

# Frequência de *Lettuce big-vein associated virus* e *Mirafiori lettuce big-vein virus* em Plantas de alface no Estado de São Paulo e transmissão através de extrato vegetal e solo

Márcio Martinello Sanches<sup>1\*</sup>, Renate Krause-Sakate<sup>1</sup>, Francisco Murilo Zerbini<sup>2</sup>, Marlene Rosales<sup>3</sup>, Olivier Le Gall<sup>4</sup>, Marcelo Agenor Pavan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, CP 237, 18603-970, Botucatu-SP; <sup>2</sup> Departamento de Fitopatologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa, MG; <sup>3</sup> Centro Regional de Investigación La Platina, INIA, Chile; <sup>4</sup> Equipe de Virologie, UMR GDPP INRA-Bordeaux 2, IBVM, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon Cedex, France. \* Bolsista CAPES

Autor para correspondência: Renate Krause-Sakate; E-mail : renatekrause@fca.unesp.br

Data da chegada: 14/02/2005. Aceito para publicação em: 19/01/2007.

1302

## RESUMO

Sanches, M.M., Krause-Sakate, R., Zerbini, F.M., Rosales M., Le Gall O., Pavan, M. A. Frequência de *Lettuce big-vein Associated Virus* e *Mirafiori Lettuce Big-vein Virus* em Plantas de alface no Estado de São Paulo e transmissão através de extrato vegetal e solo. *Summa Phytopathologica*, v.33, n.4, p.378-382, 2007.

A presença de sintomas de 'big vein' ou engrossamento das nervuras em alface e a associação do *Lettuce big-vein associated virus* (LBVaV) e *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MLBVV) foram verificadas por RT-PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos para ambos os vírus. Foram coletadas 366 plantas sintomáticas nas regiões de Bauru, Campinas e Mogi das Cruzes no estado de São Paulo nos meses de junho e setembro de 2004 e abril e julho de 2005, e 18 plantas assintomáticas na região de Mogi das Cruzes no mês de dezembro de 2004. Infecção mista do LBVaV e MLBVV foi detectada em 76,2% das plantas sintomáticas, em 11,5% somente o MLBVV foi detectado e em 6,6% somente o LBVaV. Nas plantas assintomáticas coletadas em dezembro na região de Mogi das Cruzes, em áreas de alta incidência da doença durante o inverno, foi detectada a presença de MLBVV em 9 amostras e LBVaV em 7 amostras. Quatro dessas amostras apresentaram infecção mista, indicando que o desenvolvimento de

sintomas depende de fatores abióticos, como temperatura. A inoculação via extrato vegetal a partir de plantas de alface com infecção mista pelo MLBVV e LBVaV foi realizada a 16°C/ 10°C (dia/noite) e fotoperíodo de 11 horas, verificando-se que o MLBVV foi transmitido para *Nicotiana tabacum* TNN, *N. rustica*, *N. occidentalis*, *Chenopodium quinoa* e para as cultivares de alface Trocadero e White Boston, enquanto o LBVaV foi transmitido apenas para a alface White Boston. Entretanto, nenhuma destas plantas apresentou sintomas da doença, com exceção de *C. quinoa* que apresentou sintomas de lesões locais. Plantio em solo proveniente de áreas com histórico da doença de Mogi das Cruzes permitiu a transmissão do LBVaV para alface cv. White Boston e do MLBVV para alface cv. Trocadero e White Boston, embora apenas a cv. White Boston tenha apresentado sintomas da doença. Em conjunto, estes resultados demonstram a dificuldade de transmissão de ambos os vírus, mesmo em condições de laboratório.

Palavras-chave adicionais: RT-PCR, caracterização biológica, *Varicosavirus*, *Ophiovirus*.

## ABSTRACT

Sanches, M.M., Krause-Sakate, R., Zerbini, F.M., Rosales M., Le Gall O., Pavan, M. A. Frequency of *Lettuce big-vein associated virus* and *Mirafiori lettuce big-vein virus* in symptomatic and asymptomatic lettuce plants and sap and soil transmission. *Summa Phytopathologica*, v.33, n.4, p.378-382, 2007.

The occurrence of big vein disease symptoms and the association of *Lettuce big-vein associated virus* (LBVaV) and *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MLBVV) was evaluated by RT-PCR using specific primers for both viruses. A total of 366 symptomatic plants were collected during June and September 2004 and during April and July 2005 at Bauru, Campinas and Mogi das Cruzes in São Paulo state, and 18 symptomless plants were collected in Mogi das Cruzes on December 2004. Mixed infection was detected in 76,2% of the symptomatic plants, 11,5% had only MLBVV and 6,6% had only LBVaV. In the symptomless plants collected in areas with high incidence of the disease throughout the winter, MLBVV was found in 9 plants and LBVaV in 7 plants. Four plants had both viruses, indicating that symptom development depends on abiotic factors, such as

temperature. Plants with MLBVV and LBVaV (mixed infection) were used as source of virus in a host range assay at 16°C/ 10°C (day/ night) and 11h light period. MLBVV was transmitted to *Nicotiana tabacum* TNN, *N. rustica*, *N. occidentalis*, *Chenopodium quinoa* and lettuce cv. Trocadero and White Boston, while LBVaV was transmitted only to lettuce cv. White Boston. No symptoms could be verified for these plants with the exception of *C. quinoa* that showed local lesions. Transmission through soil in areas with high incidence of the disease was observed for LBVaV to lettuce cv. White Boston and MLBVV for lettuce cv. Trocadero and White Boston, but only cv. White Boston showed symptoms. Together, these results demonstrate the difficulties in transmitting both viruses, even under controlled laboratory conditions.

Additional Keywords: RT-PCR, biological characterization, *Varicosavirus*, *Ophiovirus*.

Nos cinco últimos anos, sintomas da doença conhecida como “big-vein”, ou engrossamento das nervuras, vem sendo verificados durante as épocas mais frias do ano no Estado de São Paulo (4). No Estado do Paraná, a doença foi constatada no mesmo ano nas regiões produtoras próximas a Curitiba em plantios convencionais e principalmente nos hidropônicos (10).

A doença foi descrita pela primeira vez na Califórnia (5), ocorrendo em todos os tipos de alface, em plantios convencionais, cultivos protegidos e culturas hidropônicas (17). O sintoma ocorre devido à hiperplasia das células próximas as nervuras, que aumentam de forma exagerada em volume. O porte da planta é reduzido e sua maturidade fisiológica é retardada. Plantas infectadas no estágio de muda podem chegar a não se desenvolver e morrer. Nas cultivares de alface do tipo americana freqüentemente ocorre a má formação da cabeça, enquanto nas do tipo lisa o engrossamento pode ser generalizado ou visível somente em algumas folhas mais velhas da planta, de acordo com o estágio de infecção da muda (6, 26). A perda de peso fresco é verificada quando a planta é infectada entre 5 e 7 semanas após o transplantio (9). A doença ocorre principalmente em temperaturas inferiores a 20°C. No Brasil os sintomas têm sido observados principalmente no inverno, quando as temperaturas diurnas variam de 18 a 22°C e as temperaturas noturnas de 10 a 16°C (4).

A doença foi atribuída inicialmente ao *Lettuce big-vein virus* (LBVV; gênero *Varicosavirus*) (7, 20, 24). Porém, recentemente, um segundo vírus denominado Mirafiori lettuce virus (MiLV) e pertencente ao gênero *Ophiovirus* foi isolado a partir de plantas de alface com sintomas da doença, e nas quais o LBVV não estava presente (16). Sua organização genômica foi elucidada por Van der Wilk *et al.* (22). Ambos os vírus, renomeados pelo International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) para *Lettuce big-vein associated virus* (LBVaV) e *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MLBVV) (15), são considerados atualmente os agentes etiológicos da doença.

A transmissão do LBVaV e do MLBVV ocorre naturalmente pelo fungo *Olpidium brassicae* (12). A transmissão pelo fungo se dá através de zoósporos lançados de esporângios, que aparentemente levam o vírus nos seus protoplastos e o transmitem para raízes sadias. O vírus também é transmitido pelos esporos de resistência (oósporos), os quais sobrevivem por anos no solo na ausência de plantas hospedeiras (2, 3, 11).

Testes de ELISA feitos em folhas e raízes de alfaves inoculadas via *Olpidium brassicae* com isolados de LBVaV provenientes do Brasil e Itália e MLBVV provenientes da França e Itália demonstraram que somente na presença do MLBVV ocorreu o desenvolvimento de sintomas da doença. Em infecção conjunta de MLBVV e LBVaV todas as plantas desenvolveram sintomas de “big-vein” (12). Contudo, em experimentos realizados em campos abertos na Itália, algumas plantas exibindo sintomas de engrossamento encontravam-se infectadas somente pelo LBVaV. É possível que nestes casos discrepantes o ELISA não tenha sido sensível o suficiente para detectar o MLBVV em baixas concentrações, ou que a doença tenha sido causada por outro agente, ou até mesmo por alguns isolados específicos de LBVaV (17). Navarro *et al.* (14) verificaram que a concentração do MLBVV e LBVaV na planta de alface é bastante variável, maior em raízes e folhas mais velhas, devendo estas serem utilizadas para o diagnóstico.

Na Espanha (14) e no Chile (18, 19) a detecção molecular a partir de amostras de alface com sintomas da doença demonstrou a presença de ambos os vírus. No Brasil, embora a doença tenha sido

relatada, ainda não se dispõe de dados sobre a associação de cada um desses vírus em plantas de alface com sintomas. Desse modo, os objetivos deste trabalho foram: (i) verificar via RT-PCR a frequência do MLBVV e LBVaV em plantas de alface sintomáticas e assintomáticas no estado de São Paulo, e (ii) realizar estudos de transmissão por extrato vegetal tamponado e solo com histórico da doença.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Coleta de amostras de alface

Foram coletadas folhas velhas de alface, a partir de plantas exibindo sintomas típicos de engrossamento das nervuras. Os locais de amostragem foram áreas de plantios comerciais situadas nas regiões de Mogi das Cruzes, Campinas e Bauru nos meses de junho (inverno) e setembro (primavera) de 2004 e abril (outono) e julho (inverno) de 2005, com temperaturas propícias para o surgimento da doença. No mês de dezembro de 2004 foram coletadas plantas assintomáticas em áreas na região de Mogi das Cruzes em que foi verificada alta incidência da doença durante o inverno. Alfaves dos tipos crespa, lisa, mimosa, romana e americana foram analisadas.

### Deteção Molecular

A extração do RNA total das amostras coletadas foi realizada segundo Bertheau *et al.* (1).

Para a detecção de ambos os vírus foi utilizada a técnica de transcrição reversa e reação de polimerização em cadeia em uma só etapa (RT-PCR). As sequências dos oligonucleotídeos específicos para MLBVV e LBVaV foram descritas por Rosales *et al.* (19). Para a detecção de MLBVV utilizou-se os pares MiCP1 (5' TTG CAA CGT GAT GAA ACC 3') e MiCP2 (5' AAA GAA GAG AAG CCT GTT CC 3') e para o LBVaV os pares LBCP1 (5' AAG CTT TCC GTA CTG TCC 3') e LBCP2 (5' CCT TGA TAC AGT TTT TGA CC 3'). Ambos os pares amplificam um fragmento em torno de 500 nucleotídeos (nt) correspondente a parte da região codificadora da proteína capsidial.

A RT-PCR para o MLBVV foi efetuada em volume de 25 ml, utilizando-se 2,5 ml de tampão da enzima 10x, 3,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,17% de Triton X-100, 1 mM de cada oligonucleotídeo, 0,25 mM de dNTPs, 0,5 U de *Taq* DNA Polimerase, 0,75 U de transcriptase reversa do AMV, 5 ml de RNA molde e quantidade suficiente de água DEPC para completar 25 ml. Para o LBVaV utilizou-se 10 ml de tampão da enzima 5x, 0,5 mM de cada oligonucleotídeo, 0,5 mM de dNTPs, 1,25 U de *Go Taq* DNA Polimerase (Promega), 0,75 U de transcriptase reversa do AMV, 5 ml de RNA molde e quantidade suficiente de água DEPC para completar 50 ml. A RT-PCR foi realizada a 42°C por 30 minutos, seguido de desnaturação a 95°C por 5 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 92°C por 30 segundos, anelamento a 54°C por 40 segundos e polimerização a 72°C por 40 segundos, com uma polimerização final a 72°C por 10 minutos.

O produto da RT-PCR (5 ml) foi visualizado em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo. Todas as amostras negativas, bem como as com presença de somente um dos vírus, foram testadas duas vezes por RT-PCR para a presença de MLBVV e LBVaV, para confirmação do resultado negativo.

Para comprovação de que se tratava da detecção dos vírus de interesse, fragmentos foram clonados no vetor pGem-T Easy (Promega) e sequenciados. A análise das seqüências foi realizada utilizando-se os programas BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), e a seqüência do LBVaV e MLBVV comparadas com demais seqüências disponíveis no GenBank (21).

### Transmissão via extrato vegetal

Foram testadas a transmissão do LBVaV e MLBVV em espécies pertencentes às famílias *Chenopodiaceae*, *Compositae* e *Solanaceae*: *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, alface cultivar Trocadero e White Boston, *Nicotiana occidentalis*, *N. tabacum* TNN, *N. clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. rustica* e *Sonchus oleraceus*. Foi utilizado um isolado obtido de alface sintomática proveniente do campo com infecção mista para o LBVaV e MLBVV. As folhas foram maceradas (1:3 p/v) em tampão fosfato de sódio 0,03 M pH 8,3 contendo 0,2% de Na-DIECA e carvão ativado a 100 mg/ml (12). Foram inoculados 6 plantas para cada espécie, sendo que três foram mantidas em casa de vegetação e três em câmara de B.O.D. com temperatura de 16°C durante o dia, 10°C durante a noite e fotoperíodo de 11 horas. As plantas foram mantidas durante três meses, com medição diária de temperatura na casa-de-vegetação.

### Transmissão via solo

Plantas de *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, alface cultivar Trocadero, White Boston e *N. clevelandii* foram cultivadas em solo coletado de duas propriedades da região de Mogi das Cruzes com histórico da doença. Duas plantas de cada espécie foram mantidas em vasos em B.O.D. nas condições especificadas no item anterior, durante quatro meses.

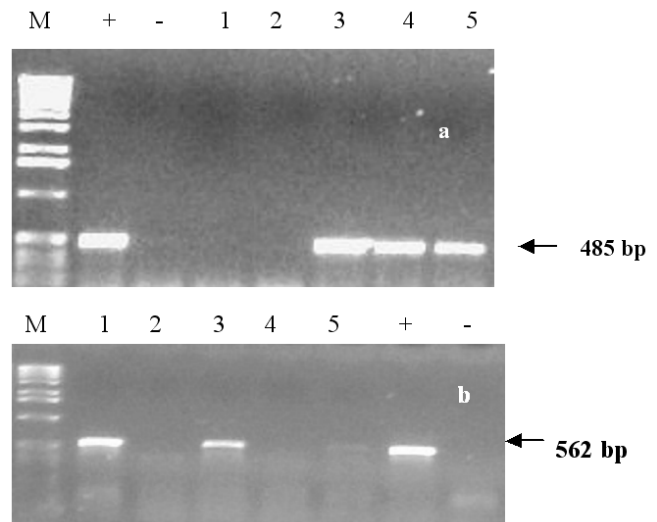
## RESULTADOS

### Deteção de MLBVV e LBVaV em plantas sintomáticas e assintomáticas via RT-PCR

Os oligonucleotídeos utilizados para deteção do MLBVV e LBVaV foram eficientes na deteção dos vírus, amplificando um fragmento de 562 nt para o MLBVV e 485 nt para o LBVaV (Figura

1). As seqüências de nucleotídeos dos fragmentos clonados foram comparadas com demais seqüências disponíveis no GenBank, confirmando que se tratavam dos respectivos vírus (números de acessos MLBVV: DQ530356, DQ530357, DQ530358; LBVaV: DQ530355, DQ530353, DQ530354, DQ530352 ).

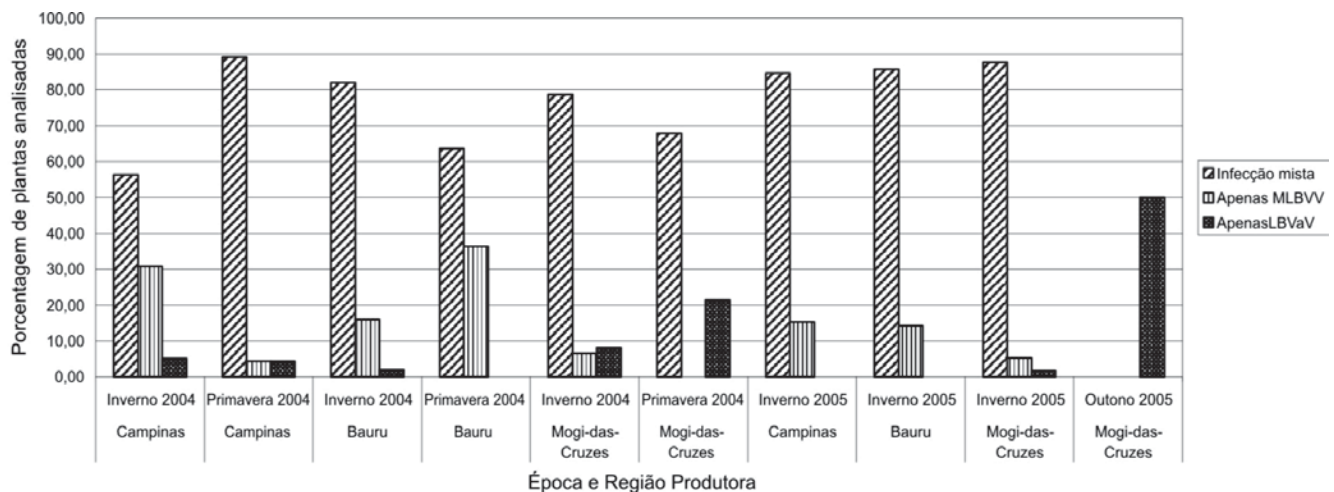
Em todas as regiões produtoras amostradas foi verificada a presença de ambos os vírus associados à doença, independente da época de



**Figura 1.** Padrão eletroforético obtido em RT-PCR (a, oligonucleotídeos LB CP1/CP2 b, oligonucleotídeos Mi CP1/CP2). M, Marcador de comprimento ("1 kb DNA ladder"); +, controle positivo; -, controle negativo. 1-5, amostras de alface.

**Tabela 1.** Deteção via RT-PCR do MLBVV e do LBVaV em plantas de alface sintomáticas em diferentes regiões produtoras do estado de São Paulo em 2004 e 2005.

Região Produtora	Época	Número de plantas	Infecção Mista	Apenas MLBVV	Apenas LBVaV	Negativas
Campinas	Inverno/2004	39	22	12	2	3
Campinas	Primavera/2004	46	41	2	2	1
Bauru	Inverno/2004	50	41	8	1	0
Bauru	Primavera/2004	11	7	4	0	0
Mogi-das-Cruzes	Inverno/2004	61	48	4	5	4
Mogi-das-Cruzes	Primavera/2004	28	19	0	6	3
Campinas	Inverno/2005	39	33	6	0	0
Bauru	Inverno/2005	21	18	3	0	0
Mogi-das-Cruzes	Inverno/2005	57	50	3	1	3
Mogi-das-Cruzes	Outono/2005	14	0	0	7	7



**Figura 2.** Porcentagem de plantas com infecção mista ou somente com um dos vírus em diferentes épocas e regiões produtoras de alface do estado de São Paulo em 2004 e 2005.

coleta (Tabela 1). Na maior parte das amostras foi verificada infecção mista de MLBVV e LBVaV, porém em quantidade representativa foram constatadas plantas sintomáticas infectadas com somente um dos vírus, como no caso das regiões de Campinas e Bauru com o MLBVV e na região de Mogi das Cruzes com o LBVaV (Figura 2).

Dezoito plantas assintomáticas coletadas em dezembro na região de Mogi das Cruzes em áreas com histórico da doença foram avaliadas para a presença do MLBVV e LBVaV. Quatro plantas (22,2%) apresentaram infecção mista, 5 plantas (27,8%) somente infecção por MLBVV e 3 plantas (16,7%) somente infecção por LBVaV. Seis plantas (33,3%) foram negativas para ambos os vírus.

### Transmissão via extrato vegetal e plantio em solo com histórico da doença

No teste com as plantas mantidas em B.O.D. sob baixa temperatura (16°C diurnos e 10°C noturnos) e fotoperíodo de 11 horas, ambos os vírus foram transmitidos via extrato foliar, porém de maneira errática e com baixa porcentagem de transmissão. O MLBVV foi transmitido para *C. quinoa*, *Nicotiana rustica*, *N. tabacum* TNN, alface cv. Trocadero e White Boston e o LBVaV somente para alface cv. White Boston. Ambas as infecções foram confirmadas via RT-PCR. Todas as plantas foram assintomáticas, com exceção de *C. quinoa* que reagiu com sintomas de lesão local. Em condições não controladas de temperatura em casa de vegetação, o MLBVV foi transmitido somente para *N. tabacum* TNN. A temperatura no interior da casa de vegetação atingiu máxima de 30°C, sendo a média superior de 26,5°C, e a temperatura mínima foi de 9°C com média inferior de 14,5°C.

No teste com plantio em solo com histórico da doença, ambos os vírus foram transmitidos para alface, sendo o MLBVV transmitido para as cultivares Trocadero e White Boston e o LBVaV somente para a cv. White Boston. Somente uma planta da cv. White Boston com infecção mista apresentou sintomas sistêmicos de engrossamento das nervuras, característicos da doença, quatro meses após o plantio (Figura 3), sendo que no mesmo vaso uma segunda planta não foi infectada pelos vírus, caracterizando escape mesmo em solo contaminado. Estes dados revelam que o solo utilizado estava contaminado com o vetor *Olpidium brassicae* infectado pelo MLBVV e LBVaV.

### DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o LBVaV e o MLBVV encontram-se disseminados em três regiões produtoras do estado de São Paulo, incluindo os cinturões verdes de Mogi das Cruzes,



Figura 3. Alface cv. White Boston plantada em solo com histórico da doença. Planta à direita exibindo sintomas de engrossamento das nervuras e planta à esquerda sem sintomas.

Campinas e Bauru. Os vírus foram encontrados causando sintomas da doença somente nas épocas mais frias (inverno e primavera), não sendo verificada a presença de engrossamento das nervuras em plantas cultivadas no verão em solo com histórico da doença. Entretanto, mesmo na ausência de sintomas, algumas plantas coletadas ao acaso mostravam-se infectadas por MLBVV e/ou LBVaV e em algumas plantas sintomáticas não foi detectado por RT-PCR o MLBVV e LBVaV. Em trabalhos de detecção realizados na França e Itália (12, 17), utilizando como método de diagnóstico o teste de ELISA, os autores verificaram que existe a presença dos dois vírus na maior parte das plantas sintomáticas analisadas, como foi verificado neste trabalho.

Lot et al. (12) observaram que em plantas sintomáticas o MLBVV sempre esteve presente, e que o LBVaV sozinho não foi capaz de causar os sintomas da doença. Estes resultados foram confirmados em estudos realizados em túnel plástico na França (17) e em campo aberto na Espanha (14). Contudo, Roggero et al. (17) encontraram plantas sintomáticas em campo aberto na Itália infectadas somente com LBVaV, e sugeriram a falta de sensibilidade do teste de ELISA como motivo da não detecção de MLBVV.

Navarro et al. (14) verificaram que apesar da associação de sintomas com o MLBVV, ao final do ciclo da cultura todas as plantas apresentavam infecção mista, exceto uma que possuía somente o MLBVV. A presença ou não dos vírus pode estar associada com a idade das plantas e época em que as plantas foram infectadas, visto que os autores constataram que o LBVaV foi detectado antes do MLBVV, e sempre em uma porcentagem maior de plantas. Roggero et al. (17) também verificaram que em dez plantas sintomáticas testadas como positivas somente para LBVaV, nove apresentaram infecção mista duas semanas após o teste. O presente trabalho demonstrou por meio da detecção por RT-PCR, teste com sensibilidade muito superior ao do ELISA, que na maioria dos casos existe a presença dos dois vírus, embora diversas plantas sintomáticas apresentassem infecção isolada pelo MLBVV ou pelo LBVaV.

A detecção de ambos os vírus em plantas de alface sintomáticas e assintomáticas no campo foi relatada na Espanha por Navarro et al. (14). Segundo estes autores, os vírus ocorrem em maior concentração nas raízes e folhas mais velhas e os sintomas se iniciam somente 40-50 dias após o transplantio, coincidindo com o pico de produção de esporos do vetor *Olpidium brassicae*. O presente trabalho demonstrou que no Brasil, mesmo durante o verão, ambos os vírus infectam plantas em áreas com alta incidência durante o inverno, porém sem causar prejuízos e passando despercebidos por não causarem sintomas da doença. Este fato pode ser explicado por fatores abióticos, como alta temperatura, que impedem a manifestação de sintomas, porém não a infecção da alface por ambos vírus. Segundo Walsh (25), plantas submetidas a uma temperatura constante de 18°C desenvolvem sintomas mais intensos e mais rapidamente, assim como plantas que recebem luz de baixa intensidade durante um período longo, de 18 horas, podendo este fato estar associado com a redução da produção de componentes celulares pela planta. Maekawa et al. (13) encontraram alface com infecção sistêmica pelo LBVaV a 27°C, enquanto que o MLBVV não infectou alface nesta temperatura.

Os resultados de inoculação via extrato vegetal revelaram que isolados brasileiros de LBVaV e MLBVV são transmitidos dessa forma, porém de maneira bastante errática. Lot et al. (12) obtiveram transmissão mecânica dos dois vírus para diversos hospedeiros, incluindo alface, *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. occidentalis* e *C. quinoa*, porém também com baixa porcentagem de transmissão, observando infecção sistêmica nas três espécies de *Nicotiana* e em alface, e lesões locais em *C. quinoa*. A alface infectada com o LBVaV permaneceu assintomática.

Verbeek et al. (23) transmitiram mecanicamente o MLBVV de *Chenopodium quinoa* e *Nicotiana benthamiana* para alface, sendo que algumas plantas desenvolveram a doença.

O fungo proveniente de solo contaminado com *Olpidium brassicae* foi capaz de transmitir tanto o MLBVV como o LBVaV em condições de laboratório, porém algumas plantas permaneceram assintomáticas e positivas para a presença de ambos os vírus. A presença de plantas sintomáticas e assintomáticas no mesmo vaso demonstra a complexidade de se trabalhar em triagem de plantas resistentes a vírus transmitidos por fungos de solo como MLBVV e LBVaV, devido à ocorrência de escape.

Este foi o primeiro estudo realizado com grande número de plantas sintomáticas, e os resultados obtidos permitem concluir que no Estado de São Paulo a doença ocorre nas principais regiões produtoras durante o ano todo. Ambos os vírus estão envolvidos na etiologia da doença. A detecção molecular via RT-PCR se mostrou uma ferramenta precisa e segura na detecção, uma vez que pela sintomatologia não é possível concluir sobre qual dos vírus está presente na amostra. Atualmente as medidas de controle sugeridas para diminuir as perdas ocasionadas por estes vírus durante as épocas frias do ano consistem na prevenção de solos mal drenados e excesso de irrigação, condições que permitem a fácil locomoção dos zoóporos (esporos flagelados) do fungo vetor, e o “roguing” (8). Cultivares resistentes ainda não estão disponíveis e sua obtenção deve ser incentivada, porém levando-se em conta a utilização de um bom sistema de triagem devido à ocorrência de escape, mesmo quando se utiliza solo contaminado com *Olpidium brassicae* infectado com MLBVV e LBVaV.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com auxílio financeiro da FAPESP (Proc. 04/15180-5)

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bertheau, Y.; Frechon, D.; Toth, I.K.; Hyman, L.J. DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). In: Perombelon, M.V.M.; Wolff, J.M. Van der (Ed.) **Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potatoes**. Dundee, Scottish Crop Research Institute, 1998.
- Campbell, R.N. Relationship between the lettuce big-vein virus and its vector, *Olpidium brassicae*. **Nature**, Londres, v.195, p.675-677, 1962.
- Campbell, R.N. Fungal transmission of plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p.87-108, 1996.
- Colariccio, A.; Chaves, A.L.R.; Chagas, C.M.; Lenzi, R.; Roggero, P. Presence of lettuce big-vein disease and associated viruses in a subtropical area of Brazil. **Plant Pathology**, Bangor, v.52, p.792, 2003.
- Jagger, I.C.; Chandler, N. Big Vein, a disease of lettuce. **Phytopathology**, St. Paul, v. 24, p.1253- 1256, 1934.
- Krause-Sakate, R.; Pavan, M.A.; Silva, N.; Goto, R. O “big vein” ataca. **Cultivar HF**, Pelotas, v. IV, n. 22, p. 13, 2003.
- Kuwata, S.; Kubo, S.; Yamashita, S.; Doi, Y. Rod-shaped particles, a probable entity of Lettuce big vein virus. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokio, v.49, p.246-251, 1983.
- Latham, L.J.; Jones, R.A.C. Deploying partially resistant genotypes and plastic mulch on the soil surface to suppress spread of lettuce big-vein disease in lettuce. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 55, n.2, p.131-138, 2004.
- Latham, L.J.; Jones, R.A.C.; Mckirdy, S.J. Lettuce big-vein disease: sources, patterns, and losses. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.55, n.2, p.125-130, 2004.

- Lima Neto, V.C.; Colariccio, A.; Chaves, A.L.R.; Strapasson, M.; Chagas, C.M.; Roggero, P. Ocorrência de Varicosavírus e Ophiovírus associados ao espessamento clorótico das nervuras da alface no estado do Paraná. In: Congresso Paulista de Fitopatologia, 27., 2004, Campinas. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v. 30, n.1, 2004. (Resumo).
- Lin, M.T.; Campbell, R.N.; Smith, P.R.; Temmink, J.H.M. Lettuce big-vein virus transmission by single-sporangium isolates of *Olpidium brassicae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, p.1630-1634, 1970.
- Lot, H.; Campbell, R.N.; Souche, S.; Milne, R.G.; Roggero, P. Transmission by *Olpidium brassicae* of Mirafiori lettuce virus and *Lettuce big-vein virus*, and their roles in Lettuce Big-Vein etiology. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 3, p.288-293, 2002.
- Maekawa, K.; Sasaya, T.; Fujii, H.; Ishikawa, K.; Kanto, T.; Iwamoto, Y.; Aino, M. The effect of growth temperature on big-vein symptom and serological detection of Mirafiori lettuce virus and *Lettuce big-vein virus* in lettuce. **Japanese Journal of Phytopathology**, Tokio, v.70, p.320-322, 2004.
- Navarro, J.A.; Botella, F.; Maruhenda, A.; Sastre, P.; Sánchez-Pina, M.A.; Pallas, V. Comparative infection progress analysis of *Lettuce big-vein virus* and *Mirafiori lettuce virus* in lettuce crops by developed molecular diagnosis techniques. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, n. 5, p.470-477, 2004.
- Navarro, J.A.; Torok, V.A.; Vetten, H.J.; Pallas, V. Genetic variability in the coat protein genes of Lettuce big-vein associated virus and Mirafiori lettuce big-vein virus. **Archives of Virology**, New York, v.150, p.681-694, 2005.
- Roggero, P.; Ciuffo, M.; Vaira, A.M.; Accotto, G.P.; Masenga, V.; Milne, R.G. An *Ophiovirus* isolated from lettuce with big-vein symptoms. **Archives of Virology**, New York, v. 145, p. 2629-2642, 2000.
- Roggero, P.; Lot, H.; Souche, S.; Lenzi, R.; Milne, R.G. Occurrence of Mirafiori lettuce virus and *Lettuce big-vein virus* in relation to development of big-vein symptoms in lettuce crops. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, p. 261-267, 2003.
- Rosales, M.; Sepulveda, P.; Rebufel, P.; Bruna, A. Detección e identificación de *Lettuce big-vein virus* (LBVV) y Mirafiori Lettuce Virus (MiLV) por RT-PCR. In: Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatologia, 12., 2003, Marbella. (Resumo).
- Rosales, M.; Sepulveda, P.; Bruna, A. First Report of *Lettuce big-vein virus* and Mirafiori lettuce virus in Chile. **Plant Disease**, St.Paul, v.88, p.1286, 2004. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/pd/searchnotes/2004/0914-01N.asp>>. Acesso em 08 nov. 2004.
- Sasaya, T.; Ishikawa, K.; Koganezawa, H. Nucleotide sequence of the coat protein gene of *Lettuce big-vein virus*. **Journal of General Virology**, Londres, v.82, p. 1509-1515, 2001.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.22, p. 4673-4680. 1994.
- Van Der Wilk, F.; Dulleman, A.M.; Verbeek, M.; Van Den Heuvel, J.F.J.M. Nucleotide sequence and genomic organization of an ophiovirus associated with lettuce big-vein disease. **Journal of General Virology**, Londres, v.83, p. 2869-2877, 2002.
- Verbeek, M.; Van Der Wilk, F.; Vetten, H.J.; Van Der Heuvel, J.F.J.M. Viruses associated with the lettuce big-vein syndrome. In: Arbeitskreis Viruskrankheiten der Pflanze Tagung, 2001, Köln. (Resumo).
- Vetten, H.J.; Lesemann, D.E.; Dalchow, J. Electron microscopical and serological detection of virus-like particles associated with lettuce big-vein disease. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.120, p.53-59, 1987.
- Walsh, J.A. Effects of some biotic and abiotic factors on symptom expression of *Lettuce big-vein virus* in lettuce (*Lactuca sativa*). **Journal of Horticultural Science**, Ashfordkent, v.69, n.1, p.21-28, 1994.
- Zink, F.W.; Grogan, R.G. The interrelated effects of big vein and market price on the yield of head lettuce. **Plant Disease Reporter**, Washington, v.38, p. 844-846, 1954.