



MAURÍCIO ANTÔNIO LUCAS

**SEQUENCIAMENTO GENÔMICO PARCIAL DE
UM ISOLADO ATÍPICO DO *LETTUCE MOSAIC
VIRUS* (LMV)**

LAVRAS - MG

2014

MAURÍCIO ANTÔNIO LUCAS

**SEQUENCIAMENTO GENÔMICO PARCIAL DE UM ISOLADO
ATÍPICO DO *LETTUCE MOSAIC VIRUS* (LMV)**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Agronomia/Fitopatologia para a obtenção do título de mestre.

Orientadora

Dra. Antonia dos Reis Figueira

LAVRAS-MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Lucas, Maurício Antônio.

Sequenciamento genômico parcial de um isolado atípico do
Lettuce mosaic virus (LMV) / Maurício Antônio Lucas. – Lavras :
UFLA, 2014.

72 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Antonia dos Reis Figueira.

Bibliografia.

1. Alface. 2. *Lettuce mosaic vírus* - LMV. 3. Seqüenciamento
genômico. 4. Sintomas. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 632.8

MAURÍCIO ANTÔNIO LUCAS

**SEGUENCIAMENTO GENÔMICO PARCIAL DE UM ISOLADO
ATÍPICO DO *LETTUCE MOSAIC VIRUS* (LMV)**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Agronomia/Fitopatologia para a obtenção do título de mestre.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2014.

Dr. Luiz Antônio Augusto Gomes UFLA

Dra. Priscilla de Sousa Geraldino Duarte UFLA

Dra. Antonia dos Reis Figueira
Orientadora

LAVRAS-MG

2014

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida, pela saúde e por me dar a oportunidade de estudar na UFLA e com isso conhecer pessoas incríveis que vieram a contribuir para o meu crescimento pessoal e profissional.

A toda minha família e amigos, pois sem o suporte e carinho deles nada disso seria possível.

A guerreira, a minha inspiração de vida, a pessoa que me faz levantar todos os dias e perceber que os obstáculos dessa vida não são nada para quem tem fé e acreditar em seus sonhos.

Mãe, essa dissertação dedico a você, que mesmo vindo de família humilde conseguiu realizar em 2011 seu sonho de formar seus três filhos e, mais que isso, fazer de nós pessoas de caráter e princípios.

Essa é para você, Warnete, continuar lutando e cuidando de toda a família.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tornar tudo isso possível.

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

Aos professores do Departamento de Fitopatologia (Edson Pozza, Eduardo Alves, Flávio Medeiros, Machado, Ludwig, Maria, Mário Lúcio, Mario Sobral, Paulo Estevão, Ricardo Magela e Vicente) pelos ensinamentos e harmoniosa convivência.

A professora Antonia dos Reis Figueira pela sua orientação, desde os tempos de graduação, por acreditar e possibilitar a realização deste sonho.

A doutora Priscilla, por aceitar o convite para compor a banca de avaliação e por se tornar meu anjo da guarda junto com a doutora Suellen no tempo que me ausentei da faculdade. Vocês foram peças fundamentais para a elaboração da dissertação e sem vocês nada disso seria possível.

Ao professor Luiz Antônio, pela disponibilidade e contribuição nesse trabalho como membro da banca.

Não poderia esquecer a minha família, que é à essência de tudo. Obrigado a minha mãe Warnete, ao meu pai Nestor, ao meu irmão Gugu e a minha irmã Eliza, por sempre me manterem no caminho certo. Obrigado aos meus avós, Antonio e Lilia, pelo abrigo e companhia durante essa jornada e ao meu primo irmão Felipe, “*tamo junto*”! Obrigado tios, primos e demais familiares.

Aos meus amigos da Virologia, Carzinho, Luciana, Nara, Beterraba, Barbara, Dani, Jéssica, Elisângela, Aurivan, Anderson, Jaciara, Patrick, Thaís e Marcelo muito obrigado pela companhia e ajuda. Em especial ao doutor e hoje meu gerente João Gir obrigado por ter acreditado em mim deste o começo e por todas as oportunidades que você me deu.

A todos os amigos do Departamento de Fitopatologia e da UFLA, pela convivência diária.

Aos amigos de sempre Wilder, Livia e Dengue e em especial a Sheila, por ter sido mais que minha companheira durante essa jornada.

Obrigado a todos que contribuíram mesmo que indiretamente, sem a ajuda e até mesmos sem as críticas nada disso seria possível.

“Porque para Deus nada é impossível”

LUCAS, 1:37

RESUMO

As doenças de etiologia viral são consideradas como um dos maiores problemas fitossanitários da cultura da alface, onde o *Lettuce mosaic virus* (LMV) tem sido o mais importante entre os vírus que ocorrem no Brasil. Nesse trabalho, um isolado de LMV, denominado de LMV-Cf, que causa sintomas atípicos, caracterizados por um fechamento da cabeça da alface cv. Regina 579, o que não ocorre quando essa está infectada com outros isolados desse vírus, foi parcialmente sequenciado e analisado, com a finalidade de investigar possíveis segmentos genômicos ligados a esse sintoma. Foram desenhados primers com base nas sequências disponíveis no GenBank e as sequências obtidas por RT-PCR foram analisadas e comparadas com outros isolados de LMV. Uma alteração significativa foi encontrada na proteína P3 do LMV-Cf, que apresentou a deleção de três nucleotídeos na região 3', resultando na exclusão de um aminoácido, o ácido glutâmico, na região C-terminal da proteína. Sendo assim, mesmo tendo mostrado identidades de nucleotídeos entre 93 e 97%, que representa a mesma variabilidade observada entre os demais isolados do GenBank, a identidade de aminoácidos foi menor, entre 92 e 95%, o que o separou desses isolados na árvore filogenética. Outra proteína que apresentou uma diferença marcante foi a 6K2. A identidade de aminoácidos dessa proteína, entre os isolados já sequenciados do GenBank, foi de 100%, sendo, portanto, a mais conservada, enquanto que a identidade de aminoácidos entre o LMV-Cf e esses isolados foi de 92%. Como existem evidências de que tanto a P3 como a 6K2 estão ligadas à expressão de sintomas nas plantas hospedeiras, elas foram consideradas candidatas a serem investigadas com a finalidade de se determinar se essas diferenças, em sua composição de aminoácidos, estariam relacionadas aos sintomas atípicos induzidos pelo LMV-Cf. Para isso, seria necessário realizar mutações sítio-dirigidas nos genes que codificam essas proteínas, e fazer a sua expressão na planta hospedeira.

Palavras-Chave: Alface. *Lettuce mosaic virus*, LMV. Sequenciamento genômico. Sintomas.

ABSTRACT

Virus diseases are considered one of the major problems of lettuce crops, in which the *Lettuce mosaic virus* (LMV) has been the most important among the viruses detected in Brazil. In this study, an isolate of LMV, named LMV-Cf, which causes closure in the head of lettuce cv. Regina 579, contrary to what occurs with other LMV isolates, was partially sequenced and analyzed. The main objective of the study was to investigate the correlations among its genomic diversity and the odd symptoms observed. The primers were designed based on the sequences available in GenBank, and the sequences generated by RT-PCR were analyzed and compared with the available sequences of other LMV isolates. A significant change was found in the P3 protein of LMV-Cf, which had a deletion of three nucleotides in the 3' region, resulting in the deletion of an amino acid, the glutamic acid, in the C-terminal region of the protein. Thus, even though the identity of nucleotides was shown between 93 and 97%, which had been the same variability observed among the other LMV isolates from GenBank, the amino acid identity was smaller, between 92 and 95%. Therefore, the LMV-Cf was separated of GenBank isolates in the phylogenetic tree. Another protein that showed a remarkable difference was the 6K2. The amino acid identities among the 6K2 proteins, of LMV isolates available in GenBank, were all 100 %, and therefore the more conserved among LMV proteins. However, the amino acid identity between LMV-Cf and these LMV isolates was 92%. Based on the evidence that both P3 and 6K2 are correlated to the symptoms expression in host plants, they were considered candidates to be investigated in order to determine whether these differences in their amino acid composition would be related to the atypical symptoms induced by LMV-Cf in lettuce plants. To get this information it is necessary to perform site-directed mutations in the genes encoding P3 and 6K2 proteins, and inducing their expression in the host plant.

Key Words: Lettuce. *Lettuce mosaic virus*, LMV. Genomic sequencing, Symptoms.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Alface (<i>Lactuca sativa</i>)	14
2.2.	<i>Lettuce mosaic virus</i> (LMV)	16
2.3	Formas de controle	19
2.4	Classificação de isolados virais do LMV	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	Origem e manutenção do inóculo	26
3.2	Desenho dos Primers	26
3.3	Extração de RNA viral	28
3.4	RT-PCR	28
3.5	Sequenciamento e análise das sequências obtidas	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

A Alface (*Lactuca sativa*) é uma das principais hortaliças cultivadas no mundo. De acordo com dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO (2013), a produção mundial de alface e chicória em 2012 foi estimada em aproximadamente 25 milhões de toneladas distribuídas em aproximadamente 1,1 milhão de hectares. A Ásia é a região que mais produz alface no mundo, com produção de cerca de 17 milhões de toneladas, que representa 68,5% da produção mundial, destacando a China com produção de 14 milhões de toneladas. Em seguida aparece a América com 4,6 milhões de toneladas correspondendo a 18,7% da produção mundial, a Europa com 2,7 milhões de toneladas correspondendo a 11 % da produção mundial e África e Oceania correspondendo com 1% e 0,8%, da produção mundial de alface, respectivamente (FAO, 2013). Suas folhas são comumente consumidas na forma de saladas e em sanduíches por todo o mundo, mas em alguns países orientais, tais como a China e Egito, a parte consumida é o caule, ao invés da folha como habitual, que pode ser consumido in natura, cozido, em conserva, desidratado ou macerado para a composição de molhos.

No Brasil, onde o consumo médio de hortaliças no país está em torno de 27,08 kg/pessoa/ano, a produção nacional da alface em 2011 foi estimada em 1,276 milhões de toneladas de acordo com Anuário de Hortaliças (2013), ocupando o 3º lugar na comercialização nacional de hortaliças do subgrupo folha, flor e haste com 79 mil toneladas, ficando atrás de repolho (240 mil toneladas) e couve-flor (85 mil toneladas) segundo 23 principais Centrais de Abastecimento Brasileiras (CEASAS) (CARVALHO; KIST; POLL, 2013).

Presença certa na mesa de toda família brasileira, a salada verde faz parte de uma refeição saudável na qual o ingrediente mais popular é a alface. Este famoso ingrediente é a principal fonte de vitaminas A, B₁, B₂, B₅ e C, e dos

minerais Ca, Fe, Mg, P, K e Na apresentado baixo teor de carboidratos. Tais atributos fazem da alface uma aliada na prevenção de doenças ligadas a alimentação, um tranquilizante natural e uma boa opção para pessoas que se preocupam em manter uma boa forma.

O plantio da alface ocorre em todo o território brasileiro por possuir características de fácil adaptação às variadas condições climáticas encontradas no país e por ser cultivada ao longo de todo o ano. A alface é uma das culturas mais plantadas por pequenos produtores e em hortas domésticas. Por possuir uma vida pós-colheita curta, o cultivo extensivo da alface é realizado nos ‘cinturões-verdes’, zonas produtoras concentradas perto das grandes metrópoles.

A incidência de doenças na cultura da alface pode causar perdas de até 100%, dependendo das condições climáticas e dos tratos culturais. Além das diversas doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides das galhas (*Meloidogyne* spp.) (PAVAN et al., 2005; SILVA; LIMA NETO, 2007), as doenças de etiologia viral são consideradas como o maior problema fitossanitário dessa cultura. Diferentes vírus já foram encontrados no Brasil como: *Lettuce mosaic virus* (LMV), *Lettuce mottle virus* (LeMoV), *Bidens mottle virus* (BiMoV), *Bidens mosaic virus* (BiMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Lettuce necrotic yellow virus* (LNYV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWS), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ring spot virus* (GRSV), *Lettuce big vein virus* (LBVV) e *Mirafiori lettuce virus* (MiLV) (KIITAJIMA et al., 1986; KIITAJIMA et al., 1993; PAVAN et al., 2005). Entretanto, o vírus causador de maior dano econômico à cultura da alface no Brasil, bem como em todo o mundo, tem sido o LMV, cujo controle no campo depende da adoção de medidas preventivas.

A sintomatologia apresentada pela alface quando infectada pelo LMV é bastante variada, podendo apresentar deste mosaico: nanismo, distorção ou amarelecimento das folhas, mosqueado, enfezamento, manchas necróticas ou

necrose nas nervuras, má formação da cabeça e até a morte da planta infectada (GROGAN; WELCH; BARDIN, 1952). Porém, sintomas atípicos virais são comumente relatados em todo o mundo, como o sintoma atípico de fechamento da cabeça da alface, causado ao cultivar Regina 579 quando infectado pelo isolado de LMV denominado LMV-Cf (OLIVEIRA et al., 2005). Com isso fica evidente a carência de estudos genéticos dos isolados de LMV dispersos no mundo inteiro e que poderiam dar mais prerrogativas e maior respaldo para explicação da causa de sintomas atípicos em determinados cultivares da alface. O objetivo deste trabalho foi sequenciar e analisar o genoma do isolado LMV-Cf para comparação com os demais isolados de LMV presentes no GenBank, buscando correlacionar possíveis segmentos genômicos que poderiam estar relacionados aos sintomas atípicos de fechamento da cabeça observados nas plantas de alface cv. Regina 579.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Alface (*Lactuca sativa*)

A alface pertence à família *Asteraceae*, subfamília *Cichorioideae*, tribo *Lactuceae*, gênero *Lactuca* L. e espécie *Lactuca sativa*. Originária da região do Mediterrâneo esta espécie já era utilizada como planta medicinal há 4.500 A.C. e provavelmente é descendente de espécies selvagens como a *Lactuca serriola* L. (KUANG et al., 2008). A sua domesticação ocorreu por volta de 2.500 A.C, no Antigo Egito, onde era usada para a extração de óleo das sementes, se tornando a única espécie do gênero *Lactuca* domesticada como hortaliça. A sua vinda para o Brasil ocorreu por intermédio dos portugueses no período da colonização (GOTO; TIVELLI, 1998).

Devido às exigências climáticas da espécie, a produção mundial concentra-se no Hemisfério Norte, sendo as principais regiões produtoras a China, Estados Unidos (Califórnia), Espanha, Itália, Iran e Japão (FAO, 2013). No Brasil em 2011 estima-se que a produção de alface tenha somado 1,276 milhões de toneladas (CARVALHO; KIST; POLL, 2013), sendo que a produção se concentra nas regiões Sudeste e Sul, que juntas somam mais de 80% do total produzido no país. Os estados com maior produção em ordem decrescente são: São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Paraná, segundo os dados disponíveis no ultimo Censo Agropecuário do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2006).

Atualmente a alface é um dos produtos hortícolas mais consumidos em saladas no Brasil e no mundo, sendo que em 2012 foram comercializados 79 mil toneladas de alface nas Centrais de Abastecimento Brasileiras (CEASAs) (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2013). Uma planta de alface com 350g apresenta 56 kCal, contendo 95,80% de água, 2,3%

de hidratos de carbono, 1,20% de proteínas, 0,50 % de sais minerais (potássio, fósforo, cálcio, sódio, magnésio e ferro) e 0,20% de gorduras. Contém ainda vitamina A e as vitaminas dos complexos B (B₁, B₂ e B₅) e C (FRANCO, 1987).

As cultivares de alface disponíveis no mercado podem ser agrupadas em cinco tipos morfológicos principais, com base na formação da cabeça e tipo de folhas (HEINZ; SUNAGA, 2009): 1) repolhuda lisa: folhas lisas, delicadas e macias, com nervuras pouco salientes, com aspecto oleoso (“Manteiga”), formando cabeça típica e compacta como as cultivares Aurora, Boston Branca, Elisa, Luisa e Piracicaba 65; 2) repolhuda crespa ou americana: folhas crespas, consistentes e crocantes, cabeça grande e bem compacta, como as cultivares America Delícia, Iara, Nabuco, Raider e Salinas; 3) solta lisa: folhas lisas e soltas, relativamente delicadas, sem formação de cabeça compacta como as cultivares Babá de Verão, Regina 579, Regina de Verão e Vitória de Verão; 4) solta crespa: folhas grandes e crespas com textura macia, mas consistente, sem formação de cabeça, podendo ter a coloração verde como as cultivares Brisa, Elba, Hortência, Marianne e Verônica, ou coloração roxa como as cultivares Maravilha Quatro Estações, Mimosa Vermelha, Salad Bowl Roxa, Veneza Roxa e Vermelha Ruby; 5) romana: folhas tipicamente alongada, dura, com nervuras claras e com uma cabeça fofa e alongada, na forma de cone, como é o caso das cultivares Branca de Paris, Ideal Cós e Romana Balão.

No Brasil as alfaces mais comercializadas são as do tipo crespas, americana e lisa. Atualmente no país o tipo de alface crespa é o mais comercializado, com 60% do volume de comercialização no CEAGESP de São Paulo (COSTA; SALA, 2012). O padrão varietal da alface do tipo crespa mais aceita pelo consumidor no país são as alfaces com folhas de coloração verde clara, semelhante à coloração do tipo lisa. Outro grupo com comercialização expressiva é o da alface americana que ocupa 34% do mercado, sendo muito utilizado no segmento de *‘fast food’* (COSTA; SALA, 2012). Segundo os

mesmos autores, em relação às mudanças ocorridas no cultivo de alface no país nos últimos anos, consideram como acontecimento mais significativo à substituição no cultivo da alface do tipo lisa (tipo White Boston) pela alface do tipo crespa (Grand Rapids). Isso aconteceu devido às características vantajosas apresentadas pela alface do tipo crespa em relação ao tipo lisa que não apresenta pendoamento e formação de cabeça ao serem cultivadas no verão e por terem se adaptado ao sistema de comercialização brasileiro em caixas de madeira com mínimo de injúrias e quebras das folhas.

Há hoje no mercado brasileiro de sementes, a existência de várias cultivares importadas que normalmente recebem nomes em português no lugar do nome original, e as cultivares nacionais que são produzidas por empresas de sementes parceiras de institutos de pesquisa do país, gerando cultivares mais adaptadas ao nosso clima tropical (COSTA; SALA, 2005; LÉDO; SOUSA; SILVA, 2000). Atualmente a cultivar de alface do tipo crespa preferida pelos produtores é a Vanda, da empresa Sakata, que apresenta como principais vantagens o ciclo rápido, resistência ao LMV e porte grande da planta além da boa aceitação no mercado consumidor.

2.2. *Lettuce mosaic virus* (LMV)

O vírus do mosaico da alface pertence ao gênero *Potyvirus* apresenta partículas virais filamentosas e flexíveis, contendo RNA de fita simples senso positivo (ssRNA+) com 750 x 13 nm (DOUGHERTY; CARRINGTON, 1988). O seu genoma possui uma única ORF de 10.080 nucleotídeos (nt), excluindo a cauda poli(A), que codifica uma poliproteína com 3225 aminoácidos (aa) e possui uma região 5' e uma região 3' não codificadoras, contendo 103 nt e 212 nt, respectivamente. Após a sua síntese, essa proteína sofre uma auto-clivagem, dando origem a 10 proteínas (REVERS et al., 1997): 1) P1 (50 kDa), cuja

função é proteinase, além de atuar como fator de amplificação do genoma e ter um possível envolvimento na infectividade e acúmulo viral (RAJAMAKI et al., 2005; VERCHOT; CARRINGTON, 1995; VERCHOT; KOONIN; CARRINGTON, 1991); 2) HC-PRO (52 kDa) é supressora do silenciamento gênico pós-transcricional, mas também apresenta a função de proteinase e auxilia na transmissão por afídeos, podendo ainda estar envolvida na determinação da severidade de sintomas induzidos pelo LMV (ANANDALAKSHMI et al., 1998; GERMAN-RENATA et al., 2000; ROJAS et al., 1997); 3) P3 (42 kDa), não tem função definida, mas pode estar envolvida com a replicação viral, sendo um fator acessório à replicação do genoma (URCUQUI-INCHIMA; HAENNI; BERNARDI, 2001); 4) CI (71 kDa), possui atividade de helicase, responsável pela separação da fita dupla de RNA e também auxilia no movimento célula-a-célula (CALDER; INGERFELD, 1990); 5) 6k₁ (6 kDa) e 6) 6k₂ (6 kDa), estão envolvidas na associação do complexo replicativo com as membranas (SCHAAD; LELLIS; CARRINGTON, 1997), sendo que a 6k₂ pode também estar envolvida na indução de sintomas e no movimento sistêmico como mostrado para o potyvirus *Potato virus A* (SPETZ; VALKOMEN, 2004); NIa se auto cliva dando origem a duas poliproteínas: 7) NIa (27 kDa) que parece atuar na infectividade, se associando ao fator de iniciação (eIF4E); e movimento à curtas e longas distâncias (MURPHY et al., 1996; RUFFEL et al., 2002) e 8) NIa-VPg (22 KDa) que está envolvida na quebra de resistência de cultivares de alface contendo o gene *mo1*¹ (SCHAAD; ANDERBERG; CARRINGTON, 2000; WITTMAN et al., 1997); 9) Nib (60 kDa), tem função de polimerase, na síntese de novas cópias de RNA viral (LAÍN et al., 1989); 10) CP (31 kDa), é a proteína do capsídeo e atua também na transmissão pelo afídeo vetor e no movimento célula-a-célula e a longas distâncias (ATREYA; RACCAH; PIRONE, 1990; DOLJA et al., 1995). Recentemente Chung et al. (2008) descreveu uma nova proteína embutida no

genoma dos *Potyvirus*, a qual chamou de PIPO. Ao estudar o genoma do *Turnip mosaic virus* (TuMV), com o uso do software MLOGD, foi identificado o motif G₁₋₂ e A₆₋₇ responsável pela mudança de frame para +2, e expressão da proteína em fusão com a região N-terminal da proteína P3. Os autores não relataram as funções específicas dessa proteína.

O primeiro relato mundial do mosaico da alface ocorreu na Flórida (EUA) em 1921 (JAGGER, 1921). No Brasil a doença foi relatada pela primeira vez por Kramer, Orlando e Silberschmidt (1945). Atualmente a doença se encontra espalhada por todos os continentes, incluindo Europa, América Norte e Sul (México, EUA, Argentina, Brasil e Uruguai), oeste da Índia (Bermuda), África, Oriente Médio (Egito, Israel, Jordão, Iraque, Iran e Turquia), Ásia (China e Japão) e Oceania (Austrália, Tanzânia e Nova Zelândia) (GERMAN-RENATA; WALTER; LE GALL, 2008). Além da sua grande expansão geográfica, o LMV possui uma vasta gama de hospedeiros pertencentes a 60 gêneros diferentes, com destaque para as espécies da família *Asteraceae*, incluindo as espécies de alface: comum (*Lactuca sativa*), espinho (*L. serriola*) e selvagem (*L. virosa*); endívia (*Chicorium endivia*) e chicória (*C. intybus*), cártamo ou açafraão-bastardo (*Carthamus tinctorius*), a margarida do cabo (*Osteospermum* spp.) e a gazânia (*Gazania rigens*), representantes de plantas ornamentais, além de outras famílias com grande importância agrícola como *Brassicaceae*, *Curcubitaceae*, *Solanaceae* e *Fabaceae* (DINANT; LOT, 1992; GERMAN-RENATA, WALTER; LE GALL, 2008).

Assim como acontece com a maioria dos *Potyvirus*, o LMV é transmitido de maneira não persistente por afídeos, cujo primeiro relato de transmissão ocorreu na Flórida-EUA. Os principais vetores que atuam na disseminação do LMV no campo são o *Myzus persicae* e *Macrosiphum euphorbiae* (JAGGER, 1921), porém sabe-se que diversas outras espécies de afídeos também podem atuar como vetores (*Acyrtosiphon scariolae*,

Acythosiphon pisum, *Aphis gossypii*, *M. pericae*, *M. euphorbiae*, *Nasonovia ribisnigri*, *Rhopalosiphum pseudobrassicae*, etc) (DINANT; LOT, 1992).

A maioria dos isolados de LMV também são transmitidos via sementes de alface, podendo ser infectadas através do grão de pólen e/ou do óvulo de plantas infectadas. Nas sementes, o vírus pode ser encontrado em pequenas concentrações no embrião, tegumento, endosperma e pericarpo (KRAUSE-SAKATE et al., 2002; RYDER, 1973), sendo que a taxa de transmissão do LMV varia de acordo com a espécie infectada: em sementes de alface pode chegar a 15%, mas em sementes de *Chenopodium quinoa* atinge a taxa de 30 % (BATISTA; MARINHO, 2001).

A sintomatologia apresentada pela planta infectada pelo LMV geralmente é variável, caracterizando-se por mosaico, nanismo, distorção ou amarelecimento das folhas, mosqueado, enfezamento, manchas necróticas ou necrose nas nervuras, má formação da cabeça e até a morte das plantas, dependendo da cultivar, do isolado viral e das condições climáticas (GERMAN-RENATA; WALTER; LE GALL, 2008; GROGAN et al., 1980).

2.3 Formas de controle

O controle do LMV deve ser de caráter essencialmente preventivo, como o uso de sementes livres de vírus e o controle de plantas daninhas, passando por um período anual de pelo menos duas semanas sem o cultivo de alface numa mesma área e eliminação de possíveis plantas hospedeiras (FALK; PURCIFULL, 1983; GROGAN; WELCH; BARDIN, 1952), além do uso de sementes certificadas, realizar a sua análise, empregando os diversos testes disponíveis, desde os mais simples como o teste biológico, que envolve o plantio e eliminação das plantas com suspeita de virose (GERMAN-RENATA et al., 2000), até o uso de técnicas mais eficientes como o Teste sorológico ELISA

(*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) (CLARK; ADAMS, 1977) e testes moleculares como o RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) (PEYPELUT et al., 2004).

Outro método de controle preventivo bastante eficiente é o uso de cultivares resistentes, muito difundido na Europa e no resto do mundo (DINANT; LOT, 1992). Existem dois genes recessivos, *mo1*¹ e *mo1*², que conferem resistência a cultivares de alface contra o LMV, e um gene dominante *Mo2* que confere resistência a poucos isolados de LMV, motivo pelo qual não é usado em programas de melhoramento genético pela ineficiência contra a maioria dos isolados de LMV (BOS; HUIJBERTS; CUPERUS, 1994; DINANT; LOT, 1992; REVERS et al., 1997).

O gene *mo1*¹, antigamente chamado de *g*, foi identificado na cultivar Argentina Gallega de Invierno por Von der Pahlen e Crnko (1965) e é o mais usado no programa de melhoramento de cultivares da Europa entre numerosas variedades incluindo *butterhead* (cabeça de manteiga), *Batavia*, *tipo cos* ou *latin* e *crisphead* (cabeça crespa) (PINK; KOSTOVA; WALKEY, 1992). Em acessos de *Lactuca sativa* do Egito, o gene *mo1*² foi identificado em PI 251245, por Ryder (1970), conhecido anteriormente por *mo*. Esse gene é o mais difundido entre os programas de melhoramento dos Estados Unidos, em dois tipos de alface *crisphead* (cabeça crespa) e *tipo cos* ou *latin* (PINK; KOSTOVA; WALKEY, 1992). German-Renata, Walter e Le Gall (2008) descrevem os alelos *mo1*¹ e *mo1*², como sendo resultados de duas mutações no alelo *mo1*⁰, encontrado para a formação do código do fator de alongação dos Eucariotos (eIF4E) em alface. Dependendo do isolado viral que infectar as cultivares de alfaves contendo os genes *mo1*¹ e *mo1*², podem ser classificados como resistentes (quando o vírus não se acumula nos tecidos da planta) ou tolerantes (quando existe o acúmulo de partículas virais, porém os sintomas induzidos não são significativos).

No Brasil a resistência genética conferida pelos genes *mo1*¹ e *mo1*² permaneceu estável por mais de 20 anos, sendo responsável pela baixa incidência do mosaico da alface nos campos. O primeiro cultivar a ser lançado no Brasil com resistência ao LMV foi “Brasil 48” pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), no qual a fonte de resistência foi proveniente da cultivar argentina “Gallega de Invierno” (NAGAI, 1979). Posteriormente foram lançadas várias cultivares com resistência ao LMV, a P.I. 251245-9, provenientes de *L. serriola*, e as cultivares da serie Brasil: 202, 221, 303, 304 e 311 (NAGAI, 1993; NAGAI; COSTA, 1971). Plantas com os genes *mo1*¹ e *mo1*² não são imunes ao vírus, mas esses se multiplicam nelas mais lentamente que em cultivares susceptíveis e a manifestação de sintomas é mais branda (PINK; LOT; JOHNSON, 1992). Em levantamento realizado no estado de São Paulo em 1994, foram observados sintomas de LMV em cultivares comerciais de alface resistentes ao LMV, ‘Brasil-303’ e ‘Elisa’, contendo os genes *mo1*¹ e *mo1*² (STANGARLIN et al., 1995). Entretanto, posteriormente foi identificado um novo variante do LMV pertencente ao patotipo IV, capaz de quebrar a resistência conferida pelos genes presentes nesses materiais (STANGARLIN; PAVAN; DA SILVA, 2000).

2.4 Classificação de isolados virais do LMV

Devido à ocorrência de um grande número de isolados do LMV e a sua distribuição em todo o mundo, tornou-se necessário o agrupamento desses isolados para facilitar e agilizar os estudos. Pink, Lot e Johnson (1992), propuseram a classificação de 6 isolados de LMV, provenientes da Espanha (LMV-E), Estados Unidos (LMV-F), França (LMV-9), Inglaterra (LMV-W0) e Iêmen (LMV-Yar), capazes de causar sintomas atípicos, em patotipos I, II e III de acordo com a sua capacidade de quebrar a resistência, conferida pelos genes

de resistência Mo2, mo1¹. O patotipo I foi constituído por isolados de LMV que infectam apenas cultivares que não possuem qualquer gene de resistência (ex. Salinas); o patotipo II, por isolados que são capazes de infectar cultivares que possuem o gene Mo2 (ex. Ithaca), e não são capazes de infectar cultivares com genes mo1¹ e mo1², e o patotipo III, constituído por isolados que superam a resistência conferida pelos genes Mo2 (ex. Ithaca) e pelo gene mo1¹ (ex. Malika e Calona). Além desses patotipos, outros isolados atípicos têm sido relatados. A cultivar 'Salinas 88', que contém o gene mo1², é resistente aos patotipos I, II e III, entretanto, mostrou-se susceptível ao isolado GR5 originário da Grécia, sugerindo a existência de outro patotipo (BOS; HUIJBERTS; CUPERUS, 1994), que não se enquadra na classificação proposta por Pink, Lot e Johnson (1992). Assim sendo, esse patotipo IV é formado por isolados que são capazes de quebrar a resistência de todos os genes Mo2 (ex. Ithaca), mo1¹ (ex. Malika e Calona) e mo1² (ex. Salinas 88 e Vanguard 75). A agressividade dos isolados de LMV pertencentes ao patotipo IV é maior do que os do patotipo II (JADÃO et al., 2002). Isso deve ocorrer devido ao cultivo intensivo e contínuo da alface, que é realizado nos grandes polos de produção, propiciando um aumento na pressão do inóculo do LMV, aliado à sua capacidade de se multiplicar em cultivares resistentes (mo1¹ e mo1²), culminando no aparecimento do novo patotipo.

A maioria dos isolados de LMV é classificada como patotipo II, porém há um grande número de relatos recentes da ocorrência de novos isolados da Europa, Oriente Médio e Brasil, classificados como patotipo IV, quebrando a resistência dos genes mo1¹ e mo1² (KRAUSE-SAKATE et al., 2002; REVERS et al., 1997). No estado de São Paulo foi relatada a primeira ocorrência do patotipo IV de LMV no Brasil (STANGARLIN; PAVAN; DA SILVA, 2000). Krause-Sakate et al. (2001) ao realizar a análise molecular de dois isolados provenientes do Brasil, LMV AF198 e AF199, observou que o isolado AF199

apresentava similaridade filogenética com isolados provenientes dos EUA, França e Chile, sugerindo que a entrada do patotipo IV no país pode ter ocorrido por sementes infectadas oriundas desses países.

Outra classificação foi proposta por Krause-Sakate et al. (2002), baseadas no alinhamento de 73 isolados de diferentes localidades: 24 isolados da Grécia (Gr1, Gr4, Gr5, Gr5b, Gr6, Gr8, Gr10, Gr17, Gr18, GrB, GrB7, GrC1, GrC4, GrD2, GrD5, GrE4, GrE6, GrH1, GrH7, GrI1, GrI4, GrJ1, GrJ5 e Knossos), 14 da Tunísia (Tn2, Tn3, Tn4, Tn9, Tn13, Tn19b, Tn19r, Tn21.4, TnC, TnD, TnOL2, TnOL3, TnRL1 e TnSaR), 9 da França (0, 1, 13, 9, Aud, Fr1, Fr2, Fr3 e Fr4), 4 do Brasil (AF 198, AF 199, Br6 e Br21), 3 do Egito (Eg1, Eg6 e Eg7), 2 da Austrália (A231 e A435), 2 do Senegal (Sn1 e Sn2), Dinamarca (Dg), Japão (Dk), Espanha (E), República do Iêmen (Yar) e China (Yajang), além de 10 contaminantes de sementes (CSB0, CSB1, CSB2, CSB3, CSB4, CSB5, CSB6, CSB7, CSB8 e CSB9), na região variável de junção das proteínas NIB-CP contendo 216 nt. Na classificação a autora fez uma correlação das propriedades biológicas apresentadas por cada isolado, como capacidade de transmissão por sementes e quebra de resistência aos genes $mo1^1$ e $mo1^2$, com as propriedades moleculares.

Analisando as árvores filogenéticas formadas com base nas sequências de nucleotídeos e aminoácidos, os isolados de LMV foram separados em 4 grupos distintos: o grupo 'LMV-Common' composto por 37 isolados (Fr1, Tn21.4, Dg, 0, CSB3, GrH7, GrE6, GrI1, GrJ1, GrJ5, GrC1, Sn2, CSB7, Tn2, GrI4, GrH1, GrD2, Sn1, TnOL3, CSB5, GrE4, Tn19r, Tn9, AF198, Knossos, Dk, CSB6, A231, TnSaR, GrD5, Yuhang, CSB8, GrB7, TnRL1, Tn3, Tn19b e GrC4) incluindo alguns dos isolados mais conhecidos, constituído por isolados transmitidos via sementes e controlados pelos genes $mo1^1$ e/ou $mo1^2$; grupo 'LMV Most', contendo 13 isolados (Br21, CSB1, CSB9, TnD, TnC, CSB4, CSB2, Tn13, Tn4, CSB0, 13, Aud e AF 199) transmitidos por sementes e que

tem a capacidade de quebrar a resistência de ambos os genes $mo1^1$ e/ou $mo1^2$; Grupo de isolados da Grécia (Gr17, Gr8, Gr4, Gr1, Gr10, Gr6, Gr18, Gr5b, GrB e Gr5) e isolado da República do Iêmen (Yar), que não são transmitidos por sementes e tem a capacidade de quebrar a resistência dos genes $mo1^1$ e $mo1^2$; Grupo RoW (Eg6, Eg1, Eg7, E, Fr3, Br6, A435, Fr4, 9, Fr2 e TnOL2) formado pelos isolados atípicos.

O fato de os isolados pertencentes ao grupo de 'LMV Most' aliarem as características de quebra de resistência dos genes presentes nas cultivares de alface com a transmissão via sementes é preocupante, pois com a disseminação por sementes esses isolados podem obter uma distribuição geográfica imensa. Por isso é importante à criação e uso de técnicas para diferenciação de isolados de 'LMV Most' e 'LMV Common'. Foi desenvolvido em 2004, um par de primers (Most5930p e Most6544p) específicos para a identificação de isolados 'LMV Most', com base na região central da proteína VPg, que é a menos afetada por recombinações naturais dos isolados 'LMV Most', e por permitir a identificação de isolados 'LMV Most' em situações de infecções mistas com outros isolados (PEYPELUT et al., 2004). No mesmo ano foi relatado a ocorrência do isolado LMV-Tn2 como sendo um recombinante do 'LMV Most' e 'LMV Common', mostrando similaridade de nucleotídeos de 98% com isolado Most (AF 199) e 93% com isolado Common (LMV 0), e que a possível região recombinante ocorreu entre 2859 nt e 4797 nt, correspondente as proteínas P3 e CI no genoma de LMV (KRAUSE-SAKATE et al., 2004).

É imprescindível um estudo mais completo de isolados atípicos de LMV pelo mundo para a descoberta de prováveis recombinantes ou de novos grupos de isolados de LMV. Oliveira et al. (2005) foi o primeiro a descrever o isolado LMV-Cf, que foi coletado em plantas de alface cv. Regina 579 com sintomas de mosaico, causando a formação de sintoma atípico de formação da cabeça. O mesmo autor classificou o isolado LMV-Cf como possível patotipo II.

Analisando a sequência da região N- terminal contendo o gene da capa protéica, observou-se que o isolado LMV-Cf apresentou identidade com os isolados da América do Norte (patotipo II) e da Europa (patotipo IV) superior a 94%. Na análise filogenética, o isolado brasileiro se agrupou com isolados da França (LMV 0), Espanha (LMV E) e Califórnia (LMV Ro), indicando uma possível origem geográfica em comum.

Costa e Pinto (1997) descrevem algumas heranças de características genéticas da alface, como a cor das sementes, forma de folhas, pendoamento e formação da cabeça, cerosidade das folhas, morfologia e coloração foliar. O autor descreve que a formação da cabeça é um processo complexo, afetado por fatores ambientais e genéticos. A genética da formação da cabeça é quantitativa, e este caractere é governado por 3 pares de genes K, H e Ca e também um número de modificadores. O gene K (ausência de formação de cabeça) é dominante sobre k (formação de cabeça) (LINDQVIST, 1960).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Origem e manutenção do inoculo

O isolado de LMV sequenciado nesse trabalho foi coletado em uma área de cultivo de alface localizada no estado do Rio de Janeiro, tendo recebido o nome de “cabeça fechada” (LMV-Cf) devido à sintomatologia apresentada em alface da cultivar “Regina 579”, na qual induz o sintoma de fechamento da cabeça da alface (*Lactuca sativa*) (OLIVERA et al., 2005). Esse isolado tem sido mantido dessecado e em freezer a -80°C, no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. Sempre que se faz necessária a sua multiplicação para estudo, o isolado LMV-Cf é inoculado em plantas de alface da cultivar Regina 579, que apresenta os sintomas específicos.

3.2 Desenho dos Primers

Para a amplificação completa do genoma do isolado Cf foram desenhados primers com base no alinhamento das sequências de LMV disponíveis no Genbank para amplificação de fragmentos de aproximadamente 1000 pb, com sobreposição nas duas extremidades de aproximadamente 200 pb (Tabela 1).

Tabela 1 Sequência de nucleotídeos usados na criação dos primers para o sequenciamento completo do isolado LMV-Cf

Primers	Sequência 5' a 3'	Posição no Genoma (nt)	Genes
LMV1F	AAAATAAAACAACCCAACACAACCTC	1-25	5'UTR e P1
LMV895R	GCAGGAGGCTCATCAGCT	878-890	5'UTR e P1
LMV776F	CCAAGCTGGTCGCAG	776-790	P1 e HcPRO
LMV1665R	CTCAGCATCCACGCT	1667-1688	P1 e HcPRO
LMV1580F	GGGAAAATCACCTGTG	1565-1580	P1 e HcPRO
LMV2698R	GGTTCAATCACGACTGGA	2681-2698	P1 e HcPRO
LMV2405F	GGAAGCGGAAGGAAAGATG	2405-2422	HcPRO e P3
LMV3495R	CAGTATCTCGGTTGG	3481-3495	HcPRO e P3
LMV3412F	GCGGCGATGGCGGGA	3412-3426	P3, 6k1 e C1
LMV4410R	CTCGTCCGTTAGCTC	4410-4424	P3, 6k1 e C1
LMV4252F	CATGACGTTCACTCG	4252-4266	C1
LMV4964R	GTAGAAACAGTAGGCACCC	4946-4964	C1
LMV4765F	ACAGCAATTCGTCCAAGG	4765-4782	C1
LMV5692R	CACACTCTCTGTGAGTCCC	5674-5692	C1
LMV5560F	GATCAAGGACGTTCC	5560-5574	C1,6k2 e VPg
LMV6689R	GGGTTGTTGCTCCAG	6675-6689	C1,6k2 e VPg
LMV6592F	CTCTTGCCAGCTCGGA	6592-6607	VPg,N1a e N1b
LMV7635R	CACTGATGGGAGCCTACC	7635-7652	VPg,N1a e N1b
LMV7535F	AGCACAAGCCAACCTCGT	7535-7551	N1b
LMV8362R	CAGCGATCCTCACTC	8349-8363	N1b
LMV8195F	GGC TGG GTT TAT TGC G	8195-8210	N1b e CP
LMV9350R	CGAGTCATGGTACGACG	9334-9350	N1b e CP
LMV9192F	CCATACCTCGTACAAAGG	9192-9209	CP e 3'UTR
LMV10080R	GTCTCCGACTGAAAACCAGAC	10060-10080	CP e 3'UTR

3.3 Extração de RNA viral

O RNA viral foi extraído a partir de folhas de alface cv. Regina 579, previamente infectadas com o LMV-Cf, usando o método de extração por Trizol (AFGC protocols). Na extração do RNA total pelo método de Trizol, 0,4g de folhas de alface infectadas com o LMV-Cf, foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e homogeneizadas em 6 mL da solução tampão Trizol (38% de fenol saturado em solução de Tris-HCl 0,5M pH 8, 0,8M de guanidina tiocianato, 0,4M de amônio tiocianato e 0,1M de acetato de sódio, pH5, 5% de glicerol e água suficiente para completar o volume final da solução).

O extrato obtido foi transferido para microtubos e incubado em banho-maria a 60°C por 5 minutos. Após essa incubação os tubos foram agitados e centrifugados por 10 minutos a 12000 rpm a 4°C. O precipitado foi descartado e ao sobrenadante foram adicionados 240 µL de clorofórmio, seguido por agitação e incubação à temperatura ambiente por 3 minutos. Procedeu-se nova centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para novos microtubos, adicionando-se ½ volume da solução contendo 0,8M de Citrato de Sódio e 1,2M de Cloreto de Sódio e ½ volume de isopropanol. Após homogeneização cuidadosa por inversão os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos e o precipitado foi lavado com etanol a 70%, secado a vácuo e ressuscitado em 25 µL de água ultrapura tratada com DEPC.

3.4 RT-PCR

Na síntese do cDNA foram utilizados os *primers* antisenso, discriminados na Tabela 1, e a enzima transcriptase reversa M-MLV da Promega, empregando-se a seguinte reação: foram colocados em um tubo de

eppendorf 5µL de tampão da enzima (5X), 2µL de dNTP, 10mM, 1µL do primer antisense, 10pM, 0,8µL de M-MLV RT, 5 µL do RNA total e água ultrapura com DEPC para completar o volume total de 20µL, e em seguida essa mistura foi incubada a 42°C por 60 minutos e a 95°C por 5 minutos, seguido por incubação em gelo. Para a reação de PCR, que foi montada para um volume final 50 µL, foram empregados 2µL do cDNA, 10 µL do tampão da enzima (5X), 3 µL MgCl₂, 25mM, 1 µL dNTP, 10mM, 25 pM de cada um dos *primers* senso e antisense, 0,25µL da enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) e 28,75 µL água ultrapura tratada com DEPC. Após um aquecimento inicial a 95°C por 2 minutos, seguiram-se 35 ciclos para amplificação do cDNA, sendo: 95°C por 2 minutos, de 50 a 65°C (dependendo da temperatura de anelamento prevista para cada par de primer) por 1 minuto e meio e 72°C por 5 minutos, seguidos por uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,7%, contrastados com Gel Red™ (Biotium).

3.5 Sequenciamento e análise das sequências obtidas

As bandas que apresentaram o tamanho esperado foram purificadas com o Gel Band Purification Kit (Promega). Os fragmentos foram clonados no vetor PGEM-T Easy (Promega) e enviados para sequenciamento na GeneWIZ, USA.

A análise das sequências genômicas foram feitas empregando-se o programa BioEdit e o programa BLAST, disponível no National Centre for Biotechnology Information (NCBI – <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos e de aminoácidos e a comparação com os outros 4 genomas completos e 21 incompletos, de LMV, do GenBank (Tabela 2), foram feitos com auxílio do programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw>) e as árvores filogenéticas foram obtidas

por meio do programa MEGA 5.1 (<http://www.megasoftware.net>) utilizando-se neighbor Joining e bootstrap, considerando valores superiores a 2.000 repetições.

Os isolados de LMV e um isolado do *Watermelon mosaic virus* (WMV) utilizado como “outgroup”, todos disponíveis no GenBank, que foram empregados para comparação, se encontram discriminados na Tabela 2.

Tabela 2 Relação dos isolados disponíveis no GenBank que foram empregados para comparação com o LMV-Cf

Acesso	Origem	Sequência/posição do genoma	Autores/publicação
X97704	Europa	Completa	Revers et al. (1997a)
NC_003605: derivada da X97705 (revisada)	Europa	Completa	Revers et al. (1997a)
AJ278854	Brasil	Completa	Krause-Sakate et al. (2005)
AJ306288	China	Completa	Não publicado
AF395804	Israel	CP e 3' UTR	Não publicado
AJ278855	Brasil	Nib e CP - parcial	Não publicado
AJ297630	China	NIb, CP e 3' UTR	Chen et al. (2001)
AJ488153	China	CP	Não publicado
AJ515299	Brasil	P3-CI	Idem
AJ515301	Brasil	NPg	Idem
EF423619	China	NIb e CP	Não Publicado
EF633502	China	NIb e CP	Não publicado
EU247454	USA	NIb e CP	Não publicado
JQ794776	India	Nib, CP e 3' UTR	Sharma et al. (2013)
Z78215	Europa	5' e P1	Revers et al. (1997b)
Z78216	Europa	P1	Idem
Z78217	Europa	P1	Idem
Z78218	Europa	P1	Idem
Z78220	Europa	P1	Idem
Z78221	Europa	5' e P1	Idem
Z78222	Europa	5' e P1	Idem
Z78227	Europa	NIb e CP	Idem
Z78228	Europa	NIb e CP	Idem
Z78229	Europa	CP	Idem
Z78230	Europa	NIb e CP	Idem
U24670	USA	CP	Zerbini et al. (1995)
X65652	França	NIb, CP e 3' UTR	Dinant et al. (1991)
DQ399708	China	Watermelon mosaic virus (WMV)	Não publicado

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os *primers* desenhados com base no genoma dos isolados de LMV, disponíveis no GenBank, permitiram a amplificação de quase todo o genoma do isolado LMV-Cf. As regiões 5'UTR, P1, HCPro, P3, CI, 6K1, 6K2, NIa-VPg, CP e 3' UTR foram completamente sequenciadas, não estando completas apenas a ORF que codifica a proteína a NIa, e a NIb, sendo que nessa última faltaram apenas os 60 primeiros nucleotídeos na região 5'.

A região 5'UTR do isolado estudado possui 91pb, apresentando 12 nucleotídeos a menos que os isolados AJ306288 da China, X97704 e X97705 da Europa e 15 nucleotídeos a menos que o isolado brasileiro AJ27885; por outro lado, possui 14 nucleotídeos a mais que os 6 isolados da Europa estudados por Revers et al. (1977b). A sua identidade com os isolados disponíveis no GenBank variou de 85 a 98%, quando comparado com outros isolados de LMV disponíveis no banco de dados (Tabela 3). A menor identidade foi quando a 5'UTR foi comparada com o isolado da China, Z78222 e a maior foi com os isolados da China AJ306288 e do Brasil AJ278854. Variação de identidade igual foi observada na comparação dos demais isolados do Genbank sendo que as maiores identidades ocorreram entre os isolados do Brasil (AJ278854) da Europa (Z78216) e entre isolados europeus X97704 x Z78217; Z78215 x Z78216 (Tabela 3).

Tabela 3 Porcentagem de identidade entre as sequências de nucleotídeos da região não codificante 5'UTR dos isolados de LMV

N°	Isolados	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	LMV-Cf	95	95	94	98	96	94	94	93	89	87	85	76
2	AJ306288	-	94	96	95	93	91	92	94	87	85	87	74
3	AJ278854		-	95	97	98	91	97	93	89	87	85	74
4	X97704			-	96	94	89	93	98	85	85	87	78
5	X97705				-	97	93	96	94	88	85	84	75
6	Z78216					-	92	98	94	91	88	87	80
7	Z78221						-	91	89	93	89	89	78
8	Z78215							-	93	89	87	85	80
9	Z78217								-	85	85	87	79
10	Z78218									-	88	88	78
11	Z78220										-	94	82
12	Z78222											-	80
13	DQ399708												-

A árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos da região 5'UTR mostrou que os isolados de LMV se distribuíram em dois clados principais, sendo um deles com quatro dos isolados descritos por Revers et al. (1997b) e os demais isolados agrupados no segundo clado, onde também se situou o LMV-Cf. Este apresentou uma maior proximidade com o isolado do X97705 da Espanha (Figura 1).

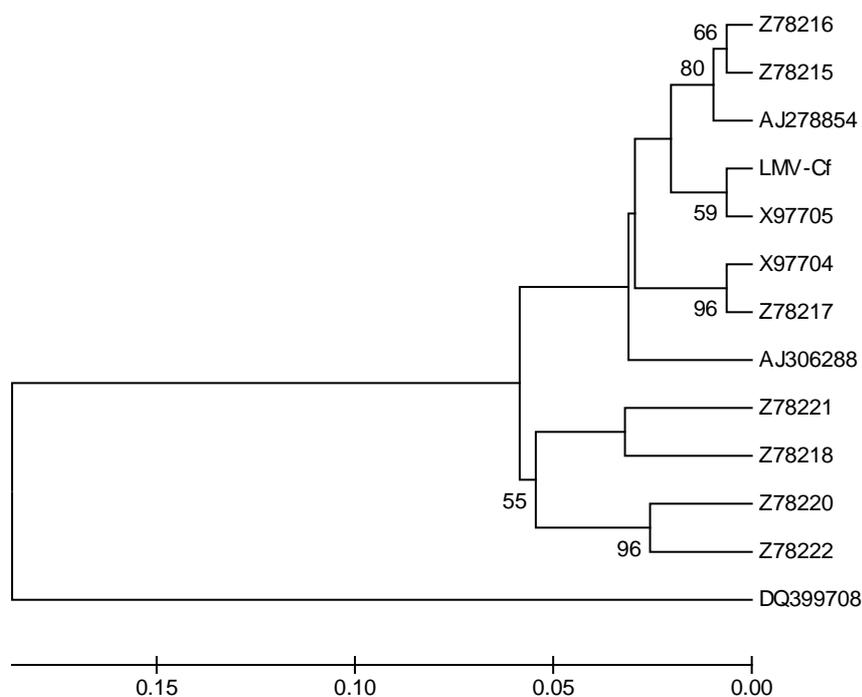


Figura 1 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos da região não 5'UTR dos isolados de LMV . Os valores foram obtidos pelo programa MEGA 5.1 e teste Neighbor-Joining, com 2.000 repetições.

A proteína P1 do LMV-Cf possui 1.311 bp, apresentando o mesmo tamanho que os demais isolados de LMV utilizados para análise desta região. Quando a sequência de nucleotídeos dessa região foi comparada a de outros isolados de LMV, a maior identidade ocorreu entre o LMV-Cf e o isolado Espanhol X97705 (96%), enquanto que com os demais a identidade foi de 93% (Tabela 4). Entre os demais isolados do GenBank a identidade esteve entre 93 e

95%. Assim sendo, não houve uma variabilidade significativa que indicasse uma característica distinta entre a P1 do LMV-Cf dos demais isolados disponíveis no GenBank, uma vez que a proteína P1 é considerada a mais divergente entre as espécies do gênero Potyvirus, apresentando similaridade de apenas 41% de nucleotídeos e 28% de aminoácidos entre 187 sequências de 46 espécies diferentes analisadas pertencentes ao gênero Potyvirus (ADAMS; ANTONIW; FAUQUET, 2005).

Tabela 4 Porcentagem de identidade na sequência de nucleotídeos da região P1 dos isolados de LMV

Nº	Isolados	2	3	4	5	6
1	LMV-Cf	93	96	93	93	50
2	X97704	-	94	95	94	52
3	X97705		-	93	93	50
4	AJ278854			-	93	51
5	AJ306288				-	51
6	DQ399708					-

A identidade dos aminoácidos da proteína P1 do LMV-Cf apresentaram uma variação semelhante à observada na identidade dos nucleotídeos, sendo que a maior identidade (95%) ocorreu com o isolado Espanhol X97705 (Tabela 5). A identidade de aminoácidos do LMV-Cf com o isolado brasileiro e com os demais isolados do GenBank foi igual a 91%. Entre os 4 isolados disponíveis no GenBank, a identidade variou de 92 a 94%.

Seis substituições de aminoácidos foram observadas na sequência da P1 do LMV-CF, sendo a primeira no aminoácido 15, quando uma Alanina foi substituída por uma Treonina. Ocorreram duas substituições nas posições 119 havendo a substituição de uma Prolina por uma Serina, e na posição 121 de uma Valina por uma Metionina. Na posição 253 e 254 um par de aminoácidos Ácido aspártico e Lisina foram substituídas por Isoleucina e Asparagina na sequência

do LMV-Cf e por fim na posição 288 houve a substituição de uma Tirosina por uma Histidina. A região N-terminal da proteína P1 é considerada a mais variável e menos conservada dos *Potyvirus* (ADAMS; ANTONIW; FAUQUET, 2005), entretanto, na proteína P1 do LMV-Cf a variação encontrada no N-terminal foi similar à encontrada no C-terminal, mostrando que esta variação não ocorre entre isolados de um mesmo vírus.

Tabela 5 Porcentagem de identidade na sequência de aminoácidos da região P1 dos isolados de LMV

Nº	Isolados	2	3	4	5	6
1	LMV-Cf	91	95	91	91	11
2	X97704	-	92	94	93	8
3	X97705		-	92	92	6
4	AJ278854			-	92	6
5	AJ306288				-	8
6	DQ399708					-

A árvore filogenética baseada da sequência de nucleotídeos (Figura 2A) e na de aminoácidos (Figura 2B) mostrou o mesmo padrão de agrupamento, com os isolados de LMV formando dois clados principais: num deles o LMV-Cf agrupou-se com o isolado X97705, da Espanha, e os demais agruparam-se no segundo clado.

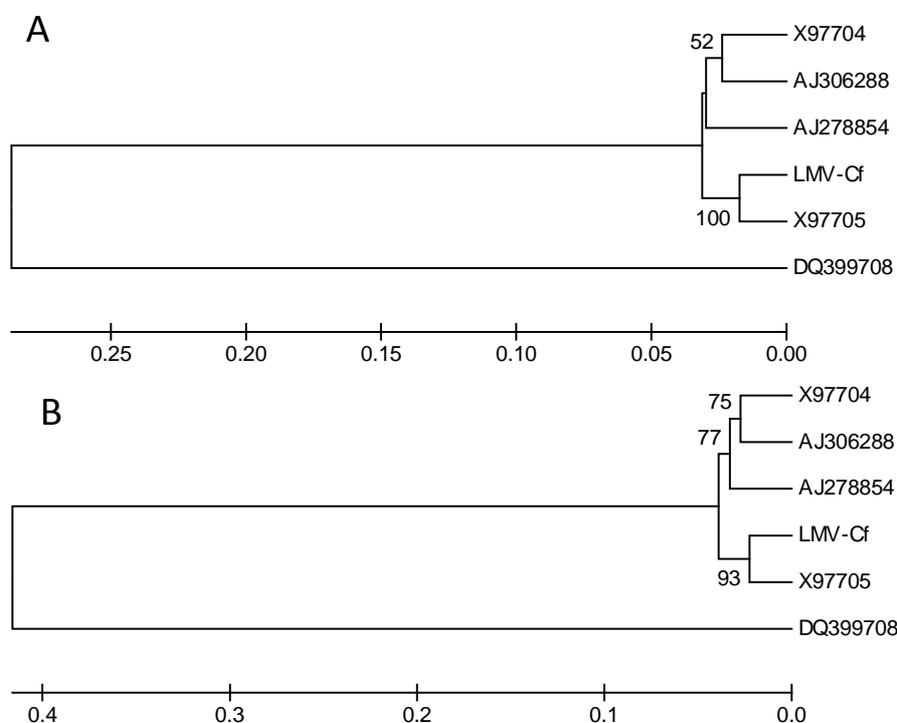


Figura 2 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos (A) e aminoácidos (B) da P1 de isolados de LMV. Os valores foram obtidos pelo programa MEGA e teste Neighbor-Joining, com 2.000 repetições.

A proteína HC-PRO apresentou 1374 nucleotídeos do mesmo tamanho das demais proteínas dos isolados disponíveis no GenBank. A menor identidade de nucleotídeos foi 93% entre o isolado LMV-CF e o isolado X97705, da Espanha. A identidade com os demais isolados do GenBank foi igual a 95% (Tabela 6). Entre os isolados do banco de dados a identidade foi ligeiramente maior, variando de 94 a 97%.

Tabela 6 Porcentagem de identidade na sequência de nucleotídeos da região HC-PRO dos isolados de LMV

N°	Isolados	2	3	4	5	6
1	LMV-Cf	95	93	95	95	59
2	X97704	-	96	97	96	61
3	X97705		-	95	94	61
4	J278854			-	96	60
5	AJ306288				-	59
6	DQ399708					-

A identidade de aminoácidos entre o isolado LMV-Cf e os isolados X97705 da Espanha e AJ306288 da China foi de 96%, enquanto que com os isolados X97704 da França e AJ278854 do Brasil foi de 97% (Tabela 7). Foram encontradas cinco substituições de aminoácidos na região N terminal da proteína HC-PRO, sendo estas nas posições dos aminoácidos: posição 15, uma Fenilalanina foi substituída por uma Leucina, na posição 71, uma Alanina foi substituída por uma Treonina, na posição 93, uma Valina foi substituída por uma Isoleucina, e nas posições 136 e 179 ocorreram às substituições de uma Lisina por Arginina. Na região C terminal da proteína foi encontrado apenas uma substituição de aminoácido na posição 272, no qual um Ácido glutâmico foi substituído por uma Lisina, mostrando que essa região da proteína é mais conservada que a região N-terminal. Apesar das substituições de aminoácidos apresentadas no HC-PRO os motifs conservados KITC e PTK, que são necessários para transmissão por afídeos (BLANC et al., 1998), foram encontrados entre os nucleotídeos 52 - 55 e 310 - 312 respectivamente. Outros motifs como FRNK, associado à supressão de silenciamento de RNA, IGN, relacionado com movimento e amplificação viral, e CCC associado ao movimento a longas distâncias, também foram encontrados entre os aminoácidos 181-184, 250-252 e 292-294 respectivamente (ALA-POIKELA et al., 2011; BLANC et al., 1998; SAÉNZ et al., 2001). Notando-se que nenhuma das seis

substituições descritas na proteína HC-PRO do isolado LMV-Cf foram importantes para o desempenho de suas funções de proteína.

Tabela 7 Porcentagem de identidade na sequência de aminoácidos da região HC-PRO dos isolados de LMV

N°	Isolados	2	3	4	5	6
1	LMV-Cf	97	96	97	96	44
2	X97704	-	98	99	98	45
3	X97705		-	98	96	45
4	J278854			-	98	45
5	AJ306288				-	45
6	DQ399708					-

A árvore filogenética baseada na sequência de nucleotídeos da HC-PRO também mostrou um agrupamento dos isolados de LMV em dois clados, porém o isolado X97705, originário da Espanha, ficou separado em um clado, enquanto os demais se agruparam no segundo clado (Figura 3A), mostrando que em geral esta região é bastante conservada. Na árvore construída com base na sequência de aminoácidos, os isolados se distribuíram em três clados, com o LMV- Cf e o isolado X97705 da Espanha, em clados distintos, e os demais no terceiro clado (Figura 3B).

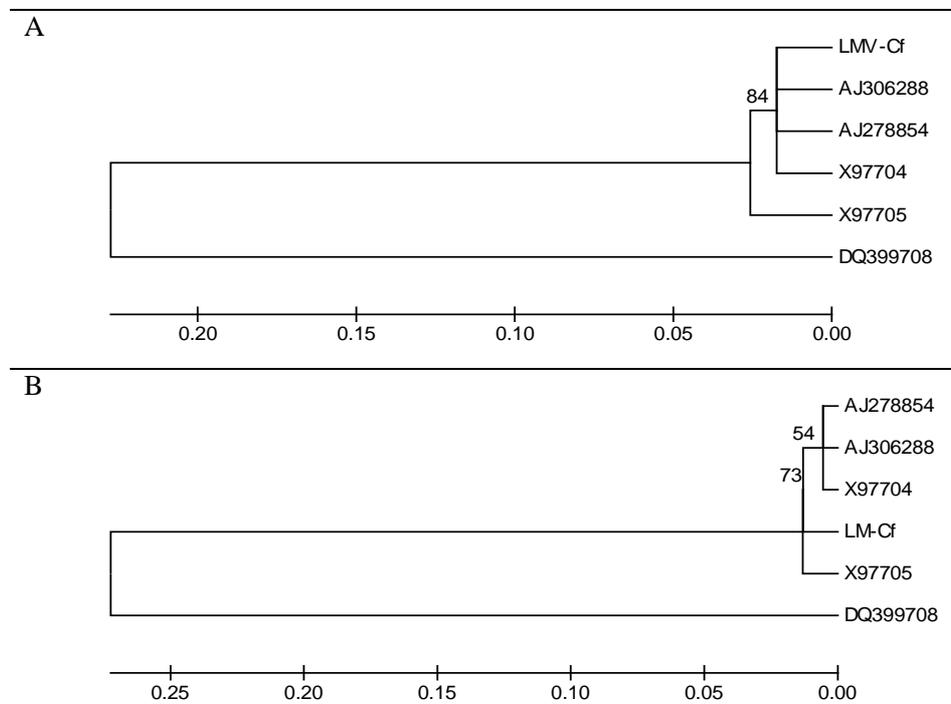


Figura 3 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos (A) e aminoácidos (B) da HC-PRO de isolados de LMV. Os valores foram obtidos pelo programa MEGA e teste Neighbor-Joining, com 2.000 repetições.

A proteína P3 do LMV-CF apresentou 1131 nucleotídeos, possuindo 3 nucleotídeos a menos que o observado nos outros isolados empregados para comparação. Houve a deleção de uma trinca de nucleotídeos seguidos, de uma região com quatro repetições do códon GAA em sequência, nas posições 1121, 1122 e 1123 (Figura 4A). A identidade de nucleotídeos do LMV-Cf variou entre 93 a 97%, com a menor identidade encontrada com o isolado X97705 da Espanha e o maior com os isolados AJ306288 da China e X97704 da França (Tabela 8). Entre os isolados do GenBank as identidades foram semelhantes, variando entre 93 e 99%, mostrando que essa proteína é também bastante

conservada entre os isolados de LMV. Portanto, a deleção de uma trinca de nucleotídeos pode ter alguma consequência na interação vírus-planta.

Tabela 8 Porcentagem de identidade na sequência de nucleotídeos da região P3 dos isolados de LMV

Nº	Isolados	2	3	4	5	6	7
1	LMV-Cf	97	93	94	97	96	56
2	X97704	-	93	95	99	98	56
3	X97705		-	93	93	94	58
4	J278854			-	95	97	56
5	AJ306288				-	97	57
6	AJ515299					-	55
7	DQ399708						-

A	X97704	CTAGAAGTAGTTGAATTTACGAAGGTCCTGAAGAAGAAGAAGTAGAGCATCAA
	AJ306288	CTAGAAGTAGTTGAATTTACGAAGGTCCTGAAGAAGAAGAAGTAGAGCATCAA
	LMV-Cf	CTAGAAGTAGTTGAGTTTACGAAGGTCCTGAAGAAGAA---GTAGAGCATCAA
	AJ515299	CTAGAAGTAGTTGAGTTTACGAAGGTCCTGAAGAAGAAGAAGTAGAGCATCAA
	AJ278854	CTGGAAGTAGTTGAGTTTACGAAGGTCCTGAAGAAGAAGAAGTGGAACATCAA
	X97705	CTAGAAGTAGTTGAGTTTACGAAGGTCCTGAAGAGGAAGAAGTAGAGCATCAA
	** ***** ***** ***** ***** ** ** ** *****	
B	X97705	LEVVEFYEGPEEEVEHQ
	AJ278854	LEVVEFYEGPEEEVEHQ
	AJ515299	LEVVEFYEGPEEEVEHQ
	X97704	LEVVEFYEGPEEEVEHQ
	AJ306288	LEVVEFYEGPEEEVEHQ
	LMV-Cf	LEVVEFYEGPEEE-VEHQ
	***** *****	

Figura 4 Alinhamento da região 3' terminal da sequência da proteína P3 no programa ClustalW com ênfase nos gaps; (A) Sequência de nucleotídeos do isolado LMV-Cf e dos demais isolados do GenBank; (B) Sequência de aminoácidos do isolado LMV-Cf e dos demais isolados do GenBank.

A identidade de aminoácidos entre o LMV-Cf e os isolados do GenBank variou entre de 92 a 95%, e entre os isolados do GenBank essa proteína mostrou-se um pouco mais conservada, com as identidades variando de 96 a 99%, (Tabela 9). Há alta variação na proteína P3, pois a mesma apresenta 6

pontos de substituição de aminoácidos na sua sequência e um ponto de deleção de aminoácido na região C-terminal, com a deleção de um Ácido glutâmico na posição 374 (Figura 4B). Os seis pontos de substituição de aminoácidos ocorreram nas posições centrais e C-terminal da proteína P3, na posição 137 houve a substituição de uma Alanina por uma Valina; nas posições 227 e 228 um par de aminoácidos; Leucina e Lisina, foram substituídas por Fenilalanina e Ácido glutâmico; na posição 304 ocorreu a substituição de uma Arginina por uma Glutamina e nas posições 307 e 338, ocorreu a substituição de uma Treonina por uma Isoleucina, e um Ácido glutâmico por uma Glicina, respectivamente.

O motif GAAAAAA da PIPO foi identificado na sequência da proteína P3 do isolado LMV-Cf na posição dos nucleotídeos 544 – 550 (3333 e 3339 no genoma do LMV-Cf), e é o responsável pela mudança de frame para -2, e expressão de uma proteína pequena contendo 37 aminoácidos com terminação no códon de parada TAA localizado nos nucleotídeos 3445 – 3447 da proteína P3. Chung et al. (2008) foi o primeiro a descrever uma pequena ORF embutida na proteína P3 do gênero *Potyvirus*, denominada PIPO, localizada nas coordenadas dos nucleotídeos 3079 – 3258 do genoma do *Turnip mosaic virus* (TuMV), no qual o motif G₁₋₂ e A₆₋₇ é responsável pela mudança de frame para +2, e expressão dessa proteína em fusão com a região N-Terminal da proteína P3. O autor também cita a existência de outras ORFs maiores ou iguais a 60 codons em todos os 48 Potyvirus presentes no GenBank. Está descoberta só foi possível pelo uso do software MLOGD, que tem essa função específica de descobrir novas ORFs (CHUNG et al., 2008). É possível que aja a ocorrência da proteína PIPO no LMV-Cf, uma vez que há o motif GAAAAAA, e a região N-Terminal é a mais conservada da proteína P3, o que não impediria a fusão com a PIPO, que mesmo pequena (37 aa) poderia ser expressa. Mais estudos entre a interação destas duas regiões e principalmente o uso do software MLOGD são

necessários para afirmação da existência da PIPO na proteína P3 do isolado LMV-Cf, uma vez que Chung et al. (2008) deixa claro a possibilidade de existência de outros pequenos genes em sobreposição que necessitam de estudos e ferramentas para a sua análise.

Tabela 9 Porcentagem de identidade na sequência de aminoácidos da região P3 dos isolados de LMV

Nº	Isolados	2	3	4	5	6	7
1	LMV-Cf	95	92	94	95	95	19
2	X97704	-	96	98	99	99	19
3	X97705		-	96	96	96	18
4	J278854			-	97	98	19
5	AJ306288				-	98	19
6	AJ515299					-	19
7	DQ399708						-

Na árvore filogenética gerada com base na sequência de nucleotídeos da proteína P3, os isolados de LMV se separaram em dois clados, sendo que o isolado X97705 da Espanha ficou separado em um dos clados e os demais isolados se agruparam no segundo clado (Figura 5A). Esse segundo clado, por sua vez, se subdividiu em dois sub clados, com os isolados AJ 278854 e AJ 515299 separados dos demais isolados. O LMV-Cf apresentou uma maior proximidade aos isolados X97704 da França e o AJ306288 da China (Figura 5A). Na árvore filogenética gerada com base na sequência de aminoácidos foram formados também dois clados, sendo que o LMV-Cf ficou separado de todos os demais isolados, permanecendo separado no primeiro clado, e os demais se agruparam no segundo clado (Figura 5B).

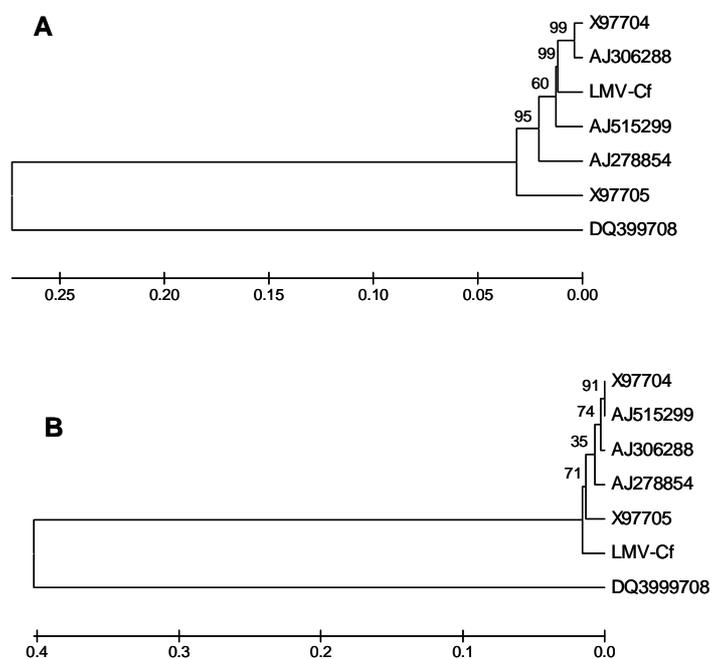


Figura 5 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos (A) e aminoácidos (B) da P3 de isolados de LMV. Os valores foram obtidos pelo programa MEGA e teste Neighbor-Joining, com 2.000 repetições.

A proteína 6K1 do LMV-Cf, a exemplo dos demais isolados já sequenciados anteriormente, apresentou 156 nt, e uma identidade de 92 a 98% com os outros isolados utilizados para comparação. Essa mesma variabilidade foi observada entre os isolados do GenBank, cuja identidade também esteve entre 92 e 100% (Tabela 10).

Tabela 10 Porcentagem de identidade na sequência de nucleotídeos da região 6K1 dos isolados de LMV

N°	Isolados	2	3	4	5	6	7
1	LMV-Cf	92	92	94	98	98	57
2	X97704	-	100	92	94	92	63
3	X97705		-	92	94	92	63
4	J278854			-	94	93	55
5	AJ306288				-	97	55
6	AJ515299					-	57
7	DQ399708						-

A identidade entre os aminoácidos da proteína 6 K1 de todos os isolados comparados mostrou uma alta conservação dessa proteína, sendo que a menor identidade entre o LMV-Cf e os isolados do GenBank foi de 98%. Apenas as identidades entre o isolado AJ278854 e os X97704 e X97705 foram de 96%, enquanto que todas as demais foram iguais ou maiores que 98% (Tabela 11).

Tabela 11 Porcentagem de identidade na sequência de aminoácidos da região 6K1 dos isolados de LMV

N°	Isolados	2	3	4	5	6	7
1	LMV-Cf	98	98	98	100	100	48
2	X97704	-	100	96	98	98	48
3	X97705		-	96	98	98	48
4	AJ278854			-	98	98	48
5	AJ306288				-	100	48
6	AJ515299					-	48
7	DQ399708						-

A árvore filogenética baseada na sequência de nucleotídeos foi semelhante à construída com base na sequência de aminoácidos, apresentando a mesma tendência de agrupamento (Figuras 6A e 6B). Os isolados de LMV se distribuíram em dois clados principais, ficando os isolados europeus X97704 e X97705 em um deles e os demais no segundo clado. Por sua vez, o segundo

clado se subdividiu em dois subclados, com o isolado AJ278854 separado dos demais.

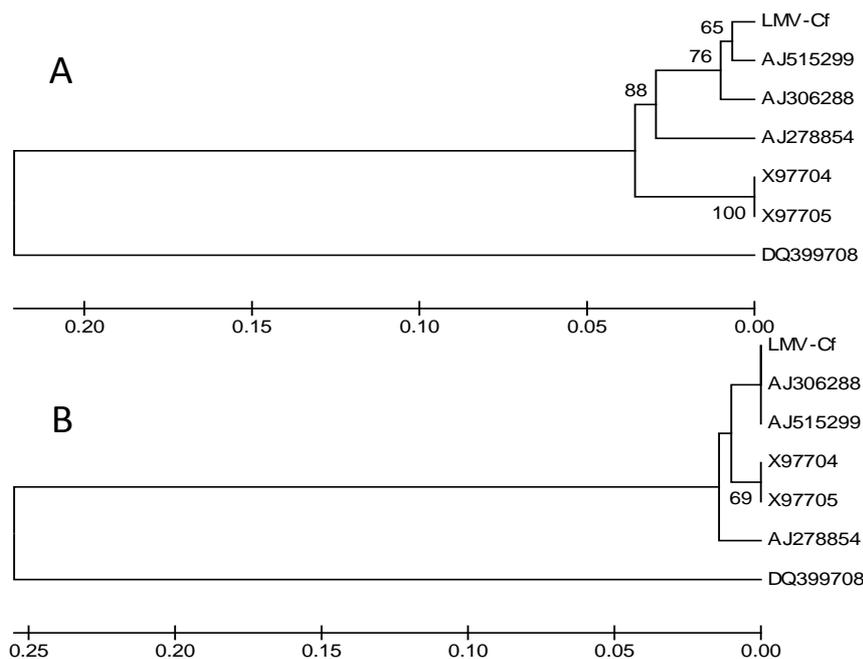


Figura 6 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos (A) e aminoácidos (B) da 6K1 de isolados de LMV. Os valores foram obtidos pelo programa MEGA e teste Neighbor-Joining, com 2.000 repetições.

A proteína CI, que tem função de RNA helicase, requerida para replicação do genoma (CARRINGTON; JENSE; SCHAAD, 1998), apresentou o mesmo número de nucleotídeos dos isolados de LMV já sequenciados, ou seja, de 1929 nucleotídeos. A sua identidade com os isolados empregados para comparação variou entre 92 e 95%, mostrando uma alta variabilidade na

proteína CI (Tabela 12). O mesmo foi observado para os outros isolados presentes no GenBank, que apresentaram identidade, entre eles, de 92 a 99%.

Tabela 12 Porcentagem de identidade na sequência de nucleotídeos da região CI dos isolados de LMV

Nº	Isolados	2	3	4	5	6
1	LMV-Cf	95	92	95	95	60
2	X97704	-	93	95	99	61
3	X97705		-	92	93	61
4	J278854			-	95	62
5	AJ306288				-	62
6	DQ399708					-

A identidade dos aminoácidos da proteína CI do LMV-Cf com os demais isolados do GenBank mostrou-se menos variável, sendo que o menor valor ocorreu entre o LMV-Cf e o X97705 (97%) e a maior com o isolado AJ306288 (99%), da China (Tabela 13). O mesmo foi observado nas identidades de aminoácidos entre os isolados do GenBank, que variaram também entre 97 e 99%. Duas substituições foram observadas na sequência de aminoácidos do LMV-Cf: a primeira na posição do aminoácido 565, onde uma Valina foi substituída por uma Isoleucina, e a segunda no aminoácido da posição 592, com uma Serina sendo substituída por uma Alanina, ambas localizadas na região C-terminal da proteína CI. Estudos de recombinação têm mostrado alta probabilidade de ocorrência de recombinação na proteína CI (KRAUSE-SAKATE et al., 2004, 2005). A região de junção das proteínas P3-CI do isolado Tn2, originário da Tunísia (acesso GenBank AJ515299), localizada entre os nucleotídeos 2859 – 4797, foi descrita como uma região de provável recombinação entre os isolados francês X97704, representante do grupo de ‘LMV Common’ e o isolado brasileiro AJ278854, representante do grupo de ‘LMV Most’, indicando a primeira recombinação entre os dois grupos descrita

na natureza (KRAUSE-SAKATE et al., 2004). A alta variação encontrada na região terminal da proteína P3 do isolado LMV-Cf pode estar ligada ao fato de que alguns isolados de LMV possuem sítio de recombinação na junção das proteínas P3-CI (KRAUSE-SAKATE et al., 2004) o que torna estas proteínas alvos para posteriores estudos de recombinação.

Nas regiões P3-CI, e PI-CI do LMV-Cf, Krause-Sakate et al. (2005), detectaram um recombinante entre os isolados X97705 da Espanha e AJ278857 do Brasil, mostrando que a interação entre as regiões da proteína P1 e CI são capazes de quebrar a resistência do gene Mo2 presente em algumas cultivares de alface, como a Ithaca, e podem estar relacionadas à indução de sintomas sistêmicos atípicos. Paalmet et al. (2004), descreve que vírus recombinantes podem gerar sintomas atípicos não semelhantes aos causados por seus parentais.

Tabela 13 Porcentagem de identidade na sequência de aminoácidos da região CI dos isolados de LMV

Nº	Isolados	2	3	4	5	6
1	LMV-Cf	99	97	98	98	51
2	X97704	-	97	98	99	51
3	X97705		-	97	97	50
4	J278854			-	98	51
5	AJ306288				-	50
6	DQ399708					-

Quando a árvore filogenética baseada na sequência de nucleotídeos foi construída, os isolados de LMV se distribuíram novamente em dois clados, sendo que o X97705 ficou isolado dos demais em um dos clados, e o LMV-Cf juntamente com os demais no segundo clado, isolado num dos três subclados que se formaram (Figura 7A). A árvore construída com base na sequência de aminoácidos apresentou a mesma tendência de distribuição dos isolados de LMV (Figura 7B).

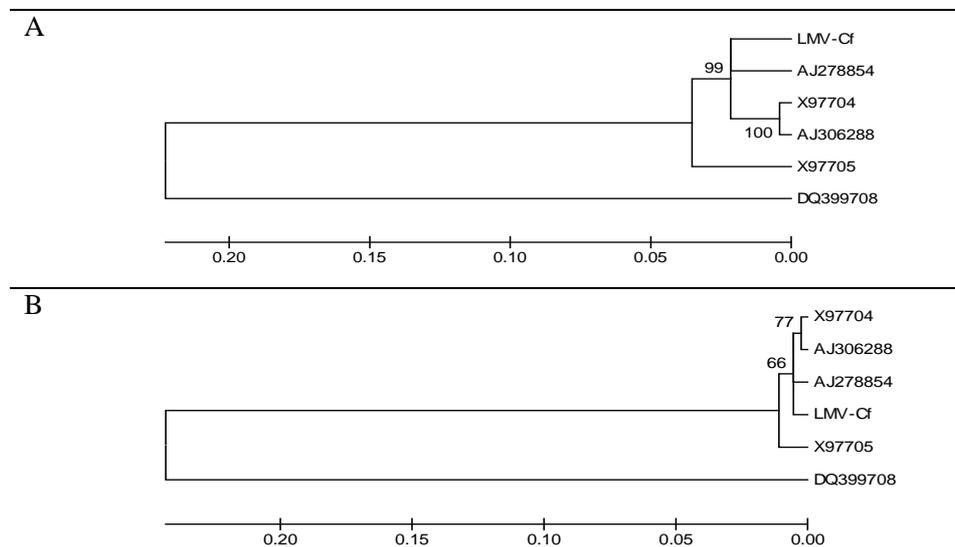


Figura 7 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos (A) e aminoácidos (B) da CI de isolados de LMV. Os valores foram obtidos pelo programa MEGA e teste Neighbor-Joining, com 2.000 repetições.

A proteína 6K2 do LMV-Cf, com 159 nt, foi a que se apresentou mais variável quando comparada aos demais isolados do GenBank. Sua identidade com os mesmos variou de 88 a 93%, enquanto a identidade entre esses isolados variou de 91 a 99% (Tabela 14).

Tabela 14 Porcentagem de identidade na sequência de nucleotídeos da região 6K2 dos isolados de LMV

Nº	Isolados	2	3	4	5	6
1	LMV-Cf	93	88	93	94	64
2	X97704	-	93	97	99	58
3	X97705		-	91	92	68
4	AJ278854			-	96	58
5	AJ306288				-	56
6	DQ399708					-

Quando os aminoácidos foram comparados, a variabilidade da proteína 6K2 foi ainda maior. Enquanto a identidade entre os quatro isolados empregados para comparação foi de 100%, mostrando um grau ímpar de conservação, a identidade entre o LMV-Cf e esses isolados permaneceu em 92%, mostrando variabilidade (Tabela 15). Foram observadas substituições em quatro pontos da sequência do LMV-Cf: na posição 1 uma Serina foi substituída por uma Treonina, na posição 20 uma Isoleucina foi substituída por uma Leucina, na posição 30 uma Valina foi substituída por uma Isoleucina e na posição 46, uma Metionina por Isoleucina. Spetz e Valkonen (2004), em estudos realizados com o *Potato virus A* (PVA), mostrou que a região N-terminal interfere em funções de vital importância para o sucesso da infecção e expressão de sintomas em plantas de *Nicotiana benthamiana*. A região N-terminal da proteína 6k2, é a mais variável em comparação com outros isolados de LMV presentes no GenBank, contendo 3 substituições de aa, sendo assim essa proteína pode ser uma candidata a indução do fechamento da cabeça da alface cv. Regina 579 que não apresenta essa característica morfológica quando estão sadias.

Tabela 15 Porcentagem de identidade na sequência de aminoácidos da região 6K2 dos isolados de LMV

Nº	Isolados	2	3	4	5	6
1	LMV-Cf	92	92	92	92	37
2	X97704	-	100	100	100	39
3	X97705		-	100	100	39
4	J278854			-	100	39
5	AJ306288				-	39
6	DQ399708					-

Tanto a árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos como a construída com base na sequência de aminoácidos mostraram uma clara separação do LMV-Cf dos demais isolados empregados

para comparação (Figura 8A e 8B). Na primeira, foram formadas três clados, sendo que o LMV-Cf ficou separado em um clado, o X97705 em outro e os três restantes se agruparam juntos no terceiro clado.

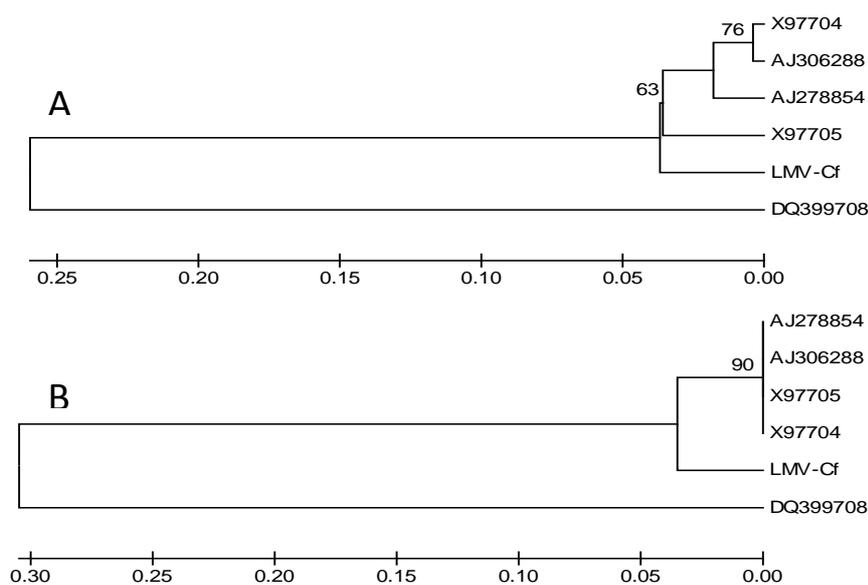


Figura 8 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos (A) e aminoácidos (B) da 6K2 de isolados de LMV. Os valores foram obtidos pelo programa MEGA e teste Neighbor-Joining, com 2.000 repetições.

A proteína N1a-VPg do LMV-Cf também apresentou o mesmo tamanho da proteína semelhante de outros isolados do LMV, 579 nucleotídeos. A identidade de nucleotídeos variou entre 90 e 94% entre o isolado estudado e os demais isolados do GenBank e entre 91 e 98% entre eles (Tabela 16).

Tabela 16 Porcentagem de identidade na sequência de nucleotídeos da região NIa-VPg dos isolados de LMV

Nº	Isolados	2	3	4	5	6	7
1	LMV-Cf	93	90	92	93	94	60
2	X97704	-	91	94	98	98	59
3	X97705		-	93	91	91	60
4	J278854			-	94	94	62
5	AJ306288				-	98	60
6	AJ515301					-	58
7	DQ399708						-

Comportamento semelhante foi observado na sequência de aminoácidos, que variou de 94 a 97% quando o LMV-Cf foi comparado com os isolados do GenBank e de 95 a 100% entre eles (Tabela 17). Todas as substituições observadas na sequência de aminoácidos do LMV-Cf estão no C-terminal da proteína, na posição 129 uma Leucina foi substituída por uma Prolina, na posição 161-162 o par de Tirosinas e Ácido glutâmico foram substituídos por Histidina e Lisina e, por último, na posição 187 o Ácido aspártico foi substituído por Glicina. Há necessidade de estudos posteriores para a interação entre as proteínas do LMV e entre as proteínas vírus-planta, como prováveis causas da indução de sintoma atípico causada pelo LMV-Cf.

Tabela 17 Porcentagem de identidade na sequência de aminoácidos da região NIa-VPg dos isolados de LMV

Nº	Isolados	2	3	4	5	6	7
1	LMV-Cf	96	95	94	97	97	46
2	X97704	-	96	96	99	99	47
3	X97705		-	95	97	97	48
4	J278854			-	96	96	48
5	AJ306288				-	100	48
6	AJ515301					-	47
7	DQ399708						-

As árvores filogenéticas baseadas na sequência de nucleotídeos (Figura 9A) e de aminoácidos (Figura 9B) apresentaram agrupamentos similares, com os isolados distribuídos em dois clados. Na primeira (9A) o isolado X97705 ficou isolado em um dos clados, enquanto os demais isolados se agruparam no segundo clado, que por sua vez se subdividiu em três subclados: o isolado AJ278854 do Brasil e o LMV-Cf ficaram isolados no primeiro e segundo subclados e os demais isolados agrupados no terceiro subclado. Comportamento semelhante foi observado na árvore construída com base na sequência de aminoácidos (Figura 9B).

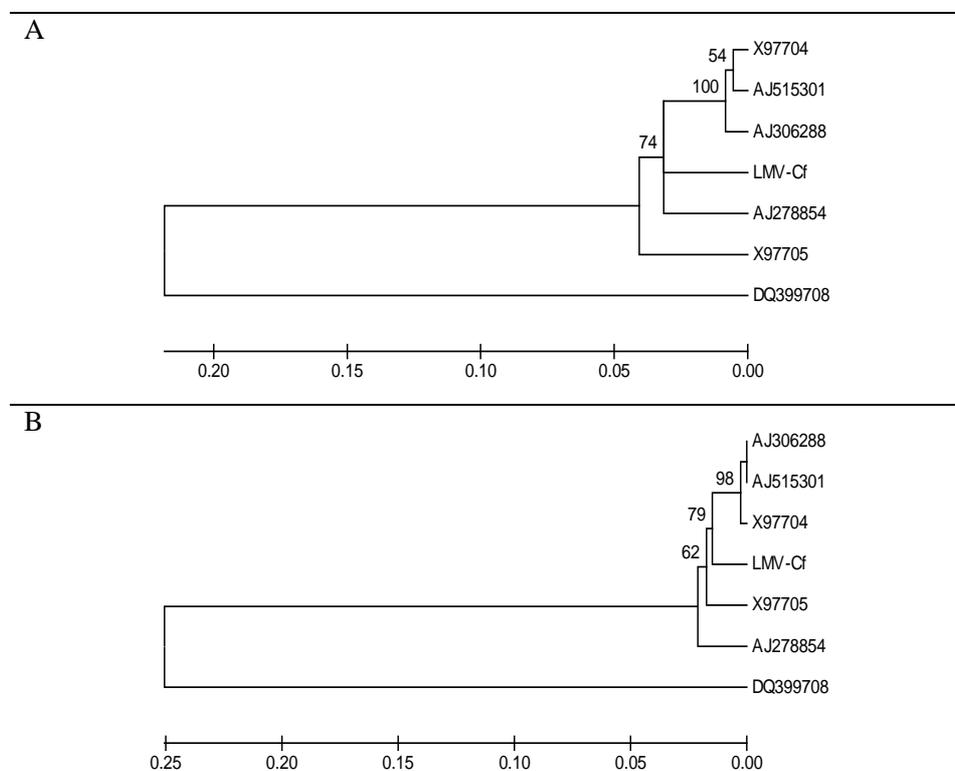


Figura 9 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos (A) e aminoácidos (B) da N1a-VPg de isolados de LMV. Os valores foram obtidos pelo programa MEGA e teste Neighbor-Joining, com 2.000 repetições.

A sequência da N1a protease e os 60 primeiros nucleotídeos da N1b polimerase não foram obtidas. Entretanto, foi feita a comparação do fragmento da N1b polimerase contendo 1500 pares de bases. A identidade de nucleotídeos variou entre 93 e 96% quando o LMV-Cf foi comparado com os isolados do GenBank e de 93 a 96% entre eles (Tabela 18). A identidade de aminoácidos foi bem menos variável ficando entre 97 e 99%, comparando-se todos os isolados. Segundo Adams, Antoniw e Fauquet (2005) a região N1b é mais conservada

entre as espécies de *Potyvirus*, apresentando similaridade de 76% de nucleotídeos e 89% de aminoácidos no estudo de 187 sequência de 46 espécies do gênero *Potyvirus*.

Tabela 18 Porcentagem de identidade na sequência de nucleotídeos da região N1b dos isolados de LMV

Nº	Isolados	2	3	4	5	6
1	LMV-Cf	96	93	94	96	58
2	X97704	-	94	96	98	59
3	X97705		-	93	93	59
4	J278854			-	95	59
5	AJ306288				-	58
6	DQ399708					-

Tabela 19 Porcentagem de identidade na sequência de aminoácidos da região N1b dos isolados de LMV

Nº	Isolados	2	3	4	5	6
1	LMV-Cf	99	98	98	99	59
2	X97704	-	98	98	99	59
3	X97705		-	97	98	59
4	J278854			-	98	59
5	AJ306288				-	59
6	DQ399708					-

Nas árvores filogenéticas construídas com base na sequência de nucleotídeos e de aminoácidos (Figuras 10A e 10B) os agrupamentos foram semelhantes. Em ambas os isolados se separaram em dois clados, com o X97705 separado em um clado e os demais agrupados no segundo clado.

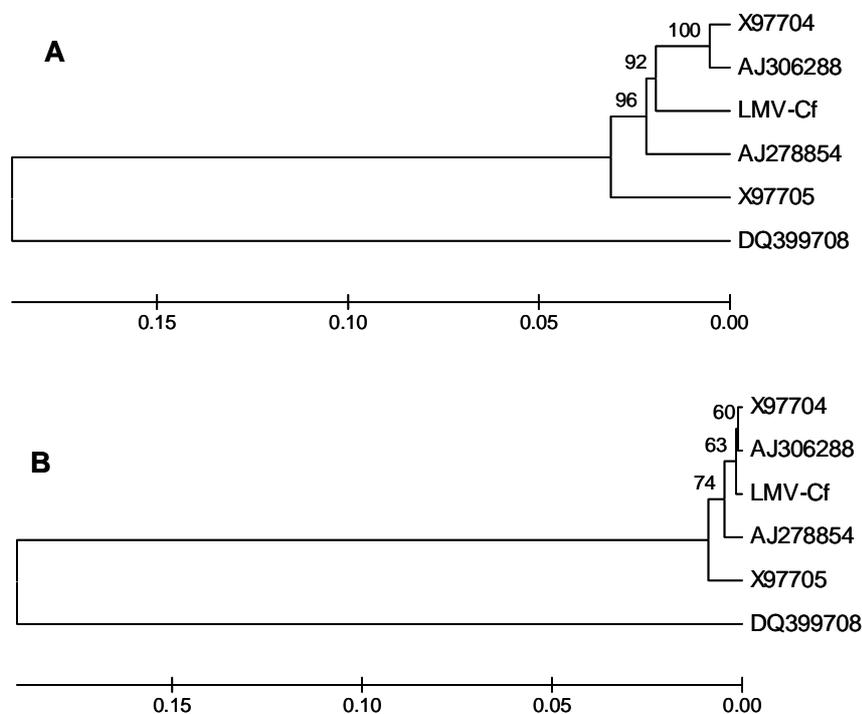


Figura 10 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos (A) e aminoácidos (B) da Nib de isolados de LMV. Os valores foram obtidos pelo programa MEGA e teste Neighbor-Joining, com 2.000 repetições.

A proteína da capa proteica (CP) apresentou 834 nucleotídeos, número igual aos isolados disponíveis no GenBank. Nesse caso, foi encontrado um maior número de sequências disponíveis no GenBank, de modo que foi possível fazer uma melhor avaliação filogenética desse fragmento genômico do LMV-Cf. Quando comparado com outros 13 isolados do GenBank, o isolado estudado apresentou uma identidade de nucleotídeos que variou entre 90 e 98%. O mesmo pode ser observado quando se faz a comparação entre os isolados do GenBank, que mostraram identidades variando entre 89 e 100%. A capa protéica é o gene

que tem sido empregado para classificação dos *Potyvirus*, pela grande quantidade de sequência disponíveis no GenBank e pela similaridade das sequências de nucleotídeos e aminoácidos, sendo que baseado no alinhamento de 1220 sequências da CP de vírus pertencentes ao gênero *Potyvirus*, a diferenciação de espécies para espécies ocorrem quando a diferença das identidades das sequências de nucleotídeos estão abaixo de 76-77% (ADAMS; ANTONIW; FAUQUET, 2005).

Tabela 20 Porcentagem de identidade na sequência de nucleotídeos da região CP dos isolados de LMV

Nº	Isolados	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	LMV-Cf	98	95	96	98	90	97	97	98	90	92	92	92	95	62
2	X97704	-	96	97	99	90	97	98	100	90	92	93	92	96	61
3	X97705		-	95	95	90	95	95	96	90	92	92	92	95	61
4	AJ278854			-	96	89	97	96	97	89	92	92	92	95	61
5	AJ306288				-	90	97	97	99	90	92	92	92	96	60
6	AJ278855					-	89	90	90	100	89	89	89	90	62
7	AJ488153						-	97	97	89	92	93	92	96	60
8	EF423619							-	98	90	92	93	92	96	62
9	JQ794776								-	90	92	93	92	96	61
10	Z78227									-	89	89	89	90	62
11	Z78228										-	98	100	92	62
12	Z78230											-	98	92	62
13	Z78231												-	92	62
14	U246670													-	61
15	DQ399708														-

A identidade de aminoácidos variou entre 93 e 100%, sendo que os valores de 100% foram obtidos entre o LMV-Cf e os isolados X97704 da França, AJ306288 da China, e JQ794776 da Índia. A identidade entre os isolados do GenBank variou entre 92 e 100% (Tabela 21).

Tabela 21 Porcentagem de identidade na sequência de aminoácidos da região CP dos isolados de LMV

N°	Isolados	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	LMV-Cf	100	96	99	100	93	98	97	100	93	93	93	93	97	61
2	X97704	-	96	99	100	93	98	97	100	93	93	93	93	97	61
3	X97705		-	97	96	93	96	95	96	93	93	93	93	95	61
4	AJ278854			-	99	94	98	97	99	94	93	93	93	97	61
5	AJ306288				-	93	98	97	100	93	93	93	93	97	61
6	AJ278855					-	93	93	93	100	93	92	93	92	60
7	AJ488153						-	97	98	93	93	93	93	96	61
8	EF423619							-	97	93	93	93	93	95	60
9	JQ794776								-	93	93	93	93	97	61
10	Z78227									-	93	92	93	92	60
11	Z78228										-	98	100	93	61
12	Z78230											-	98	93	62
13	Z78231												-	93	61
14	U246670													-	61
15	DQ399708														-

A árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos da proteína da capa proteica também mostrou uma subdivisão dos isolados de LMV em dois principais clados (Figura 11). Em um deles ficaram apenas dois isolados, o AJ278855 do Brasil e o Z78227 da Europa, enquanto todos os demais se agruparam no segundo clado. O isolado LMV-Cf ficou mais próximo aos isolados X907704 da França, JQ794776 da Índia e o AJ306288 da China, mesmo se alojando em um subclado distinto.

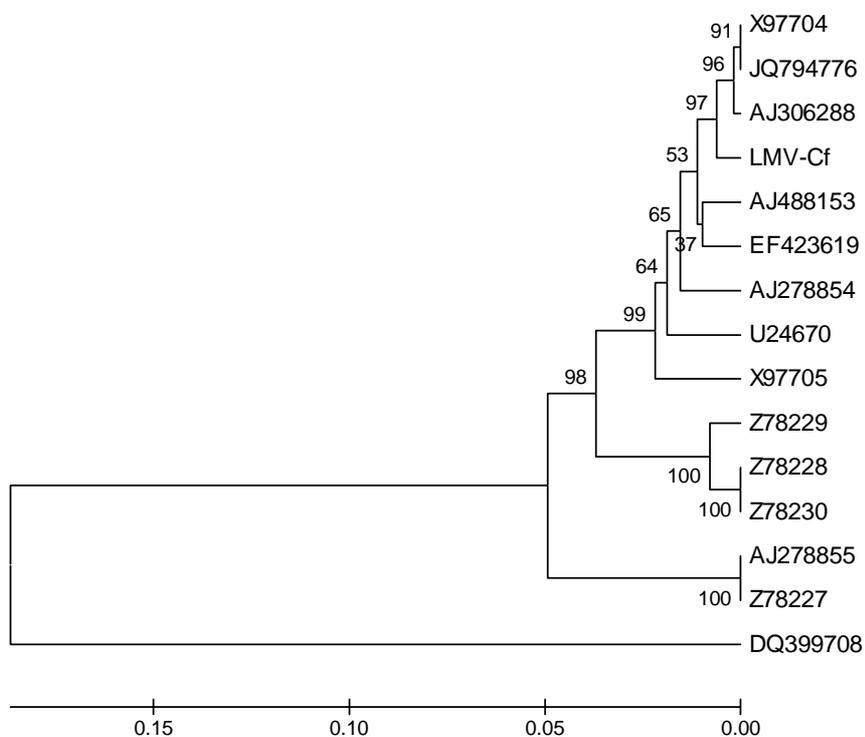


Figura 11 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos da CP de isolados de LMV. Os valores foram obtidos pelo programa MEGA e teste Neighbor-Joining, com 2.000 repetições.

A árvore baseada na sequência de aminoácidos foi um pouco distinta da de nucleotídeos, e apresentou os isolados agrupados em três cladogramas (Figura 12). No primeiro clado ficaram três dos isolados descritos por Revers et al. (1997b): Z78228, Z782229 e Z78230; no segundo se alojaram outros desse grupo, o Z782227 juntamente com o isolado AJ278855 do Brasil; no terceiro clado se agruparam todos os demais isolados utilizados para comparação, com a mesma tendência de proximidade do LMV-Cf. Todos os dados obtidos para a capa proteica, em conjunto, não sugerem nenhuma característica que poderia explicar

a diferença de sintomatologia de cabeça fechada induzida pelo isolado em estudo.

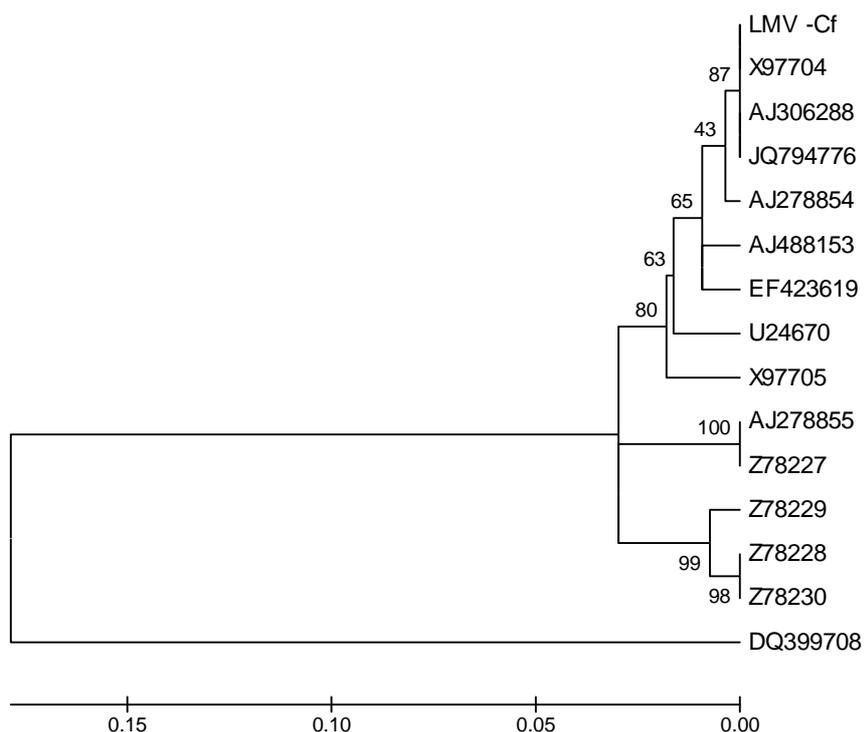


Figura 12 Árvore filogenética construída com base na sequência de aminoácidos da CP de isolados de LMV. Os valores foram obtidos pelo programa MEGA e teste Neighbor-Joining, com 2.000 repetições.

A última região completamente sequenciada foi a 3'UTR, que possui 212 nucleotídeos. A análise da sequência de nucleotídeos mostrou se tratar de uma região muito conservada com grande maioria das identidades variando de 96 a 99% (Tabela 22). Apenas um isolado, o AF395804 da China, apresentou uma identidade menor, no valor de 88%, com o LMV-Cf. Entre os isolados

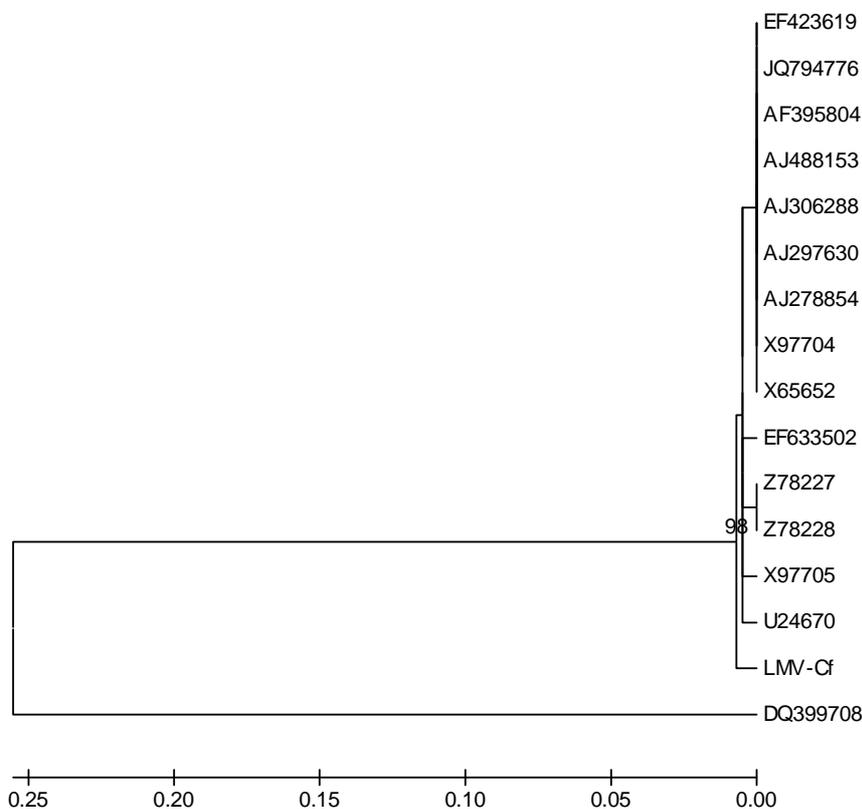


Figura 13 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos da 3'UTR de isolados de LMV. Os valores foram obtidos pelo programa MEGA e teste Neighbor-Joining, com 2.000 repetições

Em relação à identidade dos aminoácidos notou-se, de um modo geral, maiores identidades para a maioria dos fragmentos genômicos comparados, mostrando que as mutações ocorridas na sequência de nucleotídeos não corresponderam à variação nos aminoácidos, ou seja, foi uma substituição não sinônima ou silenciosa (NEI; GOJOBORI, 1986). A proteína 6K2 foi a menos conservada no isolado LMV-Cf, níveis de identidades similares foram observados também para na proteína P3 onde algumas substituições de

aminoácidos foram encontradas nesta região, e uma deleção de aminoácido foi observada na região C-terminal da proteína.

Existem vários relatos na literatura de regiões específicas do genoma viral controlando a expressão de sintomas de plantas. Região HC-Pro afeta sintoma de clareamento das nervuras observadas em *N. tabacum* infectadas com *Tobacco vein moothing virus* (TVMV) (ATREYA et al., 1992) e região CP de *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV) na expressão de sintomas em *Datura stramonium* (SZTTYO; BURGYAN, 2001). Pode ocorrer também a interação de duas regiões para a expressão do sintoma como no caso da região C-terminal P3 e 6K1 de *Plum pox virus* (PPV) que afeta a severidade de sintomas do mosqueado clorótico em folhas de *N. benthamiana* (SAENZ et al., 2000) e região P3, CI, 6K2 e NIa-VPg de *Tobacco etch virus* (TEV) que são determinantes para murcha em pimenta tabasco (*Capsicum annuum*) (CHU et al., 1997).

5 CONCLUSÕES

A maioria das proteínas sequenciadas do LMV-Cf não apresentaram diferenças significativas, embora tenham se separado em clados distintos nas árvores baseadas na sequência de nucleotídeos da proteína CI e no terminal 3'UTR e nas baseadas na sequência de aminoácidos das proteínas HC-PRO, NIa- VPg e CI.

As proteínas P3 e 6K2 LMV-Cf apresentaram diferenças significativas quando comparadas com os isolados de LMV do GenBank, sendo consideradas candidatas a serem investigadas com relação ao seu papel na indução de sintomas atípicos.

REFERÊNCIAS

ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; FAUQUET, J. C. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. **Archives of Virology**, New York, v. 150, p. 459-479, 2005.

ALA-POIKELA, M. et al. Helper component proteinase of the Genus Potyvirus is an interaction partner of translation factors eIF(iso)4E and eIF4e and contains a 4E Binding Motif. **Journal of Virology**, Washington, v. 85, n. 13, p. 6784-6794, 2011.

ANANDALAKSHMI, R. et al. A viral suppressor of gene silencing in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 65, p. 13079-13084, 1998.

ATREYA, C. D.; RACCAH, B.; PIRONE, T. P. A protein mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. **Virology**, New York, v. 178, p. 161-165, 1990.

ATREYA, C. D. et al. Site-directed mutations in the potyvirus HC-PRO gene affect helper component activity, virus accumulation, and symptom expression in infected tobacco plants. **Virology**, New York, v. 191, p. 106-11, 1992.

BATISTA, M. F.; MARINHO, V. L. A. **Vírus e viróides transmitidos por sementes**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. p. 1-80.

BLANC, S. Mutation in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. **Journal of General Virology**, London, v. 185, p. 527-535, 1998.

BOS, L.; HUIJBERTS, N.; CUPERUS, C. Further observation on variation of lettuce mosaic virus in relation to lettuce (*Lactuca sativa*) and a discussion of resistance terminology. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 100, p. 293-314. 1994.

CALDER, V. L.; INGERFELD, M. The roles of cylindrical inclusion protein of a potyvirus in the induction of vesicles in the cell-to-cell spread. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 105, p. 62-66, 1990.

CARRINGTON, J. C.; JENSE, P. E.; SCHAAD, M. C. Genetic evidence for an essential role potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. **Plant Journal**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 393-400, 1998.

CARVALHO, C.; KIST, B. B.; POLL, H. **Anuário brasileiro de hortaliças**. Santa Cruz: Gazeta, 2013. p. 1-88.

CHEN J.; ADAMS M. J.; A Universal PCR to detect members of the Potyviridae and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. **Archives of Virology**, New York, v. 146, n. 4, p. 757-766, 2001.

CHU, M. et al. Two separate regions in the genome of the *Tobacco etch virus* contain determinants of the wilting response of Tabasco pepper. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 10, n. 4, p. 472-480, 1997.

CHUNG, B. Y. N. et al. An overlapping essential gene in the Potyviridae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 15, p. 5897-5902, 2008.

CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked-immunosorbent-assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, London, v. 34, p. 475-483, 1977.

COSTA, C. P.; PINTO, C. A. B. P. **Melhoramento de hortaliças**. Piracicaba: USP-ESALQ, Depto. Genética. p. 319.

COSTA, C. P.; SALA, C. A. B. P. **Melhoramento de hortaliças**. Piracicaba: USP/ESALQ, 2012. p. 319.

COSTA, C. P.; SALA, F. C. A evolução da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 164, jan./mar. 2005. (No prelo).

DINANT, S.; LOT, H.; ALBOUY, J.; KUZIAK, C.; MEYER, M.; 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**, New York, v. 116, n. 1-4, p. 253-252, 1991.

DINANT, S.; LOT, H. Lettuce mosaic virus. **Plant Pathology**, Oxford, v. 41, p. 528-542, 1992.

DOLJA, V. V. et al. Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. **Virology**, New York, v. 206, p. 1007-1016, 1995.

DOUGHERTY, W. G.; CARRINGTON, J. C. Expression and function of potyviral gene products. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 26, p. 123-143, 1988.

FALK, B. W.; PURCIFULL, D. E. Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test to index lettuce seeds for lettuce mosaic virus. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, p. 413-416, 1983.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2011. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> . Acesso em: 22 dez. 2013.

FRANCO, C. Tabela de composição química dos alimentos. **Atheneu**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 1-227, 1987.

GERMAN-RENATA, S. et al. Introduction of a NIa proteinase cleave site between the reporter gene and HC-PRO only particularly restores the biological properties of GUS-or-GFP-tagged LMV. **Virus Research**, Amsterdam, v. 98, p. 151-162, 2000.

GERMAN-RENATA, S.; WALTER, J.; LE GALL, O. Lettuce mosaic virus: from pathogen diversity to host interaction. **Molecular Plant Pathogene**, New York, v. 9, n. 2, p. 127-136, 2008.

GOTO, R.; TIVELLI, S. W. **Produção de hortaliças em ambiente protegido: condições subtropicais**. São Paulo: UNESP, 1998. 319 p.

GROGAN, R. G. Control of lettuce mosaic virus-free seed. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 64, p. 446-449, 1980.

GROGAN, R. G.; WELCH, J. E.; BARDIN, R. Common lettuce mosaic and its control by the use of mosaic-free seeds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 42, p. 573-578, 1952.

HEINZ, G. P.; SUINAGA, F. **Tipos de alfaces cultivadas no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2009. p. 1-7. (Comunicado Técnico, 75). INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário**. Rio de Janeiro, 2006.

JADÃO, A. S. et al. Seed transmission of lettuce mosaic virus (LMV) pathotype II and IV in different lettuce genotypes. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 28, p. 58-61, 2002.

JAGGER, I.C, A transmissible mosaic disease of lettuce, **Journal of Agricultural Research**, Lahore, v. 20, p. 737-741, 1921.

KITAJIMA, E. W. Lista de publicações de viroses e enfermidades correlatas de plantas no Brasil de 1911 a 1985. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 1986. (Suplemento Especial).

KITAJIMA, E. W. Lista de publicações de viroses e enfermidades correlatas de plantas no Brasil de 1986 a 1993. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, p. 92, 1993. (Suplemento especial).

KRAMER, M.; ORLANDO, A.; SILBERSCHMIDT, K. M. Studies on a serious virus disease responsible for the dying-off of our Lettuce crops. **O Biológico**, São Paulo, v. 11, n. 5, p. 121-134, 1945.

KRAUSE-SAKATE, R. et al. A naturally occurring recombinant isolate of Lettuce mosaic virus. **Archives of Virology**, New York, v. 149, p. 191-197, 2004.

KRAUSE-SAKATE, R. et al. Molecular characterization of *Lettuce mosaic virus* field isolates a distinct and widespread type of resistance-breaking isolate: LMV-Most. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, p. 563-572, 2002.

KRAUSE-SAKATE, R. et al. Molecular characterization of two Brazilian isolates of *Lettuce mosaic virus* (LMV) with distinct biological properties. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 153-157, 2001.

KRAUSE-SAKATE, R. et al. Molecular mapping of the determinants of systemic wilting induced by a *Lettuce mosaic virus* (LMV) isolate in some lettuce cultivars. **Virus Research**, Amsterdam, v. 109, p. 175-180, 2005.

KUANG, H. et al. Evolution and genetic population structure of prickly lettuce (*Lactuca serriola*) and its RGC2 resistance gene cluster. **Genetics**, Austin, v. 147, p. 1547-1558, 2008.

LAÍN, S. et al. Homologous potyvirus and flavivirus proteins belonging to a superfamily of helicase-like proteins. **Gene**, Amsterdam, v. 82, p. 357-362, 1989.

LÉDO, F. J. S.; SOUSA, J. A.; SILVA, M. R. Desempenho de cultivares de alface no Estado do Acre. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 225-228, 2000.

LINDQVIST, K. Inheritance studies in lettuce. **Hereditas**, Lund, v. 46, p. 387-470, 2008.

MURPHY, J. F. et al. Replacement of the tyrosine residue that links a potyvirus VPg to the viral RNA is lethal. **Virology**, New York, v. 220, p. 535-338, 1996.

NADAL, R. et al. **Olericultura em Santa Catarina**: aspectos técnicos e econômicos. Florianópolis: EMPASC, 1986. p. 1-187.

NAGAI, H.; COSTA, A. S. Incorporação de resistência ao vírus de mosaico em alface do tipo manteiga. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 95-98, 1971.

NAGAI, H. Alface tipo Manteiga. In: FURLANI, A. M. C.; VIÉGAS, G. P. (Ed.). **O melhoramento de plantas no Instituto Agrônomo**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1993. p. 204-221.

NAGAI, H. Obtenção de novos cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) resistentes ao mosaico e ao calor. I-Brasil 48, 202 e 221. **Revista de Olericultura**, Campinas, v. 17, p. 129-137, 1979.

NEI, M.; GOJOBORI, T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 3, n. 5, p. 418-426, 1986.

OLIVEIRA, F. A. et al. Identificação e caracterização de um isolado do vírus do mosaico da alface (*Lettuce mosaic virus* – LMV). **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 31, n. 4, p. 297-304, out./dez. 2005.

PAVAN, M. A. et al. **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. Campinas: Agronômica Ceres, v. 2, 2005.

PEYPELUT, M. et al. Specific detection of lettuce mosaic virus isolates belonging to the 'Most' type. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 121, p. 119-124, 2004.

PINK, D. A. C.; KOSTOVA, D.; WALKEY, D. G. A. Differentiation of pathotypes of lettuce mosaic virus. **Plant Pathology**, Oxford, v. 41, p. 5-12, 1992.

PINK, D. A. C.; LOT, H.; JOHNSON, R. Novel pathotypes of lettuce mosaic virus: breakdown of a durable resistance. **Euphytica**, Wageningen, v. 63, p. 169-174, 1992.

RAJAMAKI, M. L. et al. A novel insertion site inside the potyvirus P1 cistron allows expression of heterologous protein and suggest some P1 functions. **Virology**, New York, v. 342, p. 88-101, 2005.

REVERS, F. et al. Comparison of the complete nucleotide sequences of two isolates of *Lettuce mosaic virus* differing in their biological properties. **Virus Research**, Amsterdam, v. 47, p. 167-177, 1997a.

REVERS, F. et al. Biological and molecular variability of lettuce mosaic virus isolates. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, p. 397-403, 1997b.

ROJAS, M. R. et al. Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. **Virology**, New York, v. 237, p. 283-295, 1997.

RUFFEL, S. et al. A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). **Plant Journal**, Oxford, v. 32, p. 1067-1075, 2002.

RYDER, E. J. Inheritance of resistance to common lettuce mosaic. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 95, p. 378-379, 1970.

RYDER, E. J.; Seed transmission of LMV in mosaic resistant lettuce. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 98, p. 610-614, 1973.

SÁENZ, P. et al. Identification of a pathogenicity determinant of Plum pox virus in the sequence encoding the C-terminal region of protein P3+6K1. **Journal of General Virology**, London, v. 81, p. 557-599, 2000.

SÁENZ, P. et al. Pathogenicity determinants in the complex virus population of a Plum pox virus isolate. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, p. 278-297, 2001.

SCHAAD, M. C.; ANDERBERG, R. J.; CARRINGTON, J. C. Strain-specific interaction of the tobacco etch virus NIa protein with the translation initiation factor eIF4E in the two-hybrid system. **Virology**, New York, v. 273, p. 300-306, 2000.

SCHAAD, M. C.; LELLIS, A. D.; CARRINGTON, J. C. VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. **Journal of Virology**, Washington, v. 71, n. 11, p. 8624–8631, 1997.

SILVA, M. S. C.; LIMA NETO, V. C. Doenças em cultivos hidropônicos de alface na região metropolitana de Curitiba/PR. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n. 3, p. 275-283, 2007.

SPETZ, C.; VALKONEN, J. P. T. Potyviral 6K2 protein long-distance movement and symptom-induction functions are independent and host-specific. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, n. 5, p. 502-510, 2004.

STANGARLIN, O. S. **Identificação dos vírus causadores de mosaico em cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) resistente ao vírus do mosaico da alface nas regiões produtoras do Estado de São Paulo**. 1995. 72 p. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1995.

STANGARLIN, O. S.; PAVAN, M. A.; DA SILVA, N. Occurrence of a new pathotype of lettuce mosaic virus on lettuce in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 4, p. 490, 2000.

SZITTYA, G.; BRRGYAN, J. *Cymbidium ringspot tombusvirus* coat protein coding sequence acts as an avirulent RNA. **Journal Virology**, Washington, v. 75, n. 5, p. 2411-2420, 2001.

URCUQUI-INCHIMA, S.; HAENNI, A. L.; BERNARDI, F. Potyvirus proteins: A wealth of functions. **Virus Research**, Amsterdam, v. 74, p. 157-175, 2001.

VERCHOT, J.; CARRINGTON, J. C. Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in *trans* as an accessory factor for genome amplification. **Journal of Virology**, Washington, v. 69, p. 3668-3674, 1995.

VERCHOT, J.; KOONIN, E. V.; CARRINGTON, J. C. The 35kd protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as the third viral-encoded proteinase. **Virology**, New York, v. 190, p. 527-530, 1991.

VON DER PAHLEN, A.; CRNKO, J. El virus del mosaico de la lechuga (*Marmor lactucae*) en Mendoza y Buenos Aires. **Revista Investimientos Agropecuarias**, Buenos Aires, v. 11, p. 25-31, 1965.

WITTMAN, S. et al. Interaction of the viral protein genome linked of tumip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* the yeast two-hybrid system. **Virology**, New York, v. 234, p. 84-92, 1997.

ZERBINI, F. M.; KOIKE, S. T.; GILBERTSON, R. L.; Biological and molecular characterization of Lettuce mosaic potyvirus isolates from the Salinas Valley. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 7, p. 746-752, 1995.