF198. The inoculation of both isolates in resistant lettuce cultivars induced no symptoms and were ELISA negative. Based on these results the LMV-cf isolate could be classified either in pathotype II or in pathotype I group. High concentration of LMV RNA was obtained when extracted from infected tissues of *C. japonica*, indicating that it can be a feasible host to multiply LMV for molecular studies purposes. The sequence alignment of 5' terminus of LMV-CF coat protein region showed a high homology with California and France isolates, suggesting they must have come from the same geographical region.

1 INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.), originária do Mediterrâneo, foi uma das primeiras hortaliças a ser cultivada pelo homem (2.400 anos A.C.). Pertencente ao gênero *Lactuca*, família *Compositae*, é a hortaliça folhosa de maior aceitação pela população brasileira, consumida principalmente como salada. Rica em vitaminas e sais minerais, é uma das melhores fontes de vitamina A, possuindo ainda as vitaminas B1, B2 e C e sais minerais como cálcio e ferro.

A alface é comumente produzida nos chamados “cinturões verdes” dos grandes centros consumidores, por ser altamente perecível. Para muitos produtores, essa hortaliça representa uma ótima fonte de renda, com um rápido retorno do investimento empregado. Devido ao seu intenso cultivo e ao seu ciclo de vida curto, os dados de produção e área cultivada com essa hortaliça, são de difícil obtenção. No entanto, sabe-se que cerca de 26 cultivares são plantadas no Brasil (Silva, Rebelo e Müller, 1995), sendo que, de acordo com dados do CEAGESP e CEASAS, em 1993 foram comercializadas 60.967 t. de alface produzidas em uma área de 4.026 ha (Camargo et al., 1993).

Várias são as doenças que podem afetar a alface, sendo algumas delas de grande importância na produção. Entre as principais doenças, que causam problemas em lavouras comerciais, encontram-se as fúngicas, bacterianas e viróticas.

As doenças de etiologia viral ocupam um papel de destaque, devido ao fato de não possuírem controle curativo e se propagarem com muita facilidade, principalmente devido ao plantio escalonado da cultura. Diversos vírus podem infectar a alface, causando sintomas de mosaico: o vírus do mosaico da alface (“*Lettuce mosaic virus*” – LMV) (Jagger, 1921); vírus do mosaico do picão (*Bidens mosaic virus* - BMV) (Kitajima, Carvalho e Costa, 1961); vírus do

mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus* - CMV) (Thomson e Procter, 1966); vírus do mosqueado da alface (*Lettuce mottle virus* - LMoV) (Kitajima et. al., 1980); vírus do mosqueado do picão (*Bidens mottle virus* - BiMoV) (Purcifull et. al., 1971); vírus do mosaico do nabo (*Turnip mosaic virus* - TuMV) (Zink e Duffus, 1969) e o vírus do vira-cabeça do tomateiro ("*Tomato spotted wilt virus*" - TSWV), este último, geralmente acompanhado de sintomas necróticos (Costa e Forster, 1942).

No Brasil, o LMV foi relatado pela primeira vez por Kramer Orlando e Silberrschmidt (1945) e tem sido o mais importante em termos de ocorrência e de perdas provocadas na cultura da alface em todo o mundo (Grogan, 1980). Por ser um vírus facilmente transmitido por sementes e por afídeos, de modo não-circulativo (Tomlinson, 1970), ele se encontra disseminado por todo o mundo, provavelmente devido ao intercâmbio de sementes através do comércio internacional (Dinant e Lot, 1992), podendo resultar em 100% de perdas na produtividade (Grogan, 1980). Nas condições nacionais, onde a população do afídeo vetor geralmente é alta o ano todo, dificilmente se consegue a produção de sementes livres de vírus. Por isso, cerca de 40% das sementes utilizadas são importadas (Silva, Rebelo e Müller, 1995).

O uso de sementes sadias é uma das mais importantes medidas de controle para o LMV (Broadbent et al.; Grogan, 1952; Zink, Grogan e Welch, 1956; Tomlinson, 1962). Entretanto, para que essa apresente maior eficácia, precisa ser associada a métodos culturais adequados e ao uso de cultivares com resistência genética ao patógeno. Por outro lado, o uso de cultivares com resistência genética deve considerar a possibilidade da existência de isolados do LMV capazes de superá-la (Pink, Lot e Johnson, 1992).

Em diversos países da Europa e nos Estados Unidos, estudos de variabilidade e patogenicidade do LMV têm revelado a existência de diferentes isolados, capazes de infectar algumas variedades de alface consideradas

resistentes (Pink, Kostova e Walkey, 1992; Pink, Lot e Johnson, 1992; Zerbini, Koike e Gilbertson, 1995; Revers et al., 1997 a e b). Pouco se conhece sobre os isolados existentes no Brasil devido à escassez de trabalhos nessa área. Entretanto, Stangarlin (1997) constatou, em plantios comerciais do Estado de São Paulo, a presença dos patótipos II e III e, na maioria dos casos, a presença do patótipo IV, para o qual não existe fonte de resistência descrita em *Lactuca sativa*.

Recentemente foram analisadas no Departamento de Fitopatologia da UFLA, plantas de alface procedentes do estado do Rio de Janeiro, com sintomas diferentes daqueles causados pelos vírus que têm sido comumente observados na região de Lavras-MG. A principal diferença entre eles foi notada na alface cultivar Regina 579, em que os isolados de LMV da região causam sintomas de mosaico e má formação foliar, enquanto que o novo vírus, além de apresentar sintomas de mosaico, causou o fechamento das folhas da planta, formando uma espécie de cabeça compacta.

Estudos preliminares, baseados na inoculação de plantas indicadoras, evidenciaram a possibilidade desse vírus ser um isolado do LMV. O presente trabalho teve como objetivo a realização de estudos biológicos complementares, utilizando um maior número de hospedeiras experimentais e cultivadas, a determinação das suas propriedades físico-químicas e o estudo do seu genoma através de RT-PCR, seguido do sequenciamento de nucleotídeos.

A identificação desse novo isolado poderia revelar se ele pertence aos grupos de LMV já conhecidos, no Brasil e no exterior, ou se poderia se tratar de um isolado ainda não descrito na literatura, fornecendo subsídios para o seu controle em condições de campo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Vírus do mosaico da alface

O LMV teve sua primeira descrição na Florida, EUA, por Jagger (1921). Em seguida, Newball (1923) demonstrou que o LMV era transmitido via semente e no ano de 1950, foi considerado o principal vírus em alface na Europa e nos Estados Unidos. No Brasil, esse vírus foi relatado pela primeira vez por Kramer, Orlando e Silberrschmidt (1945), e atualmente é considerado o mais importante vírus na cultura da alface (Stangarlin, Silva e Pavan, 1995a e b; Stangarlin, 1997).

2.1.1 Classificação, Morfologia e Organização genômica

Para a definição de gênero e espécie existem dois parâmetros para a taxonomia de *Potyvirus*. A biologia molecular, tais como sequenciamento de genes, hibridização de ácido nucléico e sequenciamento da capa protéica, e propriedades fenotípicas, como morfologia das partículas, círculo de hospedeiros, sintomatologia, proteção cruzada, morfologia das inclusões citoplasmáticas e sorologia (Shukla, Ward e Brunt, 1994).

Dentro dos *Potyvirus*, a sequência do gene da capa protéica é muito utilizada como ferramenta taxonômica e, em geral, garante diferenciações entre espécies de vírus (Fraser, 1990; Ward e Shukla, 1991), além das propriedades biológicas que apresentam grande importância na identificação de isolados (Pink, Kostova e Walkey, 1992a; Pink, Lot e Johnson, 1992 b; Bos, Huijberts e Cuperus, 1994; Zerbini, Koike e Gilbertson, 1995; Zerbini, 1999).

A família *Potyviridae* é definida com base em critérios morfológicos e na sua constituição genômica. Os vírus dessa família apresentam partículas filamentosas e flexuosas com 11-15 nm de diâmetro e um comprimento de 650-900 nm para membros do gênero *Potyvirus* e *Rymovirus*, e partículas de 250-

300nm e 500-600 nm para membros do gênero *Bymovirus*. Essa família é constituída de RNA de fita simple, do tipo infeccioso, e está atualmente distribuída em três gêneros definitivos: *Potyvirus* (genoma com um componente e transmissão por afídeo), *Rymovirus* (genoma com um componente e transmissão por ácaro), *Bymovirus* (genoma com dois componentes e transmissão por fungos). A diferenciação entre os gêneros é feita de acordo com o tipo de vetor e o número de componentes do ácido nucleico.

Existem dois possíveis gêneros ainda não reconhecidos dentro dessa família: o gênero *Ipomovirus* (genoma com um componente e transmissão por mosca-branca) e *Macluravirus* (transmissão por afídeo) (Murphy et al., 1995; Zerbini et al., 1999).

Uma característica importante dos gêneros dessa família é a indução da formação de inclusões cilíndricas no citoplasma das células infectadas. As inclusões geralmente são vistas como cata-vetos em cortes transversais e como feixes em cortes longitudinais (Shukla, Ward e Brunt, 1994).

O genoma dos *Potyvirus* é composto por aproximadamente 10.000 nucleotídeos, uma proteína viral VPg ligada no terminal 5' e uma cauda poli-A no terminal 3' (Shukla, Ward e Brunt, 1994). O genoma do LMV contém uma única ORF ("open reading frame") que codifica uma poliproteína, que é autoclivada por proteases, originando dez proteínas denominadas de VPg, P1, HC-Pro, P3, 6K₁, CI, 6K₂, NIa, Nib e CP (Riechmann et al., 1992). As extremidades 5' e 3', não traduzíveis, possuem um comprimento de 103 nt. e 212 nt respectivamente (Rivers et al., 1997b). O gene da capa protéica, localizada no terminal 3' do RNA, codifica uma proteína com 278 aminoácidos, o que corresponde a uma massa molecular de 35kDa (Dinant et. al, 1991).

Revers et al. (1997b), estudando o genoma completo dos isolados LMV-0 e LMV-E, encontrou uma grande variabilidade na proteína P1 e na região N-

terminal da capa protéica, enquanto que a protease NIa, proteína NIb, e o terminal 3' (região não traduzida) são extensivamente conservadas.

A sequência parcial de nucleotídeos ou aminoácidos da região da capa protéica tem sido muito utilizada tanto para diferenciar espécies dentro do gênero *Potyvirus*, como para estudar outros isolados dentro de uma mesma espécie (Shukla e Ward, 1989a e b; Zerbini Koike e Gilbertson, 1995; Rivers et al., 1997a e b).

As diferentes espécies de *Potyvirus* possuem uma identidade de aminoácidos da capa protéica menor que 70%, enquanto isolados da mesma espécie de *Potyvirus* tem uma identidade maior que 90% (Ward e Shukla, 1991; Shukla e Ward, 1989a e b; Revers et al., 1997a).

2.1.2 Sintomatologia e Gama de Hospedeiras

Como na maioria das doenças causadas por vírus, os sintomas no campo variam consideravelmente com a cultivar, isolado viral, estágio de infecção e condições ambientais.

Os sintomas em alface tipo lisa são fáceis de reconhecer e se caracterizam por enfezamento, cabeça defeituosa, mosqueado, algumas distorções foliares e amarelecimento. Ocasionalmente podem ocorrer manchas necróticas ou necrose nas nervuras, dependendo da cultivar e do isolado. Quando as plantas são infectadas ainda novas, as folhas internas permanecem enfezadas e mal desenvolvidas, resultando no definhamento das plantas (Grogan, Welch e Bardin, 1952; Grogan, 1983 e Tomlinson, 1970).

As variedades de alface do tipo crespa, além de apresentar o mesmo tipo de sintomas da alface tipo lisa, mostra ainda o clareamento das nervuras, e manchas necróticas. Quando as plantas são infectadas no estágio inicial do ciclo vegetativo, podem ser observados enfezamento e deformação foliar. Na Califórnia, a síndrome descrita como "June yellows" nas cultivares crespas é

caracterizada por amarelecimento das folhas mais baixas e redução no desenvolvimento (Grogan, 1980), e tem sido atribuída à infecção pelo LMV, mas alguns autores duvidam que esse seja o único responsável por esta síndrome e sugerem que o vírus do amarelo da beterraba "*Beet western yellows virus*" também pode estar envolvido (Duffus, 1960).

Isolados mais agressivos causam reduções severas no desenvolvimento, necrose e morte ocasional em cultivares suscetíveis. Nas cultivares resistentes, os sintomas induzidos por isolados mais comuns de LMV podem variar de ausência de sintomas a um leve mosqueado ou mancha, dependendo do "background" genético da cultivar (Dinant e Lot, 1992).

Plantas daninhas infectadas, nas proximidades da cultura, podem ser importantes hospedeiras, pois constituem um reservatório de vários vírus que infectam espécies cultivadas (Shukla, Ward e Brunt, 1994). Elas propiciam a sobreposição de gerações de vírus, podendo manter o LMV por um longo período no campo, durante a ausência da cultura. Portanto, o conhecimento das possíveis hospedeiras do vírus é de grande importância, a fim de se estabelecer um método de controle adequado.

O LMV pode ser transmitido experimentalmente para uma ampla gama de hospedeiras, pertencentes a 120 diferentes espécies em 60 gêneros e 16 famílias botânicas. Ocasionalmente, novas espécies de plantas hospedeiras tem sido detectadas. Zerbini, Koike e Gilbertson (1995) relataram, em Salinas Valley, na Califórnia, uma nova hospedeira do LMV, descrita como *Gazania* spp. Entretanto, a alface é a principal espécie cultivada suscetível ao vírus, seguida pela chicória, escarola, espinafre, ervilha, grão de bico e açafrão (Dinant e Lot, 1992).

Algumas espécies de plantas têm sido rotineiramente empregadas como hospedeiras indicadoras de LMV, com base nos sintomas macroscópicos causados pelo vírus na planta, como lesão local (L) e/ou sistêmico (S). As

espécies comumente usadas são: *Gomphrena globosa* (L), *Chenopodium quinoa* (L, S) *C. amaranticolor* (L,S) *Carthamus tinctorius* (L, S) e *Nicotiana benthamiana* (S). Além de indicadora, a *N. benthamiana* também tem sido rotineiramente usada por diversos autores como hospedeira para a propagação e purificação do vírus (Zerbini, Koike e Gilbertson, 1995; Dinant e Lot, 1992; Tomlison, 1970; Moghal e Francki, 1976).

2.1.3 Distribuição geográfica e mecanismos de disseminação

O LMV ocorre no mundo inteiro, e tem sido considerado o vírus de maior importância na cultura da alface devido aos prejuízos por ele causados (Tomlison, 1962; Grogan, 1980).

Como acontece com quase todos os *Potyvirus* já relatados, o LMV é transmitido de um modo não-circulativo pelo vetor *M. persicae* (Sylvester, 1955). Apesar deste ser o vetor mais eficiente, a sua transmissão experimental já foi conseguida com outras 19 espécies de afídeos, pertencentes a 12 gêneros (Shukla, Ward e Brunt, 1994; Tomlinson, 1996).

Esse vírus é também transmitido de modo bastante eficiente através das sementes de alface. A infecção dessas sementes ocorre através do pólen e do óvulo de plantas infectadas (Ryder, 1964). O vírus pode estar presente no embrião, como também no tegumento, endosperma e pericarpo, ocorrendo na maioria das vezes em baixa concentração (Ryder, 1973). Outras espécies como, *Chenopodium quinoa*, *Lactuca serriola*, *Lactuca virosa* e *Senecio vulgares* também transmitem o vírus via semente, embora com uma taxa mais baixa (Shukla, Ward e Brunt, 1994).

Grogan (1983), investigando áreas de cultivo de alface em período de emergência, observou que cerca de aproximadamente 1 a 3% das mudas no campo apresentavam sintomas da virose. Isso o levou a atribuir este fato à utilização de semente comercial infectada. Esse autor observou ainda que, pela

semeadura padrão utilizada (1600 gramas / hectare), a maior parte das áreas tiveram aproximadamente uma planta infectada em cada metro linear no período de emergência da muda. Em condições ambientais favoráveis, houve aumento na população de afídeos e, conseqüentemente, na infecção, ocorrendo uma epidemia.

No Reino Unido, Campos de produção de alface, originados de lotes com 0,5% e 3% de sementes infectadas com o LMV, apresentaram incidências finais de 14% e 85%, respectivamente, quando as plantas estavam no estágio final de comercialização (Broadbent et al., 1951).

Grogan, Welch e Bardin (1952) observaram que, em áreas plantadas com sementes livres do LMV, houve um decréscimo altamente significativo de plantas infectadas quando essas foram comparadas ao número de plantas infectadas nas áreas adjacentes semeadas com semente comercial contendo o vírus. Observou-se ainda que as sementes infectadas foram de grande importância como fonte de inóculo primário, transmitindo o vírus através de afídeos vetores para áreas semeadas com sementes livres de vírus. Eles concluíram ainda que a propagação do vírus de plantios anteriores para campos com novos plantios foi de grande importância. Os resultados de campo mostraram que a disseminação do LMV sob as condições da Califórnia era, sobretudo, um fenômeno local, e que o uso de semente livre de vírus era um meio efetivo para o controle da doença em grandes plantios.

Em estudo mais detalhado no Vale de Salinas, Califórnia, notou-se claramente que a incidência final de LMV na cultura da alface foi dependente não apenas do índice inicial de transmissão pelas sementes, mas também da atividade e nível da população do afídeo vetor (Zink, Grogan e Welch, 1956).

Ryder (1973) demonstrou que linhagens suscetíveis transmitiram o vírus através das sementes em uma taxa média de 2% por planta, enquanto que, nas linhagens resistentes, a taxa de transmissão foi extremamente baixa, com uma

média de 0,49%. Segundo o autor, o ambiente parece ter afetado essa taxa de transmissão, pois ela aumentou à baixa temperatura. Outros autores como Marrou (1969) e Bannerot et al. (1969) acreditam que as poucas sementes das cultivares de alface resistentes ao LMV, que transmitem o vírus, podem se originar a partir de cruzamentos acidentais, com cultivares suscetíveis, ocorridos no campo.

Na Califórnia, têm sido relatados alguns grandes surtos de LMV não associados com a transmissão do vírus por sementes. Existem evidências de que a ocorrência destes surtos estava associada à multiplicação do vírus em espécies de plantas não cultivadas presentes próximas a campos de produção de alface (Zerbini, Koike e Gilbertson, 1997; Zink, Duffus e Kimble, 1973).

2.1.4 Fonte de resistência em alface e variabilidade dos isolados de LMV

A resistência de plantas de alface ao LMV foi originalmente identificada na cultivar Argentina “Gallega de Invierno” por Von der Pahlen e Cmko (1965). Bannerot et al. (1969) determinaram que essa resistência estava ligada a um único gene recessivo denominado *g* (*mol*¹). Mais tarde, nos Estados Unidos, Ryder (1970) encontrou em acessos de *Lactuca sativa* originárias do Egito, fontes de resistência ligada a um outro gene recessivo, denominado *mo* (*mol*²).

Segundo Pink, Lot e Johnson (1992b) os genes *g* e *mo*, que conferem resistência ao LMV, denominados *mol*¹ e *mol*², são recessivos e acredita-se que eles estejam bem próximos ou sejam alélicos. Um outro terceiro gene, *Mo2*, gene dominante, não é um gene efetivo para o controle do LMV, por ser quebrado pela maioria dos isolados (Revers et al., 1997a).

Durante muitos anos, a resistência ao LMV foi proporcionada pelos genes *g* e *mo*. Só recentemente foram registradas infecções severas em alguns campos de cultivo devido ao aparecimento de novos patótipos de LMV,

mostrando que essa resistência pode ser considerada do tipo durável, o que não implica que ela seja permanente (Pink, Lot e Johnson, 1992).

Diversos variantes do LMV têm sido detectados e descritos por diferentes pesquisadores dos Estados Unidos e de diversos países da Europa. McLean e Kinsey (1962) diferenciaram três variantes, que denominaram de variante 1, 2 e 3, provenientes de plantas de alface infectadas na Califórnia. A sua classificação foi feita com base na severidade dos sintomas induzidos e na patogenicidade em cultivares de alface Great Lakes e Parris Island, *Senecio vulgares*, *Picris echioides* e *Pisum sativum*. O variante 1 induziu sintomas mais intensos, enquanto os variantes 2 e 3 pareceram proteger a planta contra o primeiro variante. Posteriormente, esses autores identificaram o quarto variante, a partir de plantas de *Chenopodium album* infectadas com o LMV. Este variante induziu sintomas bem mais severos que os provocados pelas outras três variantes, pois a maioria das plantas de alface inoculadas morreu logo após a expressão dos sintomas. Testes de proteção cruzada mostraram que o variante 1 protegeu a planta contra o variante 4 (McLean e Kinsey, 1963).

Zink, Duffus e Kimble (1973), descreveram um novo isolado virulento de LMV (LMV-L) encontrado na espécie daninha *Picris echioides*, que serviriam de fonte de LMV. Este isolado causou uma alta porcentagem de morte de plantas ou grande quantidade de necrose nas folhas de alface. Ele foi letal para muitas cultivares de alface, bem como para a cultivar Gallega de Invierno, portadora do gene *g (mo1¹)* de resistência.

Pink, Lot e Johnson (1992) testaram seis isolados de LMV provenientes da Inglaterra (LMV-W), Yemen (LMV-YAR), Estados Unidos (LMV-F), Grécia (LMV-G), Espanha (LMV-E) e França (LMV-9), que foram descritos como causadores de sintomas atípicos em plantas de alface. Os mesmos autores agruparam estes isolados em 4 patótipos de acordo com a sua capacidade de infectar a cultivar suscetível Saladin, e as cultivares contendo diferentes genes

de resistência: Ithaca (*Mo2*), Vanguard 75 (*Mo2* e *mol²*), Salinas 88 (*mol²*), e as cultivares Malika e Calona (*mol¹*) (Tabela 1). A partir desse trabalho, essas cultivares passaram a ser chamadas de cultivares diferenciadoras dos patótipos de LMV que infectam a alface.

TABELA 1- Classificação de cultivares de alface de acordo com seus genes de resistência e seus genes de resistência

Cultivares diferenciadoras	Genes de resistência	Patótipos			
		I	II	III	IV
Salinas		S	S	S	S
Ithaca	<i>Mo2</i>	R	S	S	S
Malika	<i>mol¹</i>	R	R	S	S
Calona	<i>mol¹</i>	R	R	S	S
Salinas 88	<i>mol²</i>	R	R	R	S
Vanguard 75	<i>mol²</i> e <i>Mo2</i>	R	R	R	S

Pink, Kostova e Walkey (1992) sugeriram que a habilidade do vírus em se replicar em cultivares consideradas resistentes oferece uma pressão de seleção para o aparecimento de formas mais patogênicas do vírus, capazes de superar a resistência de cultivares. Entretanto, existe uma variabilidade natural sem utilizar cultivares com gene de resistência.

Bos, Huijberts e Cuperus (1994) verificaram que a cultivar Salinas 88, resistente aos patótipos I, II e III, foi suscetível ao isolado da Grecia (Gr5). Segundo esses autores, o isolado Gr5 parece ser um novo patótipo de LMV, não agrupando dentro dos patótipos descritos por Pink, Lot e Johnson (1992).

Apesar da alface ser intensamente cultivada na Califórnia, o não aparecimento de variantes genéticos ao longo do tempo tem se mostrado relativamente surpreendente. Uma possível explicação para esse fato está no

método de controle, baseado apenas no uso de sementes indexadas, manejo de plantas daninhas e período com a ausência da cultura. Já na Europa, o controle é baseado no uso de cultivares resistentes, o que pode causar uma grande pressão de seleção no vírus, resultando na emergência de novos patótipos (Zerbini, Koike e Gilbertson, 1995). A resistência, no entanto, é do tipo durável e pode ser notado, como exemplo, pelo patótipo IV, que tem sido primeiramente identificado em áreas onde o cultivo de alface é extremamente extenso e contínuo, tais como no Sul da França e na Espanha. Pode aparecer também em diferentes espécies de plantas cultivadas, como em chicória (Pink, Lot e Johnson, 1992b).

Zerbini, Koike e Gilbertson (1995), utilizando cultivares de alface diferenciadoras para os dez isolados provenientes da Califórnia, detectaram através do teste I-ELISA, o LMV em algumas plantas inoculadas, especialmente naquelas cultivares que possuíam o gene *mo* (*moI²*), que permaneceram sem sintomas. Esses isolados estudados mostraram ser pertencentes ao patótipo II. A maioria das diferenças foram localizadas na região N-terminal, sendo referida por eles como a região hipervariável e já descrita por Shukla e Ward (1989a) como a região mais variável do genoma viral. Através do resultado de caracterização molecular, obtido por Zerbini Koike e Gilbertson (1995), foi indicado que os novos isolados de LMV possuíam uma variação de até 12% na sequência de aminoácidos encontrada na região N-terminal do gene da proteína da capa. Mesmo assim, esses novos isolados não diferiram na caracterização biológica, tendo sido classificados como patótipo II.

Mello et al. (1998), estudando dois isolados do Brasil, caracterizados como patótipo II e patótipo IV, não obtiveram nenhuma separação distinta quando os compararam com os isolados da França e América do Norte, tendo estes apresentado homologias maiores que 95%. Entretanto, na análise filogenética, os isolados do Brasil foram classificados dentro do grupo de

isolados denominado LMV-0 (patótipo II) e LMV-E (patótipo IV) da Europa, indicando uma origem comum.

A emergência de novos isolados de LMV, na Europa, causando sintomas severos em cultivares comerciais de alface e o relato na Califórnia de isolados muito agressivos têm provocado o interesse no estabelecimento de um melhor entendimento da interação molecular entre o LMV e a planta de alface (Revers et al., 1997a).

Revers et al. (1997a), trabalhando com diferentes isolados de LMV, observaram que a maioria das cultivares de alface inoculadas apresentaram sintomas não típicos de mosaico, mas sim um clareamento de nervuras, pontuação amarela e nanismo. Os resultados do teste de patogenicidade, incluindo sintomas e multiplicação, mostraram evidências de que os isolados diferiram em virulência e agressividade.

No Brasil, poucos estudos têm sido desenvolvidos com o LMV. Stangarlin, Silva e Pavan (1995a) constataram que nas regiões produtoras de alface, do Estado de São Paulo, cerca de 70% das plantas de alface, de cultivares resistentes ao LMV, apresentaram sintomas de mosaico. Nessa ocasião, foi possível observar que das 54 amostras de alface infectadas coletadas naquela região, 38 eram procedentes de cultivares resistentes, o que sugeriu a presença de variantes de LMV para as quais os genes de resistência presentes não eram efetivos. Esses autores determinaram que alguns desses isolados eram pertencente ao patótipo III, que posteriormente foi denominado como patótipo IV devido às modificações na classificação feitas por Pink, Lot e Johnson (1992). Mais tarde, estudando outros isolados dessa mesma região, eles constataram a presença do patótipo II e III e, na maioria dos casos, do patótipo IV, para o qual não existe fonte de tolerância descrita em *Lactuca sativa* (Stangarlin, Silva e Pavan, 1996).

2.1.5 Controle

Em vários países têm-se desenvolvido programas de certificação para assegurar a obtenção de sementes de alface livres de vírus. Estes incluem o estabelecimento da cultura em área não favorável à atividade de populações de afídeos vetores e uma razoável distância de plantios comerciais, além do uso de barreiras naturais, utilização de sementes sadias, uso de inseticidas e um eficiente controle de plantas daninhas próximas a áreas de plantio (Dinant e Lot, 1992)

O uso de sementes livres de vírus é o melhor controle da propagação do LMV em campos comerciais de alface. As técnicas sorológicas, que podem detectar o vírus em baixas concentrações (ng) em sementes infectadas, são agora amplamente utilizadas para a detecção tanto do LMV como de outros *Potyvirus* (Jafarpour, Shepherd e Grogan, 1979; Ghabrial e Shepherd, 1980, Dolores-Talentes, Hill e Durand, 1989). Segundo Dinant e Lot (1992), vários países abandonaram os testes biológicos para utilizar o teste sorológico ELISA.

Nos Estados Unidos, o programa de indexação de sementes, que seleciona as sementes com ausência de vírus, aliado ao controle de plantas daninhas e um período livre da cultura da alface, tem se mostrado um método eficiente para o controle do LMV (Shukla, Ward e Brunt, 1994, Zerbini, Koike e Gilbertson, 1995). Embora o uso de cultivares de alface resistentes seja recomendável, ele não tem sido permanentemente usado provavelmente devido ao sucesso do programa de indexação.

Nos países da Europa e em alguns países de outros continentes, o nível oficial de tolerância de vírus nas sementes é de 0,1% (Dinant e Lot, 1992; Grogan, 1980; Bos, Huijberts e Cupurus, 1994) e o controle é baseado no uso de cultivares resistentes, o que pode causar uma grande pressão de seleção no vírus, resultando na emergência de novos isolados virulentos (Zerbini, Koike e Gilbertson, 1995).

Na tentativa de se obter um controle aceitável para o LMV, Grogan (1983) trabalhou com porcentagens de sementes infectadas com o vírus, variando entre 0,0 a 1,6% de infecção. A redução na quantidade de sementes infectadas causou o decréscimo de plantas infectadas pelo LMV até a colheita. Os dados mostraram ainda que a transmissão por sementes, com uma incidência de 0,1% do LMV, não forneceu um controle adequado para o vírus, tendo atingido uma média de 23% de plantas infectadas no final da cultura. Em outros testes o nível de infecção foi extremamente variável, sendo que os resultados foram dependentes da atividade e da população de afídeos vetores nos diferentes locais.

Pink, Lot e Johnson (1992) ressaltaram a importância de se considerar o patótipo de LMV em programas de melhoramento, visando a incorporação de resistência ao LMV em alface, e a necessidade de se procurar novas fontes de resistência a esse vírus, devido ao aparecimento desses novos isolados.

A moderna Biotecnologia trouxe novas aplicações no controle de certas doenças. O uso de plantas geneticamente modificadas (plantas transgênicas) tem sido feito em alguns países como Argentina (Soja, milho e algodão), Canadá (Milho, algodão, canola, soja, melão, batata e trigo), Japão (Soja, canola, batata, milho, algodão e tomate), entre outros países (Biossegurança/ CTNBio).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Origem e manutenção dos isolados virais

O isolado de LMV empregado neste estudo foi proveniente de uma área de cultivo de alface, localizado no Estado do Rio de Janeiro. Deu-se o nome de "cabeça fechada" (LMV-Cf) a esse isolado, pelo fato de induzir o fechamento da cabeça de alface da cultivar "Regina 579". Como controle, foi utilizado um isolado pertencente ao patótipo II (LMV-AF198), cedido pelo professor Francisco Murilo Zerbini Júnior da Universidade Federal de Viçosa - UFV. Folhas de *Chenopodium quinoa* e alface, infectadas por esses isolados, foram desidratadas com cloreto de cálcio e armazenadas no freezer (-20°C). Esses isolados, foram também mantidos em plantas de alface (*Lactuca sativa* L.) cultivar Regina 579 e *C. quinoa*, sob condições de casa-de-vegetação, no Departamento de Fitopatologia da UFLA.

3.2 Testes de transmissão mecânica

Para a inoculação mecânica, o extrato foi obtido por maceração de folhas de plantas infectadas, na presença de nitrogênio líquido, com posterior adição de tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0, contendo sulfito de sódio na mesma molaridade, na proporção de 1g de folha /5ml de solução. Este extrato foi aplicado nas folhas das plantas, previamente polvilhadas com o abrasivo Carborundum (500 mesh), que foram em seguida lavadas para a retirada do excesso de inóculo. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação durante toda a condução dos experimentos.

3.3 Testes de transmissão com o vetor

O afideo *Myzus persicae* Sulz, livre de vírus, foi criado e mantido em planta sadia de *Nicandra physaloides* L. Gaertn, em gaiolas apropriadas. Para a realização do experimento, os afideos foram inicialmente submetidos a um período de jejum de 2 horas, em placas de Petri. Em seguida, os afideos foram colocados nas folhas infectadas com os isolados do LMV, com o auxílio de um pincel macio, a fim de se alimentarem por um período máximo de 5 minutos para a aquisição do vírus. Em seguida, os afideos foram transferidos para plantas saudias, em número de 10 afideos por planta, onde permaneceram por um período de 24 horas. Após a eliminação dos afideos com o inseticida Ortheni, as plantas foram colocadas em casa-de-vegetação até o aparecimento dos sintomas.

3.4 Teste sorológico ELISA

Para realização da técnica sorológica DAS-ELISA (double-antibody sandwich- enzyme linked immunosorbent assay), foram utilizados anti-soros provenientes da firma comercial Agdia Inc. As soluções para cobertura (tampão carbonato/bicarbonato pH 9,5), para a extração das amostras (tampão fosfato salino-PBS) pH 7,4 + polivinilpirolidona (PVP) 20g/l), para a diluição do conjugado (PBS + 0,1 % de leite desnatado + 0,01 % de Tween 20), para lavagens (PBS + Tween 20 a 0,1 %) e para a diluição do substrato (tampão dietanolamina pH 9,8) foram preparados no laboratório do DFP/UFLA.

Para a detecção do LMV em plantas hospedeiras, o volume de reação utilizado em todos os passos, nas microplacas com 96 orifícios, foi de 50 µl/orifício.

Inicialmente, as microplacas foram cobertas com o anticorpo policlonal do LMV, incubadas a 4°C de um dia para o outro (“overnight”) e posteriormente lavadas três vezes em água deionizada, e uma vez em tampão de lavagem, fazendo-se então a adição do extrato foliar das plantas infectadas (antígeno).

Os antígenos foram constituídos por extrato de plantas hospedeiras infectadas, obtidos por maceração de 1g de folha em 10 ml PBS. Estes foram distribuídos ao acaso, nas microplacas, de modo a se obter 3 repetições de cada antígeno. Como controle, empregaram-se extratos de plantas das diversas espécies utilizadas, infectadas e sadias, obedecendo a mesma metodologia.

Após a adição dos antígenos, as placas foram incubadas a 4°C por uma noite, lavadas, adicionado o anticorpo conjugado e novamente incubadas à temperatura ambiente por duas horas. As placas foram lavadas e o substrato p-nitrofenilfosfato foi adicionado e mantido por duas horas, à temperatura ambiente. A leitura foi feita em leitora de placa da Dynatech Laboratories, modelo MRX, com filtro de 405 nm.

3.5 Caracterização inicial do isolado de LMV

A identificação do isolado foi feita através da inoculação mecânica nas espécies *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Gomphrena globosa* e *Lactuca sativa* (alface cv. Regina 579), que são utilizadas como espécies indicadoras para o LMV (Tomlinson, 1970). Foi feito também o teste DAS-ELISA para a identificação do LMV, usando um anticorpo policlonal específico produzido pela Agdia Inc.; e o teste de transmissão, com o vetor, conforme descrito no item 3.4.

3.6 Inoculação mecânica em diferentes espécies de plantas

3.6.1 Procura de hospedeiras alternativas

Sementes e mudas de plantas cultivadas e daninhas foram coletadas no campus da Universidade Federal de Lavras- UFLA, próximo a canteiros de alface, e plantadas em vasos mantidos em casa de vegetação. As plantas foram inoculadas mecanicamente com o isolado LMV-Cf, conforme descrito

anteriormente no item 3.3. Foram empregadas 5 plantas por teste com 3 repetições. A avaliação dos sintomas foi feita diariamente, até 30 dias após a inoculação. As espécies foram avaliadas de acordo com a presença ou ausência de sintomas. Todas as plantas que mostraram os sintomas do vírus foram testadas pelo teste DAS-ELISA, realizado conforme descrito anteriormente, com o anticorpo policlonal específico produzido pela Agdia Inc.

3.6.2. Estudo dos sintomas em plantas hospedeiras

Os isolados estudados foram inoculados nas seguintes espécies: Alface cv. Regina 579, *Chenopodium quinoa* Willd., *C. amaranticolor* Coste e Reyn., *Crepis japonica* Benth., *Gomphrena globosa* L., *Pisum sativum* cv. Torta de Flor Roxa (Ervilha).

Foram inoculadas 6 plantas de cada espécie com cada um dos dois isolados, fazendo-se três repetições. As plantas indicadoras foram inoculadas mecanicamente, pelo método já descrito, e as observações dos sintomas foram feitas semanalmente, por um período de 21 dias após inoculação.

As espécies que não apresentaram sintomas após 3 a 4 semanas de inoculação foram submetidas ao teste de detecção de vírus por inoculação em *C. quinoa* e pelo teste sorológico DAS-ELISA, conforme descrito no item 3.5.

3.7 Testes realizados com a nova hospedeira detectada, *Crepis japonica* (L.) Benth.

Para um melhor conhecimento dessa nova hospedeira experimental, foi realizado um estudo envolvendo a inoculação mecânica e pelo afídeo vetor *M. persicae*, utilizando as metodologias já descritas. Foi investigado também se o LMV poderia ser transmitido pelas sementes de plantas infectadas, e feita uma extração do RNA viral em plantas infectadas, através das metodologia descritas no item 3.8.2.


3.7.1 Transmissibilidade do LMV pelas sementes de *C. japonica* (L.) Benth.

Os ensaios de transmissão foram realizados com sementes provenientes de plantas de *Crepis japonica* infectadas com o isolado LMV-Cf. Esse material foi semeado em bandejas de plástico contendo substrato e vermiculita. Na quarta semana após a semeadura, as plântulas foram submetidas à observação visual e teste sorológico para diagnose do LMV.

3.7.2 Extração do RNA

Foram realizadas purificações parciais, com posterior extração de RNA, do isolado LMV-Cf, a partir de folhas de *C. japonica* infectadas, seguindo a metodologia descrita por Lane (1992). O vírus foi extraído a partir de 2g de folhas infectadas de alface cv. Regina 579 (*Lactuca sativa*), 14 dias após a inoculação. As amostras com sintomas de virose foram trituradas em tampão citrato de amônia 0,1M, pH 6,5, acrescido de 150 µl de iodoacetamida 0,25M e 150 µl de dietilditiocarbamato de sódio 1,0M. O extrato foi filtrado em gaze dupla e centrifugado a 8.000 rpm (rotor AS- 600 da Sorval) por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos de policarbonato contendo 1 ml de Triton X-100 e agitado até a dissolução completa. Em seguida, a solução foi ultracentrifugada em almofada de sacarose 20%, a 29.500 rpm (rotor 30 da Beckman), por 150 minutos. O precipitado foi ressuspensionado em 1 ml de tampão fosfato 0,02M, pH 7,2, acrescido de azida de sódio 0,01% (p/v). Após a centrifugação da solução em microcentrifuga, a 8.000 rpm, por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e armazenado a 4°C.

Para a extração do ácido nucléico total do LMV a partir de 200 µl de solução do vírus concentrado, adicionaram-se 50 µl de tampão de extração (Tris-glicina 0,2M, NaCl 0,2M, EDTA 20mM, pH 9,5), 20 µl de SDS (20%) e 2,7 µl de proteinase K (20mg/ml). Após incubação a 37°C por 1 hora, as proteínas foram removidas com fenol/clorofórmio (1:1 v/v) e, em seguida, o RNA foi



precipitado com a adição de 1/20 vol. de acetato de sódio (3M, pH 5,5) e 2,5 vols. de etanol absoluto. A solução foi incubada a -20°C por 1 hora e em seguida centrifugada por 30 minutos a 10.000 rpm. O "pellet" foi lavado com etanol (70%) para retirada do excesso de sais, secado a vácuo por 3 minutos e ressuspenso em 20 μl de água ultra-pura autoclavada. A integridade do RNA foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,9%.

3.8 Propriedades das partículas virais *in vitro*

Foram investigadas as seguintes propriedades: ponto final de diluição (P.F.D), ponto de inativação térmica (P.I.T) e longevidade *in vitro* (L.I.V.).

Para a determinação do P.F.D., o extrato foi obtido por maceração das folhas em tampão fosfato 0,01M pH7, contendo sulfito de sódio 0,01M, diluído em tampão de extração e coado em gaze dupla, seguido de uma série de diluições: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . Posteriormente, cada uma das diluições foi inoculada mecanicamente por fricção com abrasivo Carborundum, em plantas de *C. quinoa*, conforme descrito no item 3.3., iniciando-se pela maior diluição.

A determinação do P.I.T. foi feita aquecendo-se alíquotas de 2 ml do extrato foliar na concentração de 1:10 (g folhas infectadas /ml solução extratora) em banho-maria, por 10 minutos, às temperaturas de 50°C , 55°C , 60°C , 65°C e 70°C respectivamente. Os extratos foram então resfriados em água corrente e inoculados mecanicamente em plantas de *C. quinoa*.

Na determinação da L.I.V., a diluição foi a mesma usada para a determinação do P.I.T.. Os extratos foram divididos em alíquotas de 2 ml, e transferidos para tubos de microcentrífuga (1,5ml) e mantidos à temperatura ambiente de aproximadamente 21°C , e à 4 e -20°C . O extrato de cada tubo foi usado nas inoculações mecânicas, a intervalos regulares de 24 horas, em plantas

de *C. quinoa*. Em todos os testes, as plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação e os sintomas foram avaliados durante 30 dias após a inoculação.

3.9 Caracterização da patogenicidade dos isolados com base na reação induzida em cultivares de alface resistentes e suscetíveis

Para determinar a patogenicidade, seguindo a metodologia de Pink, Lot e Johnson (1992b), os três isolados do LMV foram inoculados nas cultivares resistentes diferenciadoras Malika e Gallega de Invierno, portadoras do genótipo “*mol¹*”, na cv. Salinas 88 que possui o gene “*mol²*”, e na cv. Vanguard 75 que possui o gene “*mol²*” e “*Mo2*” e na cultivar suscetível Babá de verão.

As plantas foram inoculadas quando apresentavam o estágio de 3 a 4 folhas verdadeiras, e reinoculadas 3 dias após a primeira inoculação.

Foi realizado um outro ensaio com o objetivo de verificar a sua suscetibilidade aos isolados de LMV estudados, em que se utilizou algumas cultivares de alface comerciais.

3.10 Microscopia eletrônica

Para observação das partículas virais ao microscópio eletrônico, foi utilizada uma suspensão de vírus parcialmente purificado de acordo com a técnica de Lane (1992), descrita no item 3.7.2. A metodologia utilizada foi a seguinte: grades de cobre, revestidas com uma película de colódium e metalizadas com carbono, foram colocadas sobre uma gota de suspensão contendo partículas virais, permanecendo por 3 a 5 minutos. Em seguida, elas foram lavadas 4 vezes em água destilada e secadas em papel de filtro. Logo após, foram contrastadas com acetato de uranila 1%, e novamente secadas em papel de filtro. Essas grades de cobre foram

então mantidas em uma placa de Petri forrada com o papel filtro, por 24 horas, e examinadas ao microscópio eletrônico, modelo EM109 da Zeiss.

Na microscopia eletrônica de imunoadsorção “MEIAD”, as grades de cobre foram inicialmente colocadas sobre uma gota de anticorpo para o LMV diluído 1:1000 por 15 minutos. Em seguida, elas foram lavadas para a retirada do excesso de anticorpo e colocadas sobre uma gota da suspensão de partículas virais, parcialmente purificadas, permanecendo por mais 15 minutos. Logo após, elas foram lavadas com água destilada e colocadas sobre uma gota do mesmo anticorpo diluído 1:50, também por 15 minutos. As grades foram então lavadas, contrastadas com acetato de uranila 2% e examinadas ao microscópio eletrônico.

Os cortes ultrafinos foram preparados com a seguinte metodologia: pequenos fragmentos de folhas de alface infectadas com os vírus foram fixados em glutaraldeído 2%, paraformaldeído 16%, CaCl_2 5mM e tampão cacodilato 0,2M, durante 4 horas a 4°C. Em seguida foram realizadas 3 lavagens de 10 minutos cada, com o tampão cacodilato 0,1M. Os espécimes foram pós-fixados em tetróxido de ósmio (2%) diluído em tampão fosfato 0,2M, pH 7,2, durante uma hora, à temperatura ambiente. Após 3 lavagens de 5 minutos cada uma, em solução salina 0,9%, os espécimes foram pré-contrastadas em acetato de uranila (2%), “overnight” a -4°C. A seguir, foi realizada a desidratação com acetona nas diluições 25%, 50% e 70%, por 5 minutos cada uma, seguida por dois tratamentos com acetona 90%, de dez minutos cada e 3 tratamentos de 20 minutos com acetona 100%. Após a desidratação, os espécimes foram incluídos em Spurr (5g de venilyclohexene dioxide, 3g de diglycidyl ether of propyleneglycol, 13g de nonenyl succine anhidride e 0,2g de dimethyl amino ethanol) da seguinte maneira: Spurr + acetona (1:1), por 3 horas, à temperatura ambiente; Spurr + acetona (2:1), por 3 horas, à temperatura ambiente e Spurr pura, por cerca de 15 horas (“overnight”). Logo após, os espécimes foram

transferidos para moldes de borracha preenchidos com Spurr (100%) e mantidos a 80°C por 12 horas para a polimerização da resina.

Após a toaleta nos blocos de resina obtidos, para retirada do excesso, foram feitos cortes ultra finos no ultramicrotomo Reichert-Jung, que foram colocados sobre as grades de cobre de 400 mesh, previamente cobertas com colódio e metalizadas com carbono. Esses cortes foram novamente contrastados com acetato de uranila 3% por 20 minutos. Em seguida, foram lavados 60 vezes com água bidestilada e contrastados com citrato de chumbo durante 10 minutos, lavados por mais 60 vezes com água bidestilada e examinados ao microscópio eletrônico.

3.11 Estudos moleculares

3.11.1 RT-PCR

Para amplificar um fragmento de 600pb, o qual incluiu a região N-terminal do gene da capa protéica, foram utilizados os dois oligonucleotídeos iniciadores específicos para o LMV, descritos por Zerbini, Koike e Gilbertson (1997), denominados 1196 (sense) e 1519 (anti-sense). A minipurificação e a extração do RNA viral foram feitas de acordo com a técnica de Lane (1992), descrita no item 3.8.2.

Para a síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado o Kit SuperScript™ Preamplification System (GIBCOBRL), com algumas modificações. Foram misturados 5µl de RNA viral, 1µl (50pmol) do oligonucleotídeo 1519 e 6µl de água ultra-pura autoclavada. A mistura foi incubada a 70°C por 10 minutos e imediatamente transferida para o gelo por no mínimo 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 2µl do tampão de reação, 2µl de MgCl₂, 1µl de dNTPs mix 10mM, 2µl de ditiotreitól (DTT) 0,1M e 1µl da enzima transcriptase reversa. A solução foi incubada a 42°C por 50 minutos e

terminada por meio de incubação a 70°C por 15 minutos.

Na reação de amplificação, empregou-se um volume final de 50µl, composto de: 5µl de tampão de reação 10x, 3µl MgCl₂ 25mM, 1µl de dNTPs mix 10mM, 0,5µl de Taq DNA polimerase, 5µl do cDNA, 1µl de cada primer com 50pmol (1196 e 1519) e água ultra-pura autoclavada. Essa reação foi realizada no termociclador MJ Research PTC-100, utilizando o seguinte programa: 30 ciclos com a desnaturação por 1 minutos a 94°C, anelamento por 1 minuto a 50°C, e extensão por 2 minutos a 72°C. O produto final da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,9%.

3.11.2 Clonagem do fragmento de DNA amplificado

O fragmento do isolado LMV-Cf obtido pela RT-PCR foi clonado no plasmídeo vetor pCR2.1-TOPO utilizando-se o Kit "TOPO-TA" Version D (Invitrogen). O método utilizado até a obtenção do plasmídeo recombinante foi efetuado de acordo com as recomendações do fabricante:

Para a reação de ligação do plasmídeo com o fragmento da RT-PCR, foram adicionados 2µl do produto da PCR, 1µl do vetor (pCR 2.1) e 2µl de água com um volume final de 5µl. Em seguida, foram cuidadosamente misturados e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente (~25°C). Após uma centrifugação rápida (15 segundos), os tubos foram levados diretamente para o gelo. Para a reação de transformação, adicionaram-se 2µl de β-Mercaptoethanol 0,5M e 2µl da reação de ligação para cada tubo de células competentes, misturando-se cuidadosamente. Os tubos foram incubados no gelo durante 30 minutos e depois foram colocados à temperatura de 42°C (banho-maria) por 30 segundos, sem agitação. Os tubos foram então transferidos imediatamente para o gelo e incubados por 2 minutos, e após isso adicionaram-se 250µl do meio SOC para cada tubo. Os tubos foram agitados cuidadosamente e incubados na incubadora com agitação, à temperatura de 37°C, por 30 minutos, a uma rotação

média de 200 rpm. Ao término, foram pipetados 125µl de cada colônia transformada por placa de Petri contendo 2YT + ampicilina, X-gal e IPTG. As células transformadas foram espalhadas com uma alça de “Drigalsk” e incubadas a 37°C “overnight”.

Nas placas, foi observada a multiplicação de colônias brancas e azuis. As colônias brancas, supostamente recombinantes, foram selecionadas e cultivadas.

3.11.3 Purificação do plasmídeo e clivagem com enzima *EcoR* I

Para comprovar a presença do plasmídeo recombinante, através da clivagem com enzima de restrição, realizou-se uma primeira purificação com fenol, seguindo o protocolo de lise alcalina descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989).

Os plasmídeos contendo o fragmento do produto PCR foram clivados com a enzima de restrição *EcoR* I. A reação foi constituída de 3µl de plasmídeo purificado, 2µl de tampão apropriado, 4,5µl de água ultra-pura autoclavada e 0,5µl da enzima *EcoR* I. Foram analisados 5 µl da reação em gel de agarose 0,9%.

3.11.4 Purificação do plasmídeo recombinante

Nas etapas finais, foi feita uma nova purificação do plasmídeo recombinante de acordo com a técnica descrita por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989).

Foi adicionado 1,5ml em um tubo de microcentrífuga de 2ml, seguido de uma centrifugação rápida de 14.000rpm por 60 segundos. O sobrenadante foi retirado e adicionados 100µl da solução I (25mM de tris-HCl pH 8, 10mM de EDTA e 50mM de D-glucose), agitando no vortex por 2 minutos, e deixando em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados

200µl da solução II (NaOH 0,2N e SDS 10%), misturando bem devagar. Os tubos foram mantidos no gelo por 5 minutos. Logo após foram adicionados 150 µl de acetato de amônio 10,5M, mantendo os tubos no gelo por 15 minutos. Em seguida, foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para novos tubos com 600 µl de isopropanol. Após 15 minutos no gelo, o sobrenadante foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 ml de etanol (70%). Após uma centrifugação com 14.000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi secado a vácuo. Em seguida, o plasmídeo recombinante foi ressuspendido em 25µl de tampão TE e armazenado a -20°C.

3.11.5 Sequenciamento

Os plasmídeos recombinantes contendo a sequência do LMV, foram seqüenciados e os nucleotídeos dos isolados estudados foram comparadas com as previamente publicadas, utilizando-se o programa BLAST e GCG.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Inoculação em diferentes espécies de plantas

4.1.1 Procura de hospedeiras alternativas

Os resultados obtidos na inoculação mecânica do isolado LMV-Cf em diferentes espécies de plantas, cultivadas e selvagens, estão discriminados na Tabela 1. Entre as plantas inoculadas, somente as da espécie *Crepis japonica* (L.) Benth., família Compositae, mostraram sintomas de infecção com o LMV. Os primeiros sintomas se desenvolveram dez dias após a inoculação, na forma de clareamento de nervuras e um leve mosaico que evoluiu em severidade de modo que, uma semana depois, a planta apresentou mosaico rugoso, lesões necróticas irregulares, formação de bolhas, enrugamento e deformação foliar.

Os resultados obtidos com o teste DAS-ELISA confirmaram as observações visuais, ou seja, houve resultado positivo apenas com as plantas de *C. japonica* que apresentaram sintomas.

TABELA 1. Resultado da inoculação do LMV-Cf em diferentes espécies de plantas.

Espécies de plantas	Nome comum	Nº de plantas inoculadas	Nº de plantas infectadas	% transmissão
<i>Ageratum conyzoides</i>	Mentrassto	15	0	0
<i>Alternanthera ficoidea</i>	Apaga-fogo	15	0	0
<i>Bidens pilosa</i>	Picão preto	15	0	0
<i>Chaptalia interregima</i>	Língua de vaca	15	0	0
<i>Commelina sp.</i>	Trapoeraba	15	0	0
<i>Crepis japonica</i>	Barba de falcão	15	5	33,3
<i>Euphorbia heterophylla</i>	Leiteiro	15	0	0
<i>Euphorbia hirta</i>	Leiteira	15	0	0
<i>Mikania glomerata</i>	Guaco	15	0	0
<i>N. glutinosa</i>	Fumo	15	0	0
<i>N. rustica</i>	Fumo	15	0	0
<i>N. tabacum</i> cv. TNN	Fumo	15	0	0
<i>N. tabacum</i> cv. White Burley	Fumo	15	0	0
<i>Ruta graveolens</i>	Arruda	15	0	0
<i>Solidago microglossa</i>	Arnica brasileira	15	0	0
<i>Viola odorata</i>	Viola	15	0	0
<i>Wedelia paludosa</i>	Ponta livre	15	0	0

4.1.2 Estudo comparativo dos sintomas induzidos pelos dois isolados de LMV em hospedeiras

Os sintomas induzidos nas plantas suscetíveis, pelos dois isolados de LMV estudados, estão representados na Tabela 2.

A alface cv. Regina 579 demonstrou ser uma boa diferenciadora dos dois isolados de LMV devido à formação de cabeça compacta quando inoculada com o isolado LMV-Cf (Figura 1A). Esse tipo de sintoma não é comum quando essas cultivares são inoculadas com outros isolados, que têm sido testados no DFP, os quais normalmente induzem sintomas de mosaico (Figura 1B).

TABELA 2. Sintomas induzidos pelos isolados de LMV em diferentes espécies de plantas hospedeiras.

ESPÉCIES/ CULTIVARES	ISOLADOS DE LMV	
	LMV-Cf	LMV-AF198
Alface cv. Regina 579	-/M, Cf ¹	-/M
<i>Chenopodium quinoa</i>	LLC / LC, AC	LLC / LC, AC, N, DF
<i>Ch. amaranticolor</i>	LLN / LN	LLN / -
<i>Crepis japonica</i>	-/MR, LN, LEF, B, DF	LLN / MR, LN, FEF, B, DF
<i>Gomphrena globosa</i>	LLN / -	LLN / -
<i>Pisum sativum</i> cv. <i>Torta de Flor Roxa</i>	-/LC	LLN / LC

¹-AC= anel clorótico; B= bolhas; Cf= cabeça fechada; DF= deformação foliar; E= enfezamento; LC= Lesão clorótica; LLC= lesão local clorótica; LLN= lesão local necrótica; LEF= leve enrugamento das folhas; LLN= lesão local necrótica; LN= lesão necrótica; MR= mosaico rugoso; N= nanismo; -/= folhas inoculadas; /-= folhas não inoculadas.

As plantas de *C. amaranticolor* reagiram com lesões cloróticas locais seguidas de lesões necróticas. Ao contrário do isolado LMV-AF198, o LMV-Cf induziu sintomas sistêmicos. Os sintomas normalmente apresentados por plantas de *C. amaranticolor* infectadas por isolados de LMV são lesões locais cloróticas e necróticas e sintomas sistêmicos como nanismo, encrespamento, mal formação foliar e lesões cloróticas (Bos, Huijberts e Cuperus, 1994, Tomlison, 1970).

As plantas *Chenopodium quinoa*, quando inoculadas com o isolado LMV-AF198, além de apresentarem os mesmos sintomas induzidos pelo isolado LMV-Cf, como lesão clorótica e anéis concêntricos (Figura 2), apresentaram sintoma de nanismo e deformação foliar em todas as folhas da planta.

Em outros trabalhos realizados com essa espécie, observaram-se os mesmos tipos de sintomas descritos na Tabela 2; entretanto, as plantas inoculadas com diferentes isolados também apresentaram, ocasionalmente, variações quanto à severidade dos sintomas induzidos (Bos, Huijberts e Cuperus, 1994). *Crepis japonica* também apresentou sintomas diferenciados para os dois isolados, ou seja, os sintomas de lesões locais necróticas apareceram somente nas folhas inoculadas com o isolado LMV-AF198 e o enrugamento apresentado por plantas inoculadas com o LMV-Cf foi muito menos severo que o induzido pelo isolado LMV-AF198 (Figura 3).

As plantas de *G. globosa* foram as únicas cujos sintomas não diferiram para os dois isolados, caracterizando-se por lesões locais necróticas, conforme tem sido observado para outros isolados de LMV estudados (Tomlison, 1970).

A espécie *Pisum sativum* cv. Torta de Flor Roxa (Ervilha) reagiu ao isolado LMV-AF198 apresentando sintomas de lesões locais necróticas, o que não foi observado nas plantas inoculadas com o isolado LMV-Cf. As lesões cloróticas apresentadas em plantas inoculadas com o isolado LMV-AF198 apareceram mais cedo e com maior intensidade do que aquelas plantas inoculadas com o isolado LMV-Cf, que apresentaram sintomas fracos e tardios. Bos, Huijberts e Cuperus (1994), testando essa mesma espécie com diferentes isolados, verificaram o aparecimento de mosaico, clareamento de nervuras e nanismo.

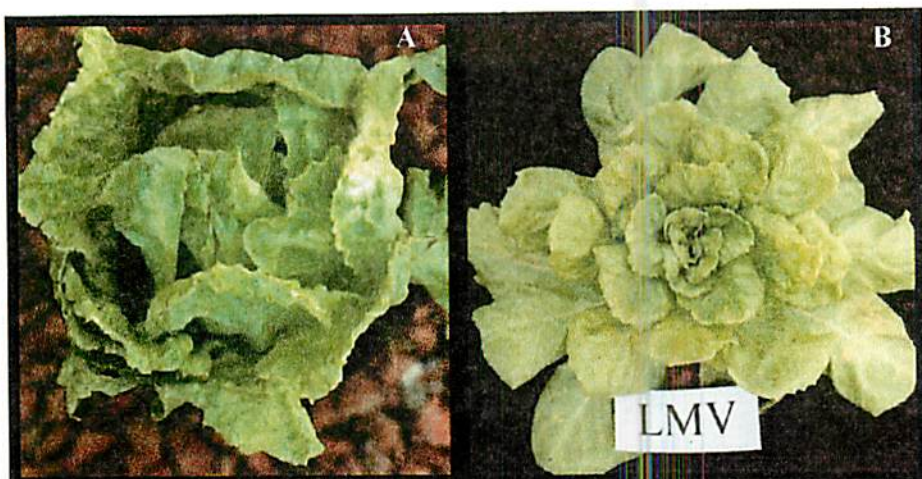


FIGURA 1. Plantas de alface cv. Regina 579 inoculadas com os isolados: (A) LMV-Cf e (B) LMV-AF198.



FIGURA 2. Planta de *C. quinoa* inoculada com o isolado LMV-Cf apresentando anel clorótico.

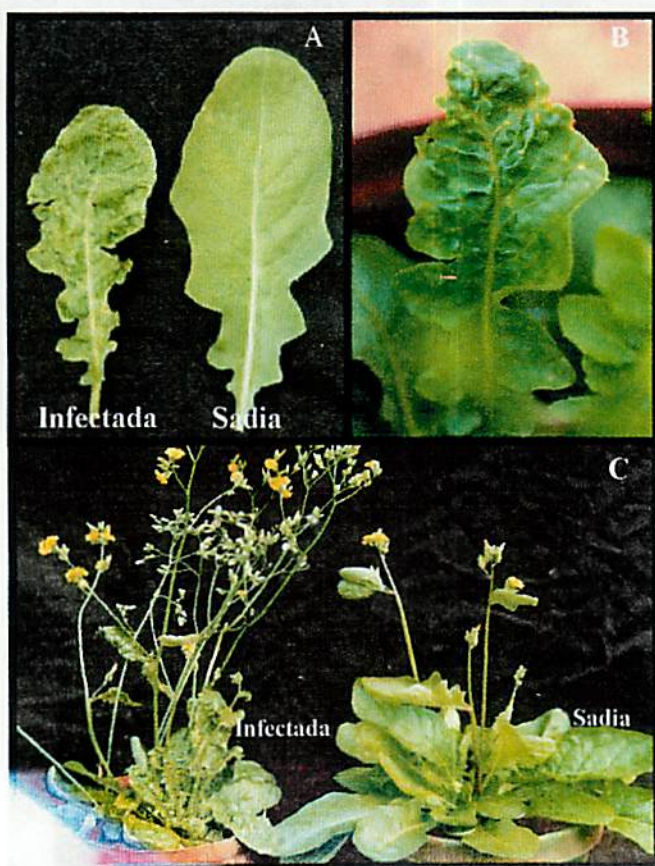


FIGURA 3. Folhas de *Brassica oleracea*, inoculadas com LMV-Cf, apresentando sintomas de mosaico amarelo e deformação foliar (A e B). Planta infectada e planta sadia (C).

De um modo geral, notou-se que os sintomas são semelhantes aos já descritos na literatura para isolados já testados, diferindo apenas em sua severidade. Segundo Bos, Huijberts e Cuperus (1994), não há nenhum critério taxonômico existente em virologia de plantas para diferenciar estirpes. O critério biológico é usualmente empregado para um melhor entendimento e reconhecimento de isolados, permitindo a sua classificação com base na

interação com diferentes hospedeiros naturais. Esse critério é muito utilizado para definir os isolados dentro de algum patótipo.

4.2 Testes realizados com *Crepis japonica* (L.) Benth.

4.2.1 Transmissão pelo inseto vetor *Myzus persicae*

Os resultados dos testes de transmissão mecânica e pelo vetor, do isolado LMV-Cf, utilizando plantas de alface e de *C. japonica* ora como doadoras, ora como receptoras do inóculo, em diferentes combinações, estão discriminados na Tabela 3. Quando se utilizou a *C. japonica* como doadora do inóculo, a porcentagem de transmissão foi de 44,4 e de 79,2 para as plantas de alface e *C. japonica*, respectivamente. Quando a alface foi a doadora do inóculo, a transmissão foi de 100% nos dois casos, indicando que provavelmente o extrato de *C. japonica* pode conter alguma substância que poderia diminuir a infectividade do vírus.

TABELA 3. Transmissão de *Lettuce mosaic virus* (LMV-Cf) através de inoculação mecânica e por afideo com as respectivas plantas.

Método de inoculação	Espécie doadora	Espécie receptora	Nº de plantas infectadas (Inf.) Nº de plantas inoculadas (Inoc)		% infecção
			Inf./ Inoc.		
Mecânico	<i>Crepis japonica</i>	Alface	12/27		44,4
		<i>Crepis japonica</i>	19/24		79,2
	Alface	<i>Crepis japonica</i>	15/15		100,0
		Alface	30/30		100,0
Afideo ^a	<i>Crepis japonica</i>	Alface	23/25		92,0
		<i>Crepis japonica</i>	19/31		61,3
	Alface	Alface	20/25		80,0
		<i>Crepis japonica</i>	12/30		40,0

^a - Foi usado o afideo *Myzus persicae* em todas as inoculações.

Nos testes de transmissão com o vetor, a maior eficiência foi conseguida quando se transmitiu o LMV de *C. japonica* para alface (92%) e de alface para alface (80%). O menor índice de transmissão pelo vetor ocorreu de alface para *C. japonica* (40%). Entretanto, demonstrou que é possível haver a transmissão desse vírus, pelo *Myzus persicae*, de alface para a *C. japonica* em condições naturais. Isso indica que ela pode ser considerada como mais uma hospedeira em potencial para o LMV, uma vez que tem sido observada a sua ocorrência espontânea nas imediações das áreas de cultivo de alface em Minas Gerais.

Ocasionalmente tem sido relatada a ocorrência de novas hospedeiras naturais, para o LMV, em outros países. Zerbini, Koike e Gilbertson (1997), encontraram, na Califórnia, uma outra hospedeira, a "*Gazania spp*", e também observaram um baixo nível de transmissão do LMV por afídeos, em testes experimentais, dessa planta para alface e *N. benthamiana*. Esses autores consideraram que a *Gazania* poderia estar atuando como hospedeira alternativa para o LMV, constituindo uma fonte de inóculo e contribuindo para o aparecimento dos surtos de LMV que vinham sendo observados na Califórnia, EUA, naquela época.

Outra observação apresentada na Tabela 3 é o fato do isolado LMV-Cf, ser transmitido de modo bastante eficiente pelo vetor *M. persicae*, a exemplo do que acontece com outros isolados já estudados e descritos (Sylvester, 1955).

4.2.2 Testes de transmissibilidade pelas sementes

Foram semeadas 1.068 sementes provenientes de plantas de *C. japonica* infectadas com o isolado LMV-Cf. Nenhuma das plantas provenientes dessas sementes apresentaram sintomas até cinco semanas após a germinação. Quando submetidas ao teste DAS-ELISA, o resultado também foi negativo, ou seja, não se detectou a presença do LMV em plantas assintomáticas.

Apesar de ter sido testado um número significativo de sementes, essa não transmissibilidade do LMV por sementes de *C. japonica* não deve ser

considerada definitiva, pois algumas hospedeiras alternativas como *C. quinoa*, *Lactuca serriola* e *Senecio vulgares* apresentam um índice muito baixo de transmissão do LMV por sementes (Shukla, Ward e Brunt, 1994). Portanto, para uma conclusão mais segura, deve-se ainda testar um maior número de sementes provenientes de plantas de *C. japonica* infectadas com o LMV.

4.2.3 Extração de RNA viral

Foi possível obter uma alta concentração de RNA do LMV-Cf quando esse foi extraído de preparações de vírus parcialmente purificado a partir de tecidos infectados de *C. japonica* (Figura 4). Isso indica que essa planta tem um bom potencial para ser utilizada como hospedeira experimental, principalmente para multiplicação de isolados do LMV a serem utilizados em estudos bioquímicos e moleculares.

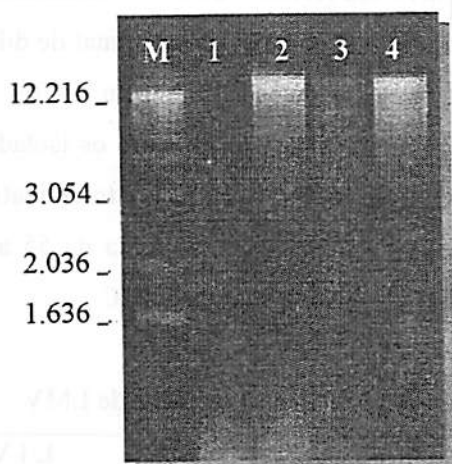


FIGURA 4. Padrão eletroforético do RNA genômico do isolado LMV-Cf, em gel de agarose 0,9%. (M) marcador molecular de DNA (1 Kb "ladder"), (1) *C. quinoa* sadio e (2) alface infectada, (3) *C. quinoa* infectado e (4) *Crepis japonica* infectado.

4.3 Propriedades *in vitro* dos isolados de LMV

A Tabela 4 mostra os resultados das investigações sobre as propriedades dos isolados de LMV estudados. O isolado LMV-Cf se manteve infectivo no extrato foliar até a diluição de 10^3 , enquanto o isolado LMV-AF198 foi infectivo no extrato foliar diluído a 10^4 . Como nos testes sorológicos realizados a concentração das partículas dos dois isolados na planta foram semelhantes, esses resultados demonstram que provavelmente o isolado LMV-AF198 deve ser mais estável *in vitro* do que o LMV-Cf. Isso parece se confirmar quando são examinados os PIT e LIV desses isolados, pois o isolado LMV-AF198 é inativado a uma temperatura mais alta e tem uma maior longevidade *in vitro*.

López, Alonso e Montessoro (1984), estudando um isolado da região do México, verificaram que o ponto máximo de inativação térmica foi de 60°C , o ponto final de diluição foi de 10^3 e a infectividade *in vitro* do isolado se conservou por 2 dias. De um modo geral, existe uma variabilidade nas propriedades *in vitro* dos diversos isolados de LMV estudados. O seu ponto de inativação térmica tem sido entre 55 a 60°C , o ponto final de diluição entre 10^2 a 10^3 e longevidade *in vitro* entre 1 e 2 dias (Tomlinsom, 1970).

Portanto, parece normal essa diferença entre os isolados testados nesse trabalho. De acordo com os dados aqui obtidos, o ponto de inativação térmica do isolado LMV-Cf ficou um pouco abaixo dessa faixa de 55 a 60°C , observada para outros isolados de LMV, pois foi inativado a 50°C .

TABELA 4. Propriedades *in vitro* de dois isolados de LMV.

Isolados de LMV	P.F.D.	P.I.T.	L.I.V.		
			21°C	4°C	-20°C
LMV-Cf	10^3	50	3	14	72
LMV-AF198	10^4	55	4	17	72

P.F.D.- Ponto final de diluição, P.I.T.- Ponto de inativação térmica, L.I.V.- Longevidade *in vitro*.

4.4 Patogenicidade do isolado LMV-Cf

4.4.1 Inoculação em cultivares diferenciadoras

Nesse experimento foram utilizadas cinco cultivares, sendo uma suscetível e 4 diferenciadoras resistentes. As cultivares Malika (*mol¹*), Salinas 88 (*mol²*) e Vanguard 75 (*mol² + Mo2*) foram utilizadas por Pink, Lot e Johnson (1992b), e a cultivar Gallega de Invierno (*mol¹*) foi utilizada por Bos, Huijberts e Cuperus (1994) (Tabela 5). Todas essas cultivares, inoculadas com o isolado LMV-Cf e também com o isolado LMV-AF198 para servir como controle, não apresentaram qualquer tipo de sintoma do vírus, enquanto a cultivar suscetível Babá de verão mostrou claramente os sintomas do LMV, comprovando a eficiência da inoculação mecânica. Todas as plantas que não mostraram sintomas foram testadas por DAS-ELISA e apresentaram resultados negativos.

Baseando-se na presença ou ausência de sintomas (Pink, Lot e Johnson, 1992b), pode-se afirmar que o isolado LMV-AF198, como esperado, não quebrou nenhum dos genes de resistência das cultivares utilizadas no trabalho. O mesmo resultado foi obtido com o isolado LMV-Cf.

Com a diferenciação dos isolados em patótipos, utilizando as cultivares diferenciadoras descritas na literatura, o isolado LMV-Cf não poderia ser classificado como patótipo III ou IV, pois estes patótipos são capazes de quebrar os genes de resistência das cultivares testadas. Considerando-se que tanto o gene de resistência "*mol¹*" e "*mol²*" foram efetivos para prevenir a infecção com o isolado LMV-Cf, esse poderia ser classificado dentro do grupo de patótipos do tipo I ou II. Para se fazer a distinção entre esses dois patótipos, deveria ter sido utilizado a alface cv. Ithaca (Mo2), pois essa é resistente ao patótipo I e suscetível ao patótipo II. Entretanto, essa cultivar não estava disponível na ocasião em que esse trabalho foi realizado, de modo que, apesar do LMV-Cf ter

apresentado um comportamento semelhante ao do isolado LMV-AF198 (Zerbini, Koike e Gilbertson, 1995), existe a necessidade de serem realizados testes complementares para a comprovação definitiva da sua identidade.

TABELA 5. Reação das cultivares de alface, portadoras de genes de resistência, utilizadas como diferenciadoras para os isolados de LMV, com base em sua patogenicidade.

Cultivar	Gene de resistência	Sintoma		ELISA	
		Cf	AF198	Cf	AF198
Babá de Verão	—	M	M	0.860 ^a	1.040
Malika	<i>mol</i> ¹	ausente	ausente	-	-
Gallega de Invierno	<i>mol</i> ¹	ausente	ausente	-	-
Salinas 88	<i>mol</i> ²	ausente	ausente	-	-
Vanguard 75	<i>mol</i> ¹ e <i>Mo2</i>	ausente	ausente	-	-

^a-Resultado do teste DAS-ELISA: negativo (-)

4.4.2 Inoculação em cultivares comerciais de alface.

Os resultados da inoculação dos isolados de LMV nas 8 cultivares de alface, que têm sido normalmente comercializadas e plantadas no Brasil, estão discriminadas na Tabela 6. Todas as oito cultivares testadas foram suscetíveis ao LMV-Cf, mostrando sintomas sistêmicos após a inoculação mecânica, enquanto seis foram suscetíveis e duas (Hortência e Taina) não mostraram nenhuma sintoma quando inoculadas com o isolado LMV-AF198. No final do ciclo, as cultivares Hortência e Tainá apresentaram o mesmo desenvolvimento e fenótipo das plantas controle não inoculadas, entretanto o resultado dos testes sorológicos, realizados na quarta semana após a inoculação, indicaram a presença de uma alta concentração de vírus, semelhante às concentrações

encontradas nas cultivares suscetíveis. Isso demonstrou que elas não são imunes, mas apresentam uma alta tolerância à infecção pelo LMV.

TABELA 6. Reação das 8 cultivares de alface comerciais, aos isolados de LMV.

Cultivares de alface	Fonte Fornecedora	Sintomas		ELISA ^c	
		LMV-Cf	LMV-AF198	LMV-Cf	LMV-AF198
Regina 71	Agroceres	M, CN, PN, BS ^a	CN, PN	2,506	2,646
Babá de verão	Feltrin	M, CN, PN, DF, N	M, DAF	2,280	2,720
Salad- Bowl		M, DAF	M	2,681	2,670
Tipo crespa	Asgrow	M	M, CN	2,692	2,845
Hortência	Hortec	M	Ausente	2,531	2,952
Carolina	AG- 576	M, CN, PN, N	CN, PN	2,678	3,221
Tainá		PN, DF, N	Ausente	1,963	3,100
Monalisa	AG- 819	M	M	2,856	3,073

^a - B= bolhas, BS= bordo serrilhado; CN= clareamento de nervuras; DAF= diminuição da área foliar; DF= deformação foliar; EN= encarquilhamento; ER= errugamento; FCE= folhas centrais com enfezamento; LEF= leve enrugamento das folhas; M= mosaico; N= nanismo; PN= ponto necrótico.

^c - O valor médio da absorbância das amostras sadias multiplicado por 2, foi de 0,190.

Pink, Kostova e Walkey (1992a), avaliando alguns isolados de LMV através do teste ELISA, verificaram que o nível de concentração do vírus estava associado com a severidade dos sintomas apresentados nas cultivares de alface diferenciadoras. Essa diferença quantitativa foi considerada como resultante da diferença de agressividade entre os isolados.

Nos resultados aqui obtidos, essa correlação entre o nível de concentração do vírus e a severidade de sintomas não foi observada (Tabela 6).

De um modo geral, notou-se que os dois isolados estudados apresentaram um alto grau de agressividade e virulência na maioria das cultivares, mas as cultivares Hortência e Tainá não mostraram sintomas quando inoculadas com o LMV-AF198, mesmo tendo apresentado uma alta concentração do vírus, e a cultivar Monalisa apresentou uma das mais altas concentrações de vírus apesar de ter reagido com sintomas apenas de mosaico.

Algumas das cultivares testadas como a cultivar Carolina AG-576, Regina 71 e Monalisa AG-819 foram descritas na literatura como cultivares resistentes ao mosaico da alface (Emater- MG), entretanto não se tem conhecimento do seu “background” genético, o que torna difícil qualquer análise sobre o comportamento dessas cultivares frente aos isolados de LMV estudados.

Segundo Bos, Huijberts e Cuperus (1994), no passado, a interação vírus/hospedeiro era atribuída principalmente à presença ou ausência de sintomas. As reações dos hospedeiros foram registradas somente como suscetível ou resistente, tendo esse uso persistido em trabalhos mais recentes como os de Pink, Kostova e Walkey (1992) e Pink, Lot e Johnson (1992). Através do teste ELISA se obtém uma valiosa informação quanto à multiplicação do vírus e, conseqüentemente, quanto a sua agressividade, permitindo avaliar melhor a suscetibilidade ou resistência da cultivar para a infecção (Bos, Huijberts e Cuperus, 1994).

4.5 Microscopia eletrônica

As observações ao microscópio eletrônico, de preparações minipurificadas, obtidas a partir de folhas de alface infectadas com o isolado LMV-Cf, utilizando-se a técnica “leaf-dip”, revelaram a presença de partículas



filamentosas flexuosas características do gênero *Potyvirus*. A fotomicrografia dessas partículas pode ser vista na Figura 5.

No teste de microscopia eletrônica de imunoadsorção (MEIAD), observou-se que as partículas de ambos os isolados aparecem cobertas por uma película de moléculas de anticorpo, não sendo possível notar nenhuma diferença marcante entre eles (Figura 6A e B). Estes resultados indicam que provavelmente os dois isolados são proximamente relacionados, possuindo vários sítios antigênicos comuns. Esse teste de decoração, adaptado para a virologia de plantas por Milne e Luisoni (1977), além de rápido pode detectar com bastante precisão o grau de relacionamento entre os vírus, sendo considerado como especialmente adaptado para os *Potyvirus*. Através desse método, é possível também fazer a detecção de infecções mistas em uma cultura, com a utilização de antissoro específico para uma determinada espécie ou isolado (Shukla, Ward e Brunt, 1994).

Brlansky e Derrick (1979) utilizaram com sucesso essa técnica, denominada por eles de SSEM (“serologically specific electron microscopy”), para detectar o LMV em sementes de alface infectadas, considerando a mais sensível quando comparada com o teste ELISA.

Exames de cortes ultra finos de tecidos de alface infectados com o isolado LMV-Cf, ao microscópio eletrônico, mostraram a presença de inclusões citoplasmáticas cilíndricas do tipo cata-vento no citoplasma das células infectadas (Figura 7A e B). A presença de inclusões junto com partículas de vírus e componentes das células hospedeiras pode ser considerado um evento comum para os membros da família *Potyviridae* (Shukla, Ward e Brunt, 1994b).

As características principais para definir um *Potyvirus* no passado eram a morfologia da partícula, a citopatologia e o seu mecanismo de transmissão. Junto com essas características foram adicionadas as características moleculares, tais como a estrutura e organização genômica, as sequências do gene da capa

[REDACTED]

protéica e a sorologia (Shukla, Ward e Brunt, 1994). Todos esses parâmetros devem ser considerados complementares e, atualmente, são indispensáveis para a sua classificação.

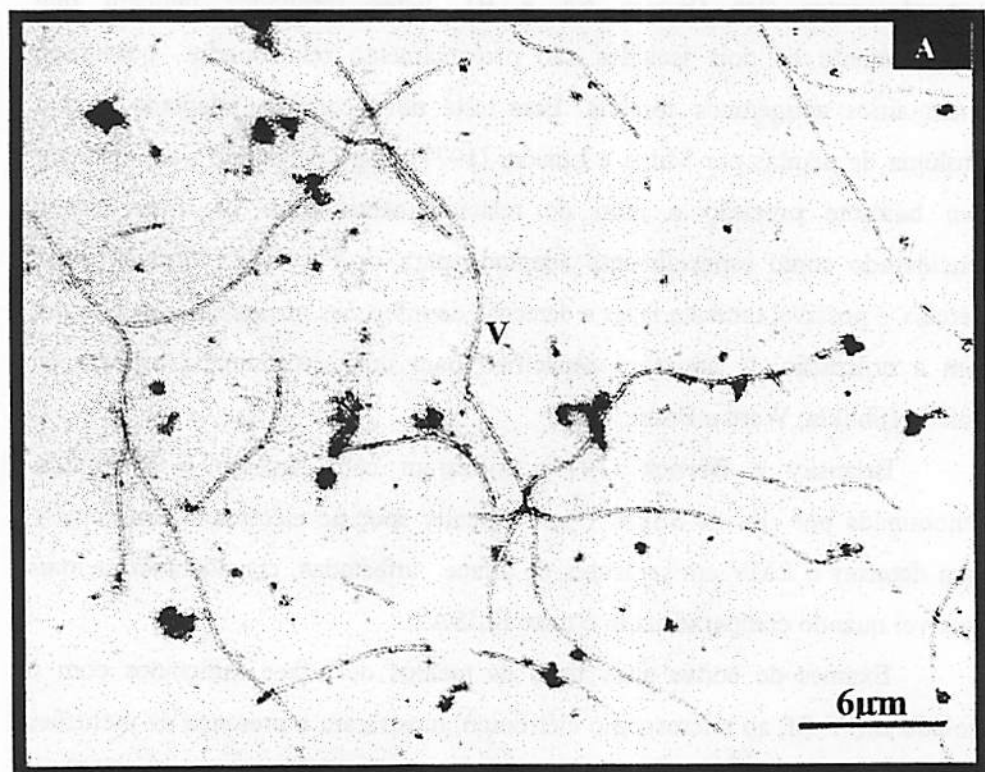


FIGURA 5. Fotomicrografia de preparação "Leaf-dip" usando o minipurificado de plantas de alface infectadas com o isolado LMV-Cf. (V) Vírus.

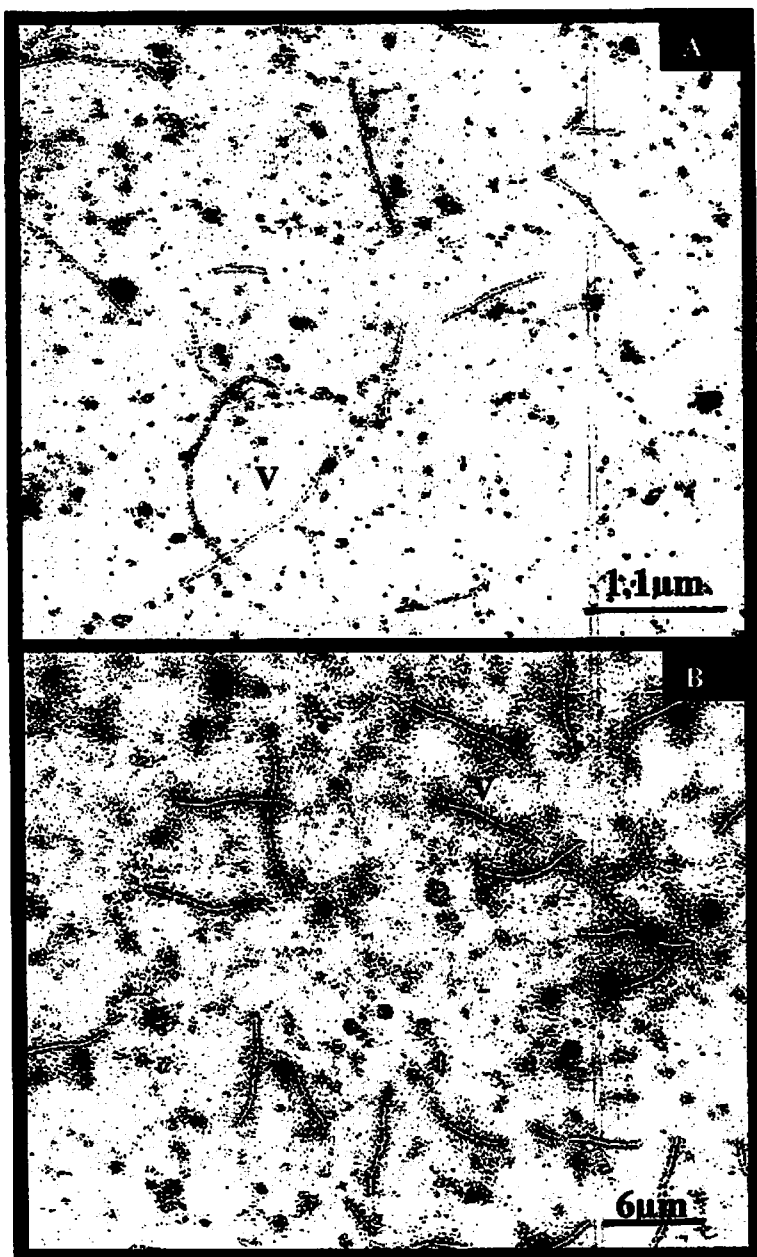


FIGURA 6. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de imunoadsorção para os dois isolados de LMV: (A) LMV-Cf e (B) LMV-AF198, usando o minipurificado de plantas de alface infectadas. (V) vírus.

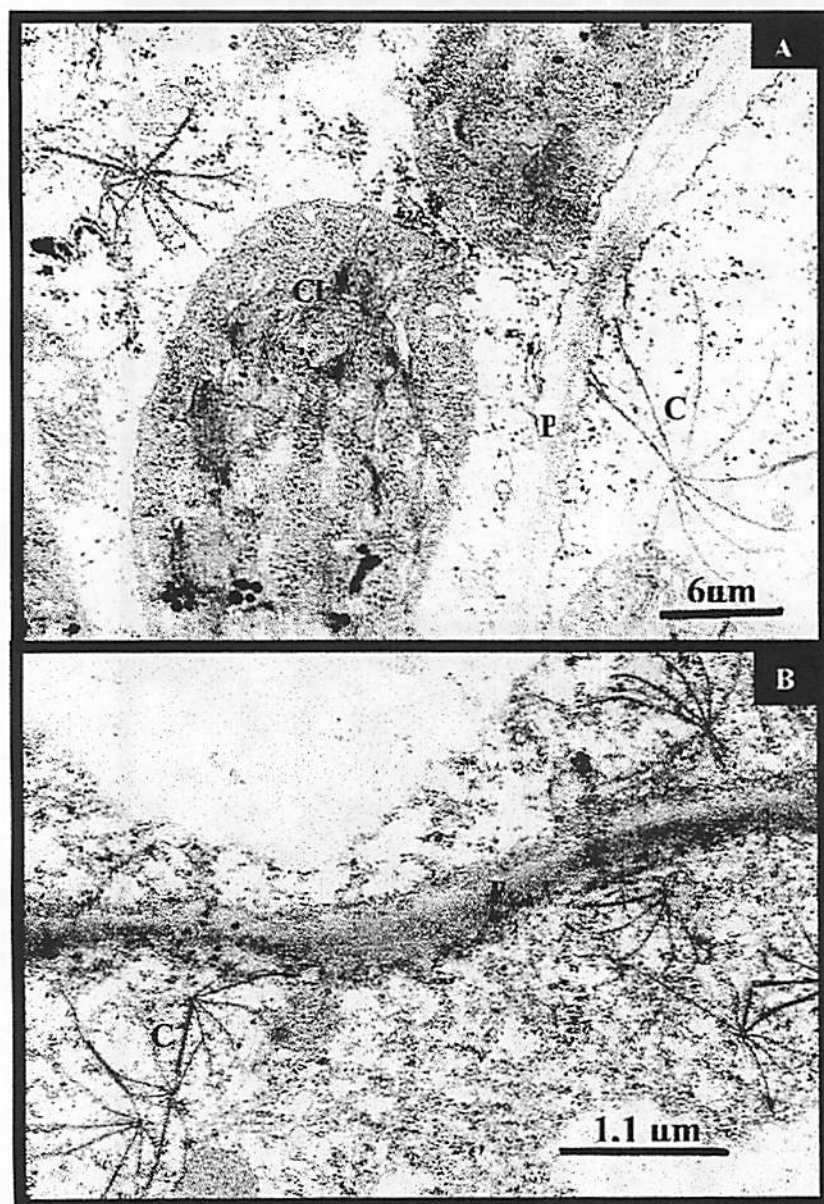


FIGURA 7. Fotomicrografia de cortes ultra-finos mostrando inclusões do tipo cata-vento do isolado LMV-Cf: (A e B). (C) Cata vento, (P) parede celular, (Cl) Clorofila.

4.6 Estudos moleculares

4.6.1 RNA viral

O padrão eletroforético do RNA viral do isolado LMV-Cf, extraídos de tecidos de alface infectados, pode ser visualizado na Figura 8. Nota-se uma banda de aproximadamente 10.000 nucleotídeos, característica dos RNAs que são comumente observados em vírus pertencentes ao gênero *Potyvirus* (Shukla, Ward e Brunt, 1994).

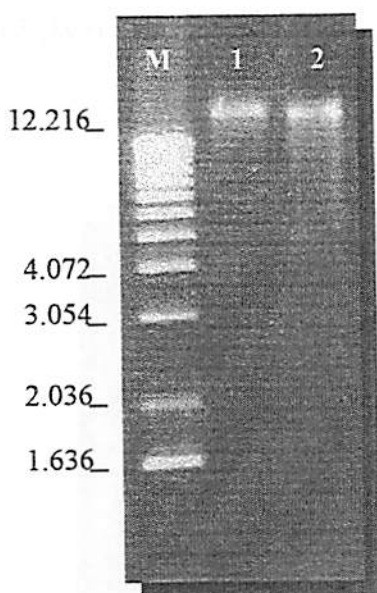


FIGURA 8. Padrão eletroforético do RNA genômico de isolados de LMV, em gel de agarose 0,9%. (M) marcador molecular de DNA (1 Kb "ladder"), (1) LMV-AF198 e (2) LMV-Cf. Os comprimentos das bandas correspondentes aos padrões (em pares de bases) estão indicados à esquerda do gel.

A utilização dos primers 5'-AAGGCAGTAAACTGATG-3' e 5'-CCTCGTAGCCGTCCGTAT-3' permitiram a amplificação de um fragmento de 600 bp para os isolados LMV-Cf e LMV-AF198 (Figura 9). Esse fragmento representa o 5' terminal do gene da capa protéica, onde está presente a região N-terminal, região mais variável do gênero *Potyvirus* (Shukla e Ward, 1988; Shukla, Ward e Brunt, 1994), referida por Zerbini, Koike e Gilbertson (1995) como uma região hipervariável.

Esses primers poderiam também ser utilizados para a realização de testes diagnósticos do LMV através da RT-PCR, que tem se mostrado uma das técnicas mais sensíveis para a detecção de vírus de plantas (Robertson, French & Gray, 1991; Borja e Pons, 1992; Hadidi et al., 1993; Vunsh, Rosner & Stein, 1990; Figueira, Domier e Darcy, 1997).

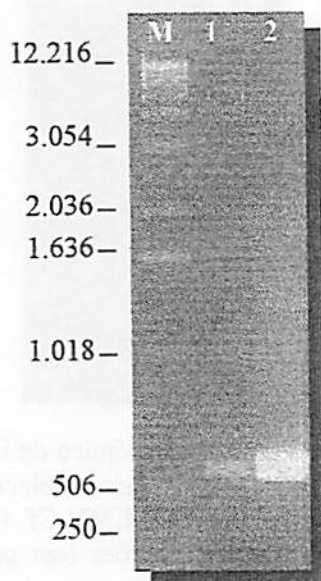


FIGURA 9. Padrão eletroforético dos fragmentos do RNA dos isolados de LMV amplificados por RT-PCR em gel de agarose 0,9%. M: marcador molecular de DNA (1 Kb "ladder"); LMV-LMV-AF198 (1) e LMV-LMV-Cf (2).

4.6.2 Clonagem e sequenciamento dos fragmentos de RT-PCR

A clonagem foi comprovada por meio da clivagem do plasmídeo recombinante pela enzima EcoR I, como pode ser observado na Figura 10. O LMV-Cf foi sequenciado a partir do nucleotídeo 9059 a 9432 (Figura 11), e comparada com isolados previamente sequenciados (Tabela 7), pertencentes ao patótipo I (LMV: número de acesso Gr4, Z78229 e Yar, Z78227), patótipo II (LMV: Go, U24663; 0, X97704; P, U24669; Hu, U24667; Hi, U24666; Ha, U24665; Fi, U24662; Sp, U24671; As, U24661; Pe, U24668; R, U24670 e Gazania, U24664), patótipo IV (GrB, Z78230 e E, X97705) e o isolado Gr5, Z78228 ainda não definido dentro de um dos patótipos (Pink, Kostova e Walkey, 1995a; Bos, Huijberts e Cuperus, 1994; Zerbini, Koike e Gilbertson, 1995; Revers et al., 1997).

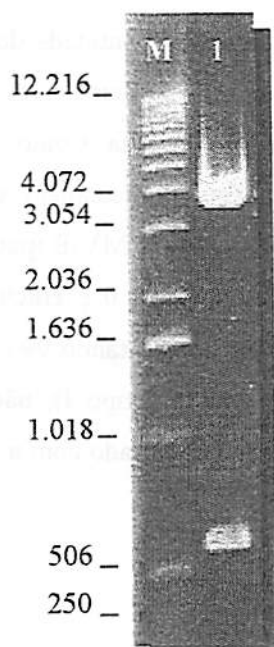


FIGURA 10. Clivagem enzimática do plasmídeo recombinante utilizando a enzima Eco RI, para o isolados LMV-Cf (1).

Após o alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas do isolado LMV-Cf e dos isolados acima citados (373 nucleotídeos) (Figura 11), utilizando o programa GCG~, verificou-se que o isolado LMV-Cf apresentou 99% de identidade com os isolados Gould (Go) da Califórnia e 98% com os isolados P da França e Hunter (Hu) e Hitchcock (Hi) da Califórnia, pertencentes ao patótipo II. Esse mesmo isolado (LMV-Cf) apresentou de 95 a 97% de identidade com os demais isolados do patótipo II provenientes da Califórnia (isolados: Ro, Pe, As, Sp, Fi, Ha) (Tabela 7).

Por outro lado, quando comparado com os isolados GrB e E pertencentes ao patótipo IV, a porcentagem de identidade da sequência apresentada pelo isolado LMV-Cf foi de 86 a 94%, respectivamente. Comparando ainda com os isolados Yar e Gr4, pertencentes ao patótipo I, e com o isolado Gr5 (não definido), o LMV-Cf apresentou de 85 a 87% de identidade (Tabela 7).

Mesmo considerando essa alta identidade do LMV-Cf com os isolados do patótipo II, não é possível separar esses isolados com base no sequenciamento total ou parcial do genoma. Como é observado na Tabela 7, o isolado LMV-Cf possui a mesma porcentagem de identidade com alguns isolados dos patótipos II e IV. O isolado LMV-E (patótipo IV) apresenta 94% de identidade com os isolados Gould (Go), 0 e Hitchcock (Hi), pertencentes ao patótipo II. Mesmo o isolado Gr5 apresentando 99 e 97% de identidade com os isolados GrB (patótipo IV) e Gr4 (patótipo I), não se enquadra em nenhum desses patótipos de LMV quando comparado com a caracterização utilizando as cultivares diferenciadoras.

A homologia entre as sequências de isolados do LMV que ocorrem em em diversas partes do mundo tem sido considerada como bastante útil para se determinar a origem desses isolados, pois parecem diferir por região de ocorrência (Revers et al., 1997). Na análise filogenética entre as sequências de nucleotídeos, o LMV-Cf apresentou uma homologia superior a 94% com os isolados da América do Norte (patótipo II) e da Europa (patótipo IV) (Figura 11). Esses dados sugerem que o isolado LMV-Cf seja classificado dentro desse mesmo grupo de isolados, que provavelmente deve ter a mesma origem.

É interessante notar que, às vezes, isolados do mesmo vírus, pertencentes ao mesmo grupo de patótipos, são capazes de induzir sintomas extremamente diferentes em uma certa hospedeira. Isso pode ser notado nesse trabalho, em que os sintomas causados pelo dois isolados do LMV em plantas de alface, cv. Regina 579, foram completamente diferentes, pois somente o LMV-Cf foi capaz de induzir nessa planta a formação de uma cabeça compacta ao final do ciclo. Nenhum dos muitos isolados de LMV testados no DFP/UFLA até o momento foram capazes de induzir essa reação em alface. Como a região do genoma do LMV-Cf que foi sequenciada, é considerada uma região hipervariável (Zerbini, Koike e Gilbertson, 1995), e apresentou uma alta identidade com os isolados pertencentes ao patótipo II, isso poderia constituir uma indicação de que pequenas variações no genoma do vírus podem induzir na planta hospedeira sintomas específicos bastante diferentes.

Outros autores como Pink, Kostova e Walkey (1992a) verificaram que isolados de um mesmo patótipo do LMV pode apresentar agressividades diferentes. Esse comportamento é comum também em outros *Potyvirus*. Andrade e Figueira (1992) observaram que plantas de batata reagiram com sintomas diferentes quando inoculados com isolados pertencentes ao mesmo grupo de estirpes do vírus Y da batata ("*Potato virus Y*" - PVY).

TABELA 7. Porcentagem de identidade na sequência de nucleotídeo do gene da capa protéica entre os isolados provenientes da Califórnia, Europa, Grécia e Yamen Arab Republic.

	CF	Go	0	P	Hu	Hi	Ha	Fi	Sp	As	Pe	Ro	E	GrB	Gr4	Gr5	Year
CF	—	99	96	98	98	98	97	97	96	95	95	95	94	86	86	85	87
Gould (Go)	—	—	99	99	98	98	97	97	96	96	96	96	94	88	89	88	87
0	—	—	—	98	99	99	98	97	97	96	96	96	94	88	88	88	86
P	—	—	—	—	97	98	97	96	96	95	95	95	93	88	89	88	85
Hunter (Hu)	—	—	—	—	—	100	98	97	97	96	96	95	93	87	87	86	86
Hitchcock (Hi)	—	—	—	—	—	—	98	97	97	97	97	94	94	87	87	87	86
Hartnell (Ha)	—	—	—	—	—	—	—	96	96	96	96	94	93	87	87	86	85
Firestone (Fi)	—	—	—	—	—	—	—	95	95	95	95	94	92	86	87	86	84
Spreckles (Sp)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	95	95	92	92	86	87	86	85
Asgrow (As)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	95	92	91	85	86	85	84
Pelo (Pe)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	92	91	86	86	85	84
Romaine (R)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	93	87	87	87	86
E	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	87	87	86	86
GrB	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	98	99	96
Gr4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	86
Gr5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	86
Year	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

	1				50
LMVFi	aaggcagtaa	aactgatgat	aggcaaaagg	actcagcgca	tccaaaggat
LMVFr	aaggcagtaa	aactgatgat	aggcaaaagg	actcagcgca	tccaaaggat
LMVHi	aaggcagtaa	aactgatgat	aagcgaaaga	gctcagcgca	tccaaaggat
LMVHu	aaggcagtaa	aactgatgat	aagcgaaaga	actcagcgca	tccaaaggat
LMV0	aaggcagtaa	aactgatgat	aagcaaaaga	actcagcgga	tccaaaggat
LMVGo	aaggcagtaa	aactgatgat	aagcaaaaga	actcagcgga	tccaaaggat
LMVcf	aaggcagtaa	aactgatgat	aagcaaaaga	actcagcgga	tccaaaggat
LMVP	aaggcagtaa	aactgatgat	aagcaaaaga	gctcagcgga	tccaaaggat
LMVHa	aaggcagtaa	aactgatgat	aagcaaaaga	gctcagcgca	tccaaaggat
LMVSp	aaggcagtaa	aactgatgat	aagcaaaaga	gctcagcgca	tccaaaggcg
LMVAs	aaggcagtaa	aactgatgat	aagcaaaaga	gctctgcgca	tacaaaggag
LMVPe	aaggcagtaa	aactgatgat	aagcaaaaga	gctcagcgca	tgcaaaaggct
LMVRo	aaggcagtaa	aactgatgat	aggcagaaga	actcagcgga	tccaaagaat
LMVE	aaggcagtaa	aatgatgat	aaacagaaga	gctcagcgga	ttcaaaagat
LMVYar	aagacaataa	agccgacaac	aaactgaaga	acactgcaga	ttcaaaagat

	51				100
LMVFi	aatatcatca	aagagaaggg	aagtggttct	ggtcagatga	agaaggatga
LMVFr	aatatcatca	aagagaaggg	aagtggttct	ggtcagatga	agaaggatga
LMVHi	aatatcatca	cagagaaagg	aagtggttct	gggcagatga	agaaggatga
LMVHu	aatatcatca	cagagaaagg	aagtggttct	gggcagatga	agaaggatga
LMV0	aatatcatca	cagagaaagg	aagtggttct	gggcagatga	agaaggatga
LMVGo	aatatcatca	cagagaaagg	aagtggctct	gggcagatga	agaaggatga
LMVcf	aatatcatca	cagagaaagg	aagtggctct	gggcagatga	agaaggatga
LMVP	aatatcatca	cagagaaagg	aagtggctct	gggcagataa	agaaggatga
LMVHa	aatatcatca	cagagaaagg	aagtggttct	gggcagatga	agaaggatga
LMVSp	aatatcataa	cagacagagg	aagtggttct	gggcagatga	agaaggatga
LMVAs	aatatcatca	cagggaaagg	aagtggttct	gggcagatga	agcaggatga
LMVPe	aatatcatca	cagagaaagg	aagtggttct	gggcagagga	agaaggatga
LMVRo	aatactatca	cagagaaagg	aagtggttct	gtgcaggatga	agaaggacga
LMVE	aatgtcatca	cggagaaagg	aagtggttct	gggcaggatga	ggaaggatga
LMVYar	agtgccgtca	cagaaaaagg	gagcggctct	gggcagatca	agaaaagatga

	101				150
LMVFi	cgacatcaac	gcagggctac	atggtaaaca	caccatacct	cgtacaaagg
LMVFr	cgacatcaac	gcagggctac	atggtaaaca	caccatacct	cgtacaaagg
LMVHi	cgacatcaac	gcagggctac	atggtaaaca	caccatgcct	cgtacaaagg
LMVHu	cgacatcaac	gcagggctac	atggtaaaca	caccatgcct	cgtacaaagg
LMV0	cgacatcaac	gcagggctac	atggtaaaca	caccatacct	cgtacaaagg
LMVGo	cgacatcaac	gcagggctac	atggtaaaca	caccatacct	cgtacaaagg
LMVcf	cgatatcaac	gcagggctac	atggtaaaca	caccatacct	cgtacaaagg
LMVP	cgacatcaac	gcagggctac	atggtaaaca	caccatacct	cgtacaaagg
LMVHa	cgacatcaac	gcagggctac	atggtaaaca	caccatacct	cgtacaaagg
LMVSp	cgacatcaac	gcagggctac	atggtaaaca	caccattcca	cggacaaagg
LMVAs	cgacatcaac	ccagggctac	atggtaaaca	catcatacct	cgtacaaagg
LMVPe	cgacatcaac	gcagggctac	atggtaaact	caccgtacct	cgtacaaagg
LMVRo	cgacatcaac	gcagggctac	atggtaaaca	caccatacct	cgtacaaagg
LMVE	cgacatcaac	gcagggctac	atggcaaaca	caccatacct	cgtacaaagg
LMVYar	ggacatcaac	gcagggctac	atggtaaaca	caccatacca	cgtacaaagg

	151				200
LMVFi	caatcacaca	gaaaatgaaa	ttaccaatga	tccgaggtaa	agtggcttta
LMVFr	caatcacaca	gaaaatgaaa	ttaccaatga	tccgaggtaa	agtggcttta
LMVHi	caatcacaca	gaaaatgaaa	ttaccaatga	tccgaggtaa	agtggcttta
LMVHu	caatcacaca	gaaaatgaaa	ttaccaatga	tccgaggtaa	agtggcttta
LMV0	caatcacaca	gaaaatgaag	ttaccaatga	tccgaggtaa	agtggcttta
LMVGo	caatcacaca	gaaaatgaag	ttaccaatga	tccgaggtaa	agtggcttta
LMVCf	caatcacaca	gaaaatgaag	ttaccaatga	tccgaggtaa	agtggcttta
LMVP	caatcacaca	gaaaatgaag	ttaccaatga	tccgaggtaa	agtggcttta
LMVHa	caatcacaca	gaaaatgaaa	ttaccaatga	tccgaggtaa	agtggcttta
LMVSp	caatcacaca	gaaaatgaaa	ttaccaatga	tccgaggtaa	agtggcttta
LMVAs	caatcacaca	gaaaatgaaa	ttaccaatga	tccgaggtaa	agtggcttta
LMVPe	caatcacaca	gaaaatgaaa	ttaccaatga	tccgaggtaa	agtggcttta
LMVRo	caatcacaca	gaaaatgaag	ttaccaatga	tccgaggtaa	agtggcttta
LMVE	caatcacaca	gaaaatgaag	ttaccaatga	tccgaggtaa	agtggcttta
LMVYar	caataacaca	gaagatgaaa	ttaccaatga	tccgaggtaa	agtggcttta

	201				250
LMVFi	aaccttgatc	atttgctgga	gtacgaaccg	aaccagagag	acatatcgaa
LMVFr	aaccttgatc	atttgctgga	gtacgaaccg	aaccagagag	acatatcgaa
LMVHi	aaccttgatc	atttgctgga	gtacgaacca	aaccagagag	acatatcgaa
LMVHu	aaccttgatc	atttgctgga	gtacgaacca	aaccagagag	acatatcgaa
LMV0	aaccttgatc	atttgctgga	gtacgaacca	aaccagagag	acatatcgaa
LMVGo	aaccttgatc	atttgctgga	gtacgaacca	aaccagagag	acatatcgaa
LMVCf	aaccttgatc	atttgctgga	gtacgaacca	aaccagagag	acatatcgaa
LMVP	aaccttgatc	atttgctgga	gtacgaacca	aaccagagag	acatatcgaa
LMVHa	aaccttgatc	atttgctgga	gtacgaacca	aaccagagag	acatatcgaa
LMVSp	aaccttgatc	atttgctgga	gtacgaacca	aaccagagag	acatatcgaa
LMVAs	aaccttgatc	atgtgctgga	gtacgaacca	aaccagagag	agatatcgaa
LMVPe	atccttgatc	atctgctgga	gtacgaacca	agccagagag	acatatcgaa
LMVRo	aaccttgatc	atttgctgga	gtacgaacca	aaccagagag	atatatcaaa
LMVE	aaccttgatc	atttgctgga	gtacgaacca	aaccagagag	acatatcaaa
LMVYar	aacctcgaac	atttgctgga	gtacgaacca	aaccagagag	acatatcgaa

	251				300
LMVFi	cacacgtgca	accagaaaac	agtacgagtc	atggtacgac	ggcgttaaga
LMVFr	cacacgtgca	accagaaaac	agtacgagtc	atggtacgac	ggcgttaaga
LMVHi	cacacgtgca	accagaaaac	agtacgagtc	atggtacgac	ggggttaaga
LMVHu	cacacgtgca	accagaaaac	agtacgagtc	atggtacgac	ggggttaaga
LMV0	cacacgtgca	accagaaaac	agtacgagtc	atggtacgac	ggggttaaga
LMVGo	cacacgtgca	accagaaaac	agtacgagtc	atggtacgac	ggggttaaga
LMVCf	cacacgtgca	accagaaaac	agtacgagtc	atggtacgac	ggggttaaga
LMVP	cacacgtgca	accagaaaac	agtacgagtc	atggtacgac	ggggttaaga
LMVHa	cacacgtgca	accagaaaac	agtacgagtc	atggtacgac	ggggttaaga
LMVSp	cacacgtgca	accagaaaac	agtacgagtc	atggtacgac	ggggttaaga
LMVAs	cacacgtgca	accagaaaac	agtacgagtc	atggtacgac	ggggttaaga
LMVPe	cacacgtgca	accagagtc	agtacgagtc	atggtacgac	ggggttaaga
LMVRo	cacacgtgca	accagaaaac	aatacagtc	atggtacgac	ggggttaaga
LMVE	cacacgvcg	actcaaaaac	aatacagtc	atggtacgac	ggggttaaga
LMVYar	cacacgtgca	actcagaagc	aatacagtc	atggtacgac	ggggtcaaga

	301				350
LMVFi	atgactacga	tgtggatgat	agtggcatgc	aattaattct	gaacggattg
LMVFr	atgactacga	tgtggatgat	agtggcatgc	aattaattct	gaacggattg
LMVHi	atgactacga	tgtggatgat	agtggcatgc	aattaattct	gaacggattg
LMVHu	atgactacga	tgtggatgat	agtggcatgc	aattaattct	gaacggattg
LMVO	atgactacga	tgtggatgat	agtggcatgc	aattaattct	gaacggattg
LMVGo	atgactacga	tgtggatgat	agtggcatgc	aattaattct	taacggattg
LMVCf	atgactacga	tgtggatgat	agtggcatgc	aattaattct	gaacggattg
LMVP	atgactacga	tgtggatgat	agtggcatgc	aattaattct	taacggattg
LMVHa	atgactacga	tgtggatgat	agtggcagtc	aattaattct	gaacggattg
LMVSp	atgactacga	tgtggatgat	agtggcatgc	aattaattct	gaacggattg
LMVAs	atgactacga	tgtggatgat	agtggcatgc	aactaattct	gaacggattg
LMVPe	atgactacga	tgtggatgat	agtggcatgc	aactaattct	gaacggattg
LMVRo	atgactatga	tgtggatgat	agtggcatgc	aattaattct	taatggattg
LMVE	atgactatga	tgtggatgat	aatggcatgc	aattaattct	gaacggattg
LMVYar	atgactatga	tgtggatgat	aatggcatgc	aattaatcct	aatgggtttg

	351		373
LMVFi	atggtttggt	gtatagaaaa	cgg
LMVFr	atggtttggt	gtatagaaaa	cgg
LMVHi	atggtttggt	gtatagaaaa	cgg
LMVHu	atggtttggt	gtatagaaaa	cgg
LMVO	atggtttggt	gtatagaaaa	cgg
LMVGo	atggtttggt	gtatagaaaa	cgg
LMVCf	atggtttggt	gtatagagaa	cgg
LMVP	atggtttggt	gtatagaaaa	cgg
LMVHa	atggtttggt	gtatagaaaa	cgg
LMVSp	atggtttggt	gtatagaaaa	cgg
LMVAs	atggtttggt	gtatagaaaa	cgg
LMVPe	atggtttggt	gtatagaaaa	cgg
LMVRo	atggtttggt	gtatagaaaa	cgg
LMVE	atggtttggt	gtatagaaaa	cgg
LMVYar	atggtttggt	gcatagagaa	cgg

FIGURA 11. Alinhamento das sequências parciais de nucleotídeos do gene da capa protéica do isolado LMV-LMV-Cf e os demais isolados pertencentes aos patótipos I, II e IV.

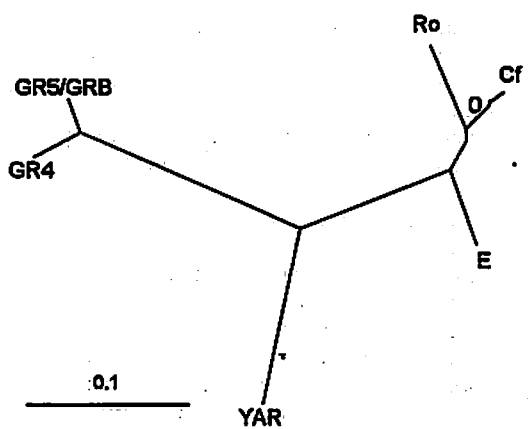


Figura 12. Árvore filogenética da porção N'terminal da CP

5. CONCLUSÃO

O vírus que causa sintomas de mosaico e formação de cabeça compacta, na alface cv. Regina 579, é um isolado do vírus do mosaico da alface (*Lettuce mosaic virus*), da família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*, que pertence ao patótipo I ou II.

De acordo com homologia entre as seqüências de nucleotídeos do LMV-Cf e os isolados da América do Norte (patótipo II) e da Europa (patótipo IV), que foi superior a 94%, e com a análise filogenética, o isolado LMV-Cf tem a mesma origem dos isolados da França, Espanha e da Califórnia.

A espécie *Crepis japonica* (L.) Benth. é uma planta daninha suscetível ao LMV, podendo ser considerada como uma fonte alternativa de inóculo em condições de campo.

Os sintomas provocados pelo isolado LMV-Cf foram diferentes dos sintomas provocados pelo isolado LMV-AF198 em plantas de alface cv. Hortência, cv. Tainá e cv. Regina 579, em *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *Crepis japonica*, *Pisum sativum* cv. Torta de Flor Roxa, indicando que apesar de pertencerem ao mesmo grupo de patótipo, possuem alguma diferença na sua patogenicidade

Todas as cultivares de alface comerciais testadas foram suscetíveis ao isolado LMV-Cf, enquanto a maioria das cultivares foram suscetíveis ao LMV-AF198, com exceção das cultivares Hortência e Tainá, que apresentaram um alto nível de tolerância a esse isolado.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, E.R.; FIGUEIRA, A.R. Incidência e sintomatologia de estirpes do vírus Y (PVY) nas regiões produtoras de batata do Sul de Minas Gerais. *Ciência e Prática*, Lavras, v.16, n.3, p.371-376, 1992.
- ATREYA, C.D.; RACCAH, B.; PIRONE, T.P. A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology*, New York, v.178, p.161-165, 1990.
- BANNEROT, H. BOULIDARD, L.; MARROU, J.; DUTEIL, M. Etude de l'hérédité de la tolérance au virus de la mosaïque de la laitue chez la variété Gallega de Invierno. *Etudes de Virologie. Annales de Phytopathologie*, v.1, p.219-226, 1969.
- BORJA, M; PONS, F. Na appraisal of diferent methods for the detection of walnut strain of cherry leafroll virus. *Journal of General Methods*, v.36, p.73-83, 1992.
- BOS, L.; HUIJBERTS, N.; CUPERUS, C. Further observations on variation of lettuce mosaic virus in relation to lettuce (*Lactuca sativa*), and a discussion of resistance terminology. *The European Journal of plant Pathology*, Netherlands, v.100, n.6, p.293-314, 1994.
- BRLANSKY, R.H; DERRICK, K.S. Detection of seed borne plant viruses using serologically specific electron microscopy. *Phytopathology*, St. Paul, v.69, n.1, p.96-100, 1979.
- BROADBENT, L.; TINSLEY, T.W.; BUDDIN, W.; ROBERTS, E.T. The spread of lettuce mosaic in the field. *Annals of Applied Biology*, v.38, p.689-706, 1951.
- CAMARGO, A.M.M.P.; CASER, D.V.; TAKAES, M.; CAMARGO FILHO, W.P. Estratégia de ação para produção orientada de hortaliças no Estado de São Paulo. *Informações Econômicas*, v.23, n.11, p.45-46, 1993.
- COSTA, A.S.; FOSTER, R. Lista de hospedeiros do vírus do vira-cabeça. *Bragantia*, v.2, n.3, p.83-91, 1942.
- COUCH, H.B.A.; GOLD, A.H. Rod-shaped particles associated with Lettuce mosaic. *Phytopathology*, St. Paul, v.44, p.715-17, 1954.

- DINANT, S.; LOT, H. Lettuce mosaic virus. *Plant Pathology*, England, v.41, p.528-42, 1992.
- DINANT, S.; LOT, H., ALBOUY, J.; KUZIAK, C.; MEYER, M e ASTIER-MANIFACIER, S. Nucleotide sequence of the 3' terminal region of lettuce mosaic potyvirus RNA shows a Gln / Val dipeptide at the cleavage site between the polymerase and the coat protein. *Archives of Virology*, Austria, v.116, n.1-4, p.235-352, 1991.
- DOLORES-TALENS, A.C.; HILL, J.H.; DURAND, D.P. Application of enzyme-linked fluorescent assay (ELFA) to detection of lettuce mosaic virus in lettuce seeds. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v.124, p.149-154, 1989.
- DUFFUS, J.E. Two viruses that induce symptoms typical of June Yellows of lettuce. *Plant Disease Reporter*, v.5, p.39-72, 1960.
- EDWARDSON, J.R.; CHRISTIE, R.G. The potyvirus group. Volumes 1-IV, Florida Agricultural Experiment Station Monograph 16, 1984.
- FIGUEIRA, A.R.; DOMIER, L.L.; DÁRCY, C.J. Comparasion of techniques of detection of barley yellow dwarf virus-PAV-IL. *Plant Disease*, v.81, n.11, p.1236-1239, November, 1997.
- FRASER, R.S.S. The genetcs of resistance to plant viruses. *Annual Review Phytopathology*, Palo alto, Califórnia, v.28, p.179-200, 1990.
- GHABRIAL, S.A.; SHEPHERD, R.J. A sensitive radioimmunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, Great Britain, v.48, p.311-317, 1980.
- GROGAN, R.G. Control of lettuce mosaic with virus-free seed. *Plant Disease* v.64, p.446-449, 1980.
- GROGAN, R.G. Lettuce mosaic virus control by use of virus-indexed seed. *Seed Science and Technology*, v.11, p.1043-1049, 1983.
- GROGAN, R.G.; WELCH, J.E. E BARDIN, R. common lettuce mosaic and its control by the use of mosaic-free seed. *Phytopathology*, St. Paul, v.42, p.573-578, 1952.

- HADIDI, A.; MONTASSER, M.S.; LEVY, L.; GOTH, R.W.; CONVERSE, R.H.; MADKOUR, M.A.; SKRZECKOWSKI, L.J.** Detection of potato leafroll and strawberry mild yellow-edge luteoviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. **Plant Disease**, v.77, p.595-601, 1993.
- JAFARPOUR, B.; SHEPHERD, R.J.; GROGAN, R.J.** Serological detection of bean common mosaic and lettuce mosaic viruses in seed. **Phytopathology**, St. Paul, v.69, p.1125-1129, 1979.
- JAGGER, I.C.** A transmissible mosaic disease of lettuce. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 20, n.10, p.737-741, February, 1921.
- KITAJIMA, E.W.; MARINHO, V.L.; LIN, M.T.; GAMA, M.I.C.S.; ÁVILA, A.C.** Mosaico necrótico da alface – Um vírus isométrico transmitido por afídeo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.5, p.409, 1980.
- KITAJIMA, E.W.; CARVALHO, A.M.B.; COSTA, A.S.** Morfologia do vírus do mosaico do picão. **Bragantia**, Campinas, v.20, p.503-512, 1961.
- KRAMER, M.; ORLANDO, A.; SILBERRSCHMIDT.** Estudos sobre uma grave doença de vírus, responsável pelo depercimento de nossas culturas de alface. **Biológico**, São Paulo, v.11, p.121-34, 1945.
- LANE, L.** A general method for detecting plant viruses. In: **MARAMOROSCH, K.** *Plant diseases of viral, viroid, mycoplasma and uncertain origem.* New Delhi: Oxford e IBM Publishing, p.1-15. 1992.
- MARROU, J.** Confirmation de la non transmission du virus de la mosaïque de la laitue par les graines chez la variété Gallega de Invierno. **Annales de phytopathologie**, v.1, p.213-218, 1969.
- MARROU, J.** Reflexions sur la dissemination du virus de la mosaïque de la laitue et sur la transmission de ce virus par la graine. **Annales des Epiphyties**, v.17, p.45-54, 1966.
- MCLEAN, D.L. E KINSEY, M.G.** Three variants of lettuce mosaic virus and methods utilized for differentiation. **Phytopathology**, St. Paul, v.52, p.403-406, May, 1963.

- MCLEAN, D.L. E KINSEY, M.G.** Transmission studies of a highly virulent variant of lettuce mosaic virus. *Plant Disease Reporter*, v.47, p.474-476, 1962.
- MELLO, R.N.; KRAUSE, R.; CARVALHO, M.G.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; PAVAN, M.A.; ZERBINI, F.M.** Cloning and partial sequencing of the capsid protein gene of two brasilian isolates of Lettuce mosaic Potyvirus (LMV) with distinct biological properties. *Virus: Reviews e Research, IXth National Meeting of Virology, São Lourenço- MG., 1998. (Suppl. 1) v.03, p.195, Novembro de 1998.*
- MILNE, R.G.; LUISONI, E.** Rapid immune electron microscopy of virus preparations. In: **MARAMOROSCH, K and KOPROWSCKI, H (eds).** *Methods in Virology*, v.VI, Academic Press, New York, p.265-281, 1977.
- BIOSSEGURANÇA/ CTNBio. Ministério da Ciência e Tecnologia.** *Transgênicos, C & T Brasil. Brasília, 1999, 48p.*
- MOGHAL, S.M.; FRANCKI, R.I.B.** Towards a system for the identification and classification of potyviruses. I. Serology and amino acid composition of six distinct viruses. *Virology*, v.73, p.350-362, 1976.
- MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D.** *Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer, Wien New York (Arch. Virol. (Suppl.) 10), 1995.*
- NEWBALL, A.G.** Seed transmission of lettuce mosaic. *Phytopathology*, St. Paul, v.13, p.104-106, 1923.
- PINK, D.A.C.; KOSTOVA, D. E WALKEY, D.G.A.** Differentiation of strains of lettuce mosaic virus. *Plant Pathology*, v.41, p.5-12, 1992.
- PINK, D.A.C.; LOT, H.; JOHNSON, R.** Novel pathotypes of lettuce mosaic virus - breakdown of durable resistance? *Euphytica*, Netherlands, v.63, p.169-17, 1992.
- PURCIFULL, D.E.; CHRISTIE, S.R.; ZITTER, T.A.; BASSETT, M.J.** Natural infection of lettuce and endive by *Bidens motile* virus. *Plant Disease Reporter*, v.55, p.1061-3, 1971.

- REVERS, F.; LOT, H.; SOUCHE, S.; LE GALL, O.; CANDRESSE, T.; DUNEZ, J.** Biological and molecular variability of lettuce mosaic virus isolates. *Phytopathology*, St. Paul, v.87, n.4, p.397-403, 1997a.
- REVERS, F.; YANG, S.J.; WALTER, J.; SOUCHE, S.; LOT, H.; LE GALL, °; CANDRESSE, T.; DUNEZ, J.** Comparison of the complete nucleotide sequences of the isolates of lettuce mosaic virus differing in their biological properties. *Virus Research*, v.47, p.167-177, 1997b.
- RIECHMANN, J.L.; LAÍN, S; GARCÍA, J.A.** Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology*, Great Britain, v.73, p.1-16, 1992.
- ROBERTSON, N.L.; FRENCH, R.; GRAY,S.M.** Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. *Journal of General Virology*, Great Britain, v.72, p.1473-1477, 1991.
- RYDER, E.J.** Inheritance of resistance to common lettuce mosaic. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v.95, n.3, p.378-379, 1970.
- RYDER, E.J.** Seed transmission of lettuce mosaic virus in mosaic resistant lettuce. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v.98, n.6, p.610-614, 1973.
- RYDER, E.J.** Transmission of common lettuce mosaic virus through the gametes of lettuce plants. *Plant Disease Reporter*, v.48, p.522 - 523, 1964.
- SAMBROOK, J; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T.** **Molecular cloning: A laboratory manual.** Cold spring harbor laboratory press, 2nd ed., New York, v.1, 1989.
- SHUKLA, D.D.; WARD, C.W.** Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the potyvirus group. *Journal General Virology*, Great Britain, v.69, p.2703-3710, 1988.
- SHUKLA, D.D.; WARD, C.W.** Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. *Archives of Virology*, Austria, v.106, p.171-200, 1989.

- SHUKLA, D.D.; WARD, C.W.; BRUNT, A.A. The potyviridae. CAB International, UK: Wallingford, v.1, 516p., 1994.
- SHUKLA, D.D.; WARD, C.W. Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group. *Adv. Virus Res.* v.36, p.273-314, 1989.
- SILVA, A.C.F.; REBELO, J.A. E MÜLLER, J.J.V. Produção de sementes de alface em pequena escala. *Agropecuária Catarinense*, v.8, n.1, p.41-44, Março, 1995.
- STANGARLIN, O.S. Variabilidade do vírus do mosaico da alface e comportamento de cultivares tolerantes de alface (*Lactuca sativa* L.). Botucatu-SP: UNESP, Fevereiro, 1997, 72p. (Tese- Doutorado em Proteção de Plantas).
- STANGARLIN, O.S.; DA SILVA, N.; PAVAN, M.A. Identificação das viroses causadores de mosaico em cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) resistente ao vírus do mosaico nas regiões produtoras do estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, São Paulo, v.21, n.1, p.49, 1995a.
- STANGARLIN, O.S.; DA SILVA, N.; PAVAN, M.A. Ocorrência e caracterização de estirpes do vírus do mosaico da alface (Lettuce mosaic virus - LMV) no Estado de São Paulo. *Horticultura Brasileira*, v.13, n.1, 1995b.
- STANGARLIN, O.S.; DA SILVA, N.; PAVAN, M.A. Utilização de cultivares de alface para caracterização de estirpe do vírus do mosaico da alface. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília, v.21, 429, 1996. (suplemento)
- SYLVESTER, E.S. Lettuce mosaic virus transmission by the green peach aphid. *Phytopathology*, St. Paul, v.45, p.357-369, 1955.
- TOMLINSON, J.A. Lettuce mosaic virus. CMI/ AAB, *Descriptions of Plant Viruses*, n.9, June, 1970.
- TOMLINSON, J.A. Lettuce mosaic virus. IN: BRUNT, A.A.; CRABTREE, K.; DALLWITZ, M.J.; GIBS, A.J.; WATSON, L. *Viruses of plants: Descriptions and lists from the vide database*. CAB. International, 1.484p., 1996.

- VON DER PAHLEN, A.; CRNKO, J. El virus del mosaico de la lechuga (*Marmor lactucae*) em Menoza y Buenos Aires. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, v.11, p.25-31, 1965.
- VUNSH, R.; ROSNER, A.; STEIN, A. The use of polymerase chain raction (PCR) for the detection of bean yellow mosaic virus in gladiolus. *Annals of Applied Biology*, v.117, p.561-569, 1990.
- WARD, C.W.; SHUKLA, D.D. Taxonomy of potyviruses: current problems and some solutions. *Intervirology*, v.32, p.269-296, 1991.
- ZERBINI JR., F.M. Grupo Potyvirus. In: FERNANDES, J.M., PRESTES, A.M., PICININI, E.C. *Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, W.C. Luz*, v.7, 1999.
- ZERBINI JR., F.M.; KOIKE, S.T.; GILBERTSON, R.L. *Gazania* spp.: A new host of lettuce mosaic potyvirus, and a potential inoculum source for recent lettuce mosaic outbreaks in the Salinas Valley of California. *Plant Disease*, v.81, n.6, p.641-646, June, 1997.
- ZERBINI, F.M.; KOIKE, S.T.; GILBERTSON, R.L. Biological and molecular characterization of lettuce mosaic potyvirus isolates from the Salinas Valley of California. *Phytopathology, St. Paul*, v.85, n.7, p.746-752, 1995.
- ZINK, F.W.; DUFFUS, J.E. Relationship of turnip mosaic virus susceptibility and downy mildew (*Bremia lactucae*) resistance in lettuce. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, v.94, n.4, p.403-407, 1969.
- ZINK, F.W.; DUFFUS, J.E.; KIMBLE, K.A. relationship of a non-lethal reaction to a virulent isolate of lettuce mosaic virus and turnip mosaic virus susceptibility in lettuce. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, v.98, n.1, p.41-45, 1973.
- ZINK, F.W.; GROGAN, R.G.; WELCH, J.E. The effect of the percentage of seed transmission upon subsequent spread of lettuce mosaic virus. *Phytopathology, St. Paul*, v.46, p.662-664, December, 1956.