

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DO *Lettuce big-vein associated virus* E *Mirafiori lettuce big-vein virus* E ESTUDO DA OCORRÊNCIA EM RELAÇÃO A ÉPOCA E SINTOMA EM PLANTAS DE ALFACE NO ESTADO DE SÃO PAULO.

MÁRCIO MARTINELLO SANCHES

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de plantas)

BOTUCATU-SP
Janeiro - 2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DO *Lettuce big-vein associated virus* E *Mirafiori lettuce big-vein virus* E ESTUDO DA OCORRÊNCIA EM RELAÇÃO A ÉPOCA E SINTOMA EM PLANTAS DE ALFACE NO ESTADO DE SÃO PAULO.

MÁRCIO MARTINELLO SANCHES

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Renate Krause Sakate

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de plantas)

BOTUCATU-SP
Janeiro - 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E
TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO
UNESP - FCA - LAGARDO - BOTUCATU (SP)

S222c Sanches, Márcio Martinello, 1980-
Caracterização molecular e biológica do Lettuce big-
vein associated virus e Mirafiori lettuce big-vein virus e
estudo da ocorrência em relação a época e sintoma em
plantas de alface no Estado de São Paulo / Márcio
Martinello Sanches . - Botucatu : [s.n.], 2006.
viii, 56f. : il., gráfs, tabs.

Dissertação (mestrado)-Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2006
Orientador: Renato Krause Sakate
Inclui bibliografia.

1. Alface. 2. Reação em cadeia de polimerase. 3. Víruses.
4. Alface - Aspectos biológicos. 5. Fitopatologia. I. Saka
te, Renato Krause. II. Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade
de Ciências Agronômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DO Lettuce big-vein associated virus E Mirafiori lettuce big-vein virus E ESTUDO DA OCORRÊNCIA EM RELAÇÃO À ÉPOCA E SINTOMA EM PLANTAS DE ALFACE NO ESTADO DE SÃO PAULO"

ALUNO: MARCIO MARTINELLO SANCHES

ORIENTADOR: PROFA. DRA. RENATE KRAUSE SAKATE

Aprovado pela Comissão Examinadora


PROFA. DRA. RENATE KRAUSE SAKATE


PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN


DR. ROMULO FUJITO KOBORI

Data da Realização: 31 de janeiro de 2006.

Dedico com muito amor

À minha esposa Elaine Cristina

Ao meu filho Gabriel

Aos meus pais Roberto e Ana Maria

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Elaine, que sempre esteve ao meu lado, pelo apoio, incentivo e carinho e ao meu filho Gabriel, que já teve paciência comigo e me inspirou antes mesmo de nascer.

Aos meus pais Roberto e Ana Maria por tudo que sempre fizeram por mim e serem os responsáveis pela minha formação, aos meus irmãos Alexandre e Roberta e minha avó Aparecida pela convivência amorosa.

À minha orientadora, Prof. Dr^a. Renate Krause Sakate, pelos ensinamentos, incentivo, compreensão e competência na condução dos trabalhos.

Ao Prof. Dr. Francisco Murilo Zerbini e a Dr^a Marlene Rosales pelas sugestões, contribuições e informações valiosas para o desenvolvimento do trabalho.

Aos companheiros de laboratório Márcia César, Jorge Massaki Hasegawa, Denise Nozaki, Gerson Suzuki, Ana Carolina Firmino e Marco Cotrim por todo apoio, ensinamentos e amizade.

Aos colegas de curso Marcel Bonini, Eduardo Bernardo, Karina Zamprogno, Adimara Colturato, Sandra Schultz, Carlos Demant, Tadeu, Sandra Elizabeth, Caroline, Juliana e todos aqueles com que convivi, pela amizade e ajuda nos momentos difíceis.

Aos Professores Marcelo Agenor Pavan, Antônio Carlos Maringoni, Edson Luiz Furtado e Nilton Luiz de Souza pela formação e ensinamentos, e aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal e da Faculdade de Ciências Agrônômicas pelos auxílios com o experimento e na realização do curso.

Aos meus sogros Clementino e Maria Helena Franco e aos meus cunhados Cristiano e Liliane, por me acolherem e tudo o que fizeram por mim, ajudando a tornar possível a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de república, Douglas Martins, André Nascimento, Rogério Sá e Iuchoa Katz, pelos momentos de alegria, convivência tranqüila e apoio nos momentos difíceis.

Aos pesquisadores da UPD Bauru/APTA Regional Aparecida Almeida, Maria José Garcia e Luiz Margatho e aos professores Aloísio Sampaio e Terezinha Fumis da UNESP/Bauru por serem os responsáveis pela minha iniciação científica.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

E a todos que de alguma maneira contribuíram na realização deste projeto.

SUMÁRIO

	Página
1. Resumo.....	1
2. Summary.....	3
3. Introdução.....	5
4. Revisão de Literatura.....	7
4.1. Sintomas do “Big-vein” ou engrossamento das nervuras.....	7
4.2. <i>Lettuce big-vein associated virus</i>	9
4.3. <i>Mirafiori lettuce big-vein virus</i>	10
4.4. Transmissão dos vírus.....	12
4.5. Controle.....	13
5. Material e Métodos.....	15
5.1. Coleta de amostras de alface e localização dos experimentos.....	15
5.2. Extração de RNA total.....	17
5.3. Detecção dos vírus por RT-PCR.....	18
5.4. Preparo de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	19
5.5. Clonagem e Sequenciamento.....	19
5.6. Análise dos dados obtidos.....	21
5.7. Transmissão via extrato vegetal de isolados do LBVaV e MLBVV.....	22
5.8 Transmissão através de solo em área com histórico da doença.....	22
6. Resultados e Discussão.....	23
6.1. Levantamento da ocorrência de Big-vein.....	23
6.2. Sequenciamento.....	31
6.3. Caracterização Biológica.....	39
6.4. Considerações Gerais.....	41

7. Conclusões.....	42
8. Referências Bibliográficas.....	43
9. Apêndice.....	50
Apêndice 1. Alinhamento de aminoácidos de parte da porção codificadora para a proteína capsidial entre isolados de LBVaV.....	51
Apêndice 2. Alinhamento de aminoácidos de parte da porção codificadora para a proteína capsidial entre isolados de MLBVV.....	54

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Representação esquemática da organização do genoma de LBVaV, indicando os dois componentes do genoma, e abaixo do genoma (VC) o RNA complementar com as ORFs representadas nos boxes.....	10
2. Representação esquemática da organização do genoma de MLBVV, indicando os quatro componentes do genoma, e abaixo do genoma (VC) o RNA complementar com as ORFs representadas nos boxes.....	11
3. Sintomas de big-vein em alface tipo mimosa (a), romana (b), americana (c), lisa (d) e crespa (e).....	24
4. Padrão eletroforético obtido pelos oligonucleotídeos em RT-PCR (a- LBVV CP1/CP2 b- MiLVV CP1/CP2). M- Marcador de peso molecular; + controle positivo; - controle negativo. 1- 5 amostras de alface.....	26
5. Padrão eletroforético obtido pelos oligonucleotídeos em RT-PCR (a- LBVV CP3/CP4 b- MiLVV CP3/CP4). M- Marcador de peso molecular; + controle positivo; - controle negativo. 1- 5 amostras de alface.....	27
6. Porcentagem de plantas com infecção mista por LBVaV e MLBVV, ou somente com um dos vírus coletadas em diferentes épocas e regiões produtoras de alface do Estado de São Paulo nos anos de 2004 e 2005.....	29
7. Análise filogenética entre isolados de LBVaV construída com aminoácidos de parte do gene codificador para a capa protéica. Valor de bootstrap 2000 e outgroup <i>Northern cereal mosaic virus</i> (NCMV, AB030277). Método Neighbor-Joining.....	36
8. Análise filogenética entre isolados de MLBVV construída com aminoácidos de parte do gene codificador para a capa protéica. Valor de bootstrap 2000 e outgroup <i>Citrus psorosis virus</i> (CPsV, AF036338). Método Neighbor-Joining.....	37
9. Alface cv. White Boston cultivada em solo com histórico da doença. Planta à direita exibindo sintomas de engrossamento das nervuras e planta à esquerda sem sintomas.....	40

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Amostras coletadas, de acordo com o produtor, época e o tipo de alface.....	16
2. Amostras selecionadas para o sequenciamento do gene que codifica a proteína capsidial.....	21
3. Detecção através de RT-PCR dos vírus MLBVV e LBVaV em plantas de alface sintomáticas em diferentes regiões produtoras do Estado de São Paulo nos anos de 2004 e 2005.....	28
4. Lista de isolados de MLBVV e LBVaV utilizados para análise filogenética. A origem geográfica e número de acesso no GenBank do gene codificador para a capa protéica estão indicados.....	33
5. Porcentagem de identidade da seqüência de aminoácidos (diagonal inferior) e de nucleotídeos (diagonal superior) de parte do gene para a capa proteica entre os isolados brasileiros (BR104, BR105, BR106 e BR107) (em azul) e demais isolados de LBVaV. Outgroup NCMV (AB030277).....	34
6. Porcentagem de identidade da seqüência de aminoácidos (diagonal inferior) e de nucleotídeos (diagonal superior) de parte do gene codificador para a capa proteica entre isolados brasileiros de MLBVV (BR58, BR60, BR61) e demais isolados. Outgroup CPsV (AF036338).....	35

1. RESUMO

Recentemente sintomas da doença conhecida como engrossamento das nervuras, ou “big-vein”, foram observados no Estado de São Paulo, principalmente no período de inverno. A doença foi historicamente associada ao *Lettuce big-vein associated virus* (LBVaV), porém a presença dos sintomas característicos foi atribuída ao *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MLBVV). Tradicionalmente ambos vírus vem sendo diagnosticados pelo teste de ELISA, de modo que resultados discrepantes quanto ao agente causal dos sintomas da doença foram obtidos na Europa, possivelmente devido à falta de sensibilidade do teste.

Deste modo, o presente trabalho teve como finalidade utilizar a técnica de RT-PCR na detecção segura e específica do MLBVV e LBVaV. Foram coletadas 366 plantas sintomáticas nas regiões produtoras 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. Os oligonucleotídeos específicos foram altamente eficientes na detecção de ambos os vírus, sendo que a banda viral foi clonada e sequenciada para alguns dos isolados, comprovando a identidade viral de cada um dos vírus. Foi observado que 76,2% das plantas sintomáticas apresentaram infecção mista do LBVaV e MLBVV, em 11,5% somente o MLBVV e em 6,6% somente o LBVaV. Nas plantas assintomáticas foi detectada a presença de infecção mista por MLBVV e LBVaV em quatro amostras, infecção apenas por MLBVV em cinco amostras e

apenas por LBVaV em três amostras, indicando que o desenvolvimento de sintomas depende de fatores abióticos, além da presença dos vírus.

A análise das sequências de aminoácidos da região codificadora da proteína capsidial, revelou que os isolados de LBVaV possuem baixa variabilidade genética e mesma origem evolutiva entre isolados de diferentes partes do mundo, sugerindo uma baixa pressão de seleção para áreas geográficas específicas. Entre os isolados de MLBVV foi verificada maior variabilidade genética. Os isolados brasileiros de MLBVV possuem apenas um sítio de restrição a enzima *Rsa* I, na sequência codificadora para a capa proteica, pertencendo ao subgrupo A.

Uma planta com infecção mista por ambos vírus foi utilizada em testes de transmissão via extrato vegetal realizada em condições de temperatura e luminosidade controlados. Foi verificado 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. Somente *C. quinoa* apresentou sintomas da doença, estes na forma de lesões locais cloróticas.

Tanto MLBVV e LBVaV são transmitidos pelo fungo de solo *Olpidium brassicae*. O plantio em solo proveniente de áreas com histórico da doença permitiu a transmissão do LBVaV para alface cv. White Boston e MLBVV para alface cv. Trocadero e White Boston, sendo que somente a cv. White Boston apresentou sintomas da doença. A transmissão dos vírus para alface através do solo contaminado com o vetor se mostrou difícil, já que ocorreram sintomas de engrossamento das nervuras em apenas três plantas de um total de trinta e duas, após noventa dias de plantio, sendo o MLBVV detectado através de RT-PCR em vinte e cinco plantas e o LBVaV em nove plantas. Estes dados demonstram a complexidade de se efetuar trabalhos para triagem de plantas resistentes com vírus transmitidos por fungos de solos e altamente dependentes de fatores abióticos para expressão de sintomas, como o MLBVV e LBVaV.

MOLECULAR AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF *Lettuce big-vein associated virus* AND *Mirafiori lettuce big-vein virus* AND STUDY OF THE OCCURRENCE DURING THE YEAR AND ON LETTUCE PLANTS SHOWING SYMPTOMS FROM SÃO PAULO STATE. Botucatu, 2006. 56p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: MÁRCIO MARTINELLO SANCHES

Adviser: RENATE KRAUSE-SAKATE

2. SUMMARY

Lettuce plants with big-vein symptoms have been observed in the São Paulo State during the winter. The disease has been historically associated to *Lettuce big-vein associated virus* (LBVaV), however recently the development of symptoms was attributed to *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MLBVV). Traditionally both viruses were routinely detected by ELISA, but discrepant results about the main disease agent were obtained in the Europe possibly by the low sensibility of the assay.

The objective of this study was to detect MLBVV and LBVaV by RT-PCR, using specific “primers”. A total of 366 samples from symptomatic plants of Bauru, Campinas and Mogi das Cruzes regions, from São Paulo State, were collected during June and September of 2004 and April and July of 2005, and 18 symptomless plants from the Mogi das Cruzes region during December 2004. The primers were highly efficient in the

detection of both viruses, and the fragment of some isolates were cloned and sequenced to confirm the RT-PCR. Mixed infection of LBVaV and MLBVV was observed on 76,2% symptomatic plants. MLBVV on 11,5% and LBVaV on 6,6%. In a total of 18 symptomless plants, four were infected with both viruses, five only with MLBVV and three plants with LBVaV. These results indicates that not only the presence of the viruses, but also abiotic factors are necessary for the occurrence of big-vein symptoms.

Amino acid sequence identities of part of the coat protein gene of LBVaV isolates was high indicating a possible same evolutive origin. Genetic diversity among MLBVV isolates was higher when compared to LBVaV isolates. MLBVV brazilian isolates belongs to subgroup A, with one *RsaI* restriction site on the coat protein sequence.

Excluído: Comparison of

One plant with MLBVV and LBVaV (mixed infection) was sap inoculated on a host range (temperature and luminosity controled), indicating that MLBVV can be transmitted to *Nicotiana tabacum* TNN, *N. rustica*, *N. occidentalis*, *Chenopodium quinoa* and lettuce cv. Trocadero and White Boston, while the LBVaV was transmitted only for lettuce cv. White Boston. Only *C. quinoa* shown symptoms of local lesions.

Both viruses are transmitted by *Olpidium brassicae*, a soilborne fungi. Soil collected from areas with high incidence of the disease could transmit LBVaV to lettuce cv. White Boston and MLBVV for lettuce cv. Trocadero and White Boston, but only cv. White Boston showed big vein symptoms. Only three plants in a total of 32 shown big vein symptoms after 90 days post-transplanting, however the MLBVV was detected by RT-PCR in 25 plants and the LBVaV in 9 plants, indicating the difficulty to work with viruses transmitted by fungi, like MLBVV and LBVaV.

Keywords: RT-PCR, biological characterization, MLBVV, LBVaV.

3. INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) pertence à ordem Asterales, família Asteraceae. Esta família compreende cerca de 1.100 gêneros, com aproximadamente 25.000 espécies de ampla distribuição geográfica (HEYWOOD & HARBONE, 1977).

No Brasil a família Asteraceae é representada pelos gêneros *Hypochoeris*, *Hieracium*, *Sonchus*, *Picris*, *Picrosia*, *Tragopogon*, *Taraxacum*, que não são cultivadas e os gêneros *Cichorium* e *Lactuca* com espécies cultivadas (BARROSO, 1986).

A alface originou-se de espécies silvestres, em regiões de clima temperado, no sul da Europa e Ásia Ocidental. Há diversos tipos de cultivares de alface que foram desenvolvidos através de seleção artificial, entre os quais, repolhuda-manteiga, repolhuda-crespa (Americana), solta-lisa, solta-crespa, mimosa e romana (FILGUEIRA, 2000).

O Estado de São Paulo é um dos principais produtores de alface do País, com uma produção de 57.509 toneladas em 2003 com movimentação de R\$ 25.189.306,43 (TSUNECHIRO et al., 2004).

Entre os problemas fitossanitários da cultura da alface estão as doenças causadas por vírus que podem ser transmitidos por diferentes vetores ou por sementes, e que não possuem formas de controle depois de ocorrida a infecção. Dependendo das condições ambientais e dos cuidados dispensados à cultura, as viroses podem ser responsáveis por perdas de até 100% (REZENDE & CUPERTINO, 1995). Na cultura da alface predominam o *Lettuce mosaic virus*, causador do mosaico da alface e os vírus do gênero *Tospovirus*, causando a doença conhecida como vira-cabeça (SALAS, 2001).

Nos cinco últimos anos, sintomas da doença conhecida como “big-vein”, ou espessamento das nervuras, vem sendo verificados durante as épocas mais frias no Estado de São Paulo (COLARICCIO et al., 2003; 2005). No Estado do Paraná, a doença foi constatada no mesmo ano, nas regiões produtoras próximas a Curitiba em plantios convencionais e principalmente nos hidropônicos (LIMA NETO et al., 2004).

A doença tem sido historicamente atribuída ao *Lettuce big-vein associated virus* (LBVaV; gênero *Varicosavirus*) (KUWATA et al., 1983, VETTEN et al., 1987; SASAYA et al., 2001). Porém, recentemente, um segundo vírus denominado de *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MLBVV) e provavelmente pertencente ao gênero *Ophiovirus* foi isolado a partir de plantas de alface com sintomas da doença (ROGGERO et al., 2000), sendo que ambos são transmitidos pelo fungo de solo *Ospidium brassicae* (LOT et al., 2002).

O diagnóstico de ambos vírus tem sido realizado através do teste de ELISA com antissoros policlonais (LOT et al., 2002; ROGGERO et al., 2003; COLARICCIO et al., 2003; COLARICCIO et al., 2005). Na Espanha (NAVARRO et al., 2004) e no Chile (ROSALES et al., 2003, 2004) a detecção molecular de amostras de alface com sintomas da doença demonstrou a presença de ambos os vírus associados à doença. No Brasil, apesar da doença já ter sido relatada (COLARICCIO et al., 2003), não se sabe qual dos vírus predominam em plantas com sintomas de engrossamento das nervuras, bem como não existem dados moleculares de isolados brasileiros.

Deste modo, o objetivo do trabalho foi utilizar técnicas moleculares na detecção segura e específica do MLBVV e LBVaV em amostras de alface provenientes das principais regiões produtoras de alface no Estado de São Paulo, realizar a caracterização molecular parcial por meio do sequenciamento da região codificadora para a capa protéica, correlacionar a ocorrência de ambos os vírus e a presença de sintomas de engrossamento das nervuras e realizar a caracterização biológica de um dos isolados brasileiros.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Sintomas do “Big-vein” ou engrossamento das nervuras

O primeiro relato da doença foi realizado por Jagger & Chandler (1934) como possivelmente sendo causada por um vírus. É uma das mais sérias e complexas doenças virais transmitidas por fungo (VAN DER WILK et al., 2002), ocorrendo em todos os tipos de alface, em cultivo protegido ou não e em culturas hidropônicas (ROGGERO et al., 2003).

O sintoma do engrossamento das nervuras é decorrente da hiperplasia das células próximas as nervuras, que aumentam de forma exagerada seu volume. O porte da planta é reduzido, a maturidade fisiológica da planta 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 as do tipo lisas, o engrossamento pode ser generalizado ou visível somente em algumas folhas mais velhas da planta, de acordo com o estágio de infecção da muda (ZINK & GROGAN, 1954; KRAUSE-SAKATE et al., 2003). A perda de peso fresco é verificada quando a planta é infectada entre 5 e 7 semanas após o transplântio (LATHAN et al., 2004).

A doença ocorre em temperaturas abaixo de 20°C, típica de climas temperados. No Brasil os sintomas têm sido observados principalmente no inverno, com temperaturas diurnas variando de 18 a 22°C e temperaturas noturnas de 10 a 16°C (COLARICCIO et al., 2003). Navarro et al. (2004) verificaram presença de ambos os vírus em

amostras assintomáticas, indicando a necessidade de fatores abióticos para o desenvolvimento de sintomas.

Segundo Westerlund et al. (1978a) a expressão dos sintomas ocorre principalmente entre 14 e 18°C, sendo que a movimentação do vírus na planta é mais rápida entre 18 e 22°C. Segundo Walsh (1994) 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 de cloroplastos, como RNA, proteínas e enzimas pela plantas. Navarro et al. (2004) verificaram que a maior concentração do MLBVV e LBVaV ocorre em raízes e folhas mais velhas.

Ainda não há consenso sobre o agente causal da doença. Inicialmente o agente causal não foi encontrado devido à dificuldade de transmissão, e se presumiu que fosse um vírus presente em pequenas concentrações em tecidos específicos ou células especializadas, como células companheiras do floema ou cloroplastos, se descartando a hipótese de ser um viróide (WESTERLUND et al., 1978a). Posteriormente identificou-se um vírus denominado de *Lettuce big-vein virus*, renomeado a *Lettuce big-vein associated virus* (LBVaV) por Navarro et al. (2005) e que foi considerado o agente causal da doença (KUWATA et al., 1983), porém com o postulado de Koch não tendo sido concluído devido a dificuldade em se obter partículas virais purificadas (ROGGERO et al., 2000).

Recentemente um segundo vírus denominado de Mirafiori lettuce virus, renomeado de *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MLBVV) por Navarro et al. (2005) foi associado com a doença tendo sido capaz de induzir sozinho os sintomas da doença (ROGGERO et al., 2000; LOT et al., 2002). Contudo em experimentos realizados em campo aberto na Itália, os resultados não foram claros, uma vez que plantas exibindo sintomas de engrossamento encontravam-se somente infectadas pelo LBVaV. É possível que nestes casos discrepantes, o teste de ELISA não foi sensível o suficiente para detectar MLBVV em baixas concentrações, ou a doença foi causada por outro agente, ou até mesmo por alguns isolados de LBVaV em particular (ROGGERO et al., 2003).

A detecção dos vírus nas amostras de alface brasileiras estudadas até o momento foi realizada através de DAS-ELISA com anti-soro específico para ambos os vírus e microscopia eletrônica. Existe um anti-soro comercial vendido pela Loewe Phytodiagnostica

somente contra o MLBVV, impossibilitando a detecção de ambos os vírus. Atualmente estão disponíveis oligonucleotídeos específicos para ambos os vírus (ROSALES et al., 2003, 2004; NAVARRO et al., 2004) e testes moleculares como RT-PCR e hibridização Dot-Blot, tem sido eficazes e sensíveis no diagnóstico, detectando os vírus em amostras altamente diluídas (2^{-10} e 2^{-5}) (NAVARRO et al., 2004).

4.2 *Lettuce big-vein associated virus* (LBVaV)

O LBVaV possui partículas alongadas de aproximadamente 320 a 350 x 18 nm (KUWATA et al., 1983, VETTEN et al., 1987; HUIJBERTS et al., 1990).

Kuwata (1996) relatou que o LBVaV possui uma capa protéica com 48 kD e dois segmentos de RNA de dupla fita (dsRNA) de aproximadamente 7,0 kbp e 6,5 kbp. O LBVaV é sorologicamente relacionado com o *Tobacco stunt virus* (TStV) e é agrupado com ele baseado na morfologia, sorologia e relacionamento com o vetor (KUWATA & KUBO, 1986). Estes vírus foram classificados como membros do gênero *Varicosavirus* (MAYO, 2000). Recentemente análises da região codificadora da capa protéica do TStV revelaram que ele é uma estirpe do LBVaV, com diferenças em relação ao hospedeiro (SASAYA et al., 2005).

A caracterização molecular do LBVaV foi demorada devido à dificuldade de purificação viral. Após a obtenção da seqüência nucleotídica da capa protéica, foi verificado que na verdade o LBVaV é constituído por dois segmentos de RNA de fita simples negativo (ssRNA) que apresenta maior identidade com proteínas do nucleocapsídeo de membros da família *Rhabdoviridae* (SASAYA et al., 2001).

O RNA 1 consiste em 6797 nucleotídeos que codificam uma proteína relacionada com a L-polimerase de membros da família *Rhabdoviridae* e outra pequena região codante (ORF- open reading frame) com potencial para codificar uma proteína de 41 aminoácidos (Figura 1), sendo que outros rhabdovírus também possuem uma pequena ORF na mesma posição (SASAYA et al., 2002).

O RNA 2 (6081 nucleotídeos) possui cinco ORFs que codificam proteínas de 44, 36, 32, 19 e 41 kDa. A ORF 1, localizada logo após o terminal 3' codifica a capa protéica, sendo as demais de função desconhecida (Figura 1). A análise dos terminais 3' e 5' revelou semelhanças com outros rhabdovírus, como a complementariedade entre as

extremidades, e uma estratégia de iniciação e terminação/poliadenilação semelhante à dos rhabdovirus, apresentando transcritos monocistrônicos e capeados (SASAYA et al., 2004).

Várias evidências apontam que o LBVaV é mais relacionado à família *Rhabdoviridae*, ordem *Mononegavirales*. Contudo os rhabdovirus apresentam vírus envelopados e genoma não-segmentado o que leva a necessidade de reconsiderar a posição taxonômica de *Varicosavirus* (SASAYA et al., 2001; 2004; 2005). Em estudos de variabilidade genética com 16 isolados provenientes de diferentes regiões geográficas foi verificado que a região C' terminal da capa protéica é muito semelhante à da proteína N de rhabdovirus e altamente conservada entre os isolados (NAVARRO et al., 2005).

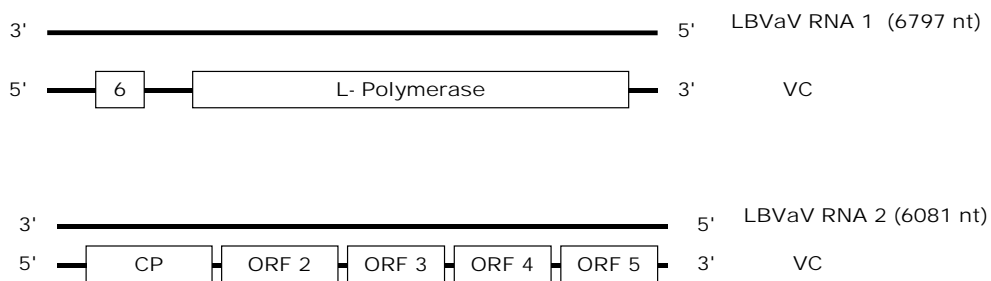


Figura 1. Representação esquemática da organização do genoma de LBVaV, indicando os dois componentes do genoma, e abaixo do genoma (VC) o RNA complementar com as ORFs representadas nos boxes. CP= Capa protéica. (Adaptado de SASAYA et al., 2004).

4.3 *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MLBVV)

O MLBVV foi identificado em 2000, em plantas de alface com sintomas de “big-vein” e provisoriamente denominado de Mirafiori lettuce virus (MiLV), por ter sido verificado pela primeira vez na região de Mirafiori da Itália. Ele possui uma proteína do capsídeo de 48 kDa e a sua visualização ao microscópio eletrônico é difícil, com partículas maiores e menores correspondentes às porções maiores e menores do genoma encapsidadas, semelhantes aos vírus do gênero *Ophiovirus* (ROGGERO et al., 2000). Posteriormente foi renomeado para *Mirafiori lettuce big-vein virus* (NAVARRO et al., 2005).

O vírus apresenta relacionamento sorológico com os ophiovirus *Tulip mild mottle mosaic virus* (TMMMV) e *Ranunculus white mottle virus* (RWMV), ponto

de inativação térmica de 50°C, densidade de 1,22 g/ml no gradiente de sulfato de céσιο (ROGGERO et al., 2000).

A organização genômica do MLBVV foi elucidada por Van der Wilk et al. (2002) que concluíram que ele é composto de quatro moléculas de RNA (Figura 2) ambissenso. O RNA 1 apresenta 7794 nucleotídeos e duas ORFs, codificando uma proteína de 263 kDa com homologia com a RNA polimerase dependente de RNA de RWMV e L-polimerase de rhabdovirus e uma proteína de 25kDa de função desconhecida. O RNA 2 apresenta 1788 nucleotídeos e duas ORFs com 10 e 55 kDa. O RNA 3 possui 1515 nucleotídeos e codifica a proteína capsidial com 48,5 kDa enquanto que o RNA 4 possui 1402 nucleotídeos e duas ORFs com 37 kDa e 10,6 kDa. As ORFs dos RNA 2 e 4 apresentam funções desconhecidas.

Paralelamente, Kawazu et al (2003) verificam que a seqüência nucleotídica da proteína capsidial do MLBVV (1514 nucleotídeos) é similar a do *Citrus psorosis virus* (CPsV), espécie-tipo do gênero *Ophiovirus*.

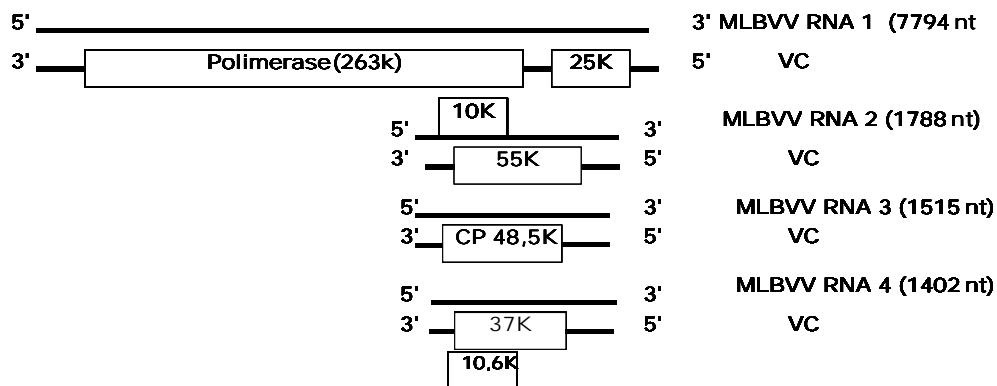


Figura 2. Representação esquemática da organização do genoma de MLBVV, indicando os quatro componentes do genoma, e abaixo do genoma (VC) o RNA complementar com as ORFs representadas nos boxes, CP= Capa protéica. (Adaptado de VAN DER WILK et al., 2002).

Navarro et al. (2005) estudando a variabilidade genética de 17 isolados de MLBVV provenientes de diferentes regiões geográficas concluíram que estes

formam dois subgrupos, sendo que o subgrupo B foi constituído por apenas três isolados espanhóis. Estes subgrupos apresentaram diferenças quanto a ausência ou não de sítios de restrição à enzima *RsaI* no gene codificador para a capa protéica, podendo ser diferenciados através de RFLP. O subgrupo A apresenta apenas um sítio de restrição na posição de 904 pares de bases e que gera dois fragmentos com 904 bp e 515 bp. Já o subgrupo B possui três sítios de restrição, nas posições 904 bp, 934 bp e 1021 bp, que geram quatro fragmentos de 904 bp, 30 bp, 87 bp e 398 bp. Os subgrupos não apresentaram diferenças quanto à agressividade ou sintomatologia, devendo possuir apenas efeitos nas características físicas das proteínas e não afetando suas funções essenciais.

4.4 Transmissão dos vírus

A transmissão de ambos LBVaV e do MLBVV é realizada pelo fungo de solo *Ospidium brassicae*, (LOT et al., 2002). O fungo pertence à divisão *Chytridiomycota*. O relacionamento entre vírus e vetor é do tipo “in vivo”, o qual envolve a aquisição do vírus pelo fungo dentro de um hospedeiro vivo antes que a parede celular das células do fungo esteja formada. Este mecanismo pode ocorrer após o vírus entrar no fungo, este se movimenta através do micélio e se aloja nos esporos de resistência (CAMPBELL, 1996; ROCHON et al., 2004). O mecanismo pelo qual o vírus penetra na célula das raízes do hospedeiro é desconhecido, sendo que estudos realizados com vetores do gênero *Plasmodiophora* sugerem um papel de regiões transmembranas da capa protéica facilitando o movimento do vírus através da membrana (ROCHON et al., 2004).

A transmissão pelo fungo se dá através de zoósporos lançados de esporângios, que aparentemente levam o vírus nos seus protoplastos e transmitem para raízes saudáveis (CAMPBELL, 1962, 1985, 1996). O lançamento ocorre somente quando a disponibilidade de água no solo é equivalente ao ponto de saturação. Os zoósporos mantêm a capacidade de movimentação no solo por até 24 horas e permanecem infectivos por até 48 horas após o lançamento, sendo que a capacidade de movimentação deles no solo é superior a de alguns fungos do gênero *Phytophthora* (WESTERLUND et al., 1978b).

Lin et al. (1970) comprovou que os esporângios do fungo podem se multiplicar em alface e os esporângios resultantes podem adquirir e transmitir o vírus de uma planta infectada para uma planta saudável. Os esporos de resistência do fungo podem permanecer

por mais de 20 anos no solo e reter a capacidade de transmitir a doença por mais de 15 anos, fazendo com que sua erradicação seja difícil, senão impossível (VAN DER WILK et al., 2002).

A germinação dos esporos de resistência ocorre sob condições de umidade no solo próximas ao ponto de saturação por aproximadamente seis dias, com a presença de raízes hospedeiras ou não. A germinação ocorre mais rapidamente a temperaturas entre 18 e 22°C, e o desenvolvimento do fungo no hospedeiro não é influenciado pela umidade do solo, a não ser que a planta chegue a murchar (WESTERLUND et al., 1978b).

Navarro et al. (2004) concluíram que o pico no número de esporos de resistência e zoósporos do fungo ocorre aos 30 dias após o transplântio da alface e coincide com o pico da concentração de LBVaV nas plantas.

O LBVaV é transmitido via extrato vegetal para *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii* e *N. occidentalis* (HUJBERTS, 1990). Lot et al. (2002) transmitiram este vírus mecanicamente para *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. occidentalis* e *C. quinoa*, porém com ocorrência de escape e baixa porcentagem de transmissão. A planta invasora *Sonchus oleraceus* foi encontrada infectada naturalmente com o LBVaV em plantações de alface no Estado de São Paulo (CHAVES et al., 2005).

O MLBVV é transmitido mecanicamente via extrato vegetal para *C. quinoa*, *N. benthamiana*, *N. tabacum* White Burley, *N. occidentalis* (ROGGERO et al., 2000), *N. clevelandii* (LOT et al., 2002) e *N. hesperis* (VAN DER WILK et al., 2002).

4.5 Controle

As medidas de controle existentes são adotadas principalmente em relação ao vetor, pois não existem cultivares imunes à doença, devendo ser adotado um manejo integrado envolvendo cultivares tolerantes e medidas culturais. Medidas visando a eliminação do vetor são ineficientes devido a capacidade de sobrevivência dos vírus em esporos de resistência. Além disso a fumigação do solo com brometo de metila é antieconômica e atualmente o produto está banido devido a problemas ambientais. As medidas culturais podem ser adotadas em relação ao controle da irrigação e da umidade do solo, hospedeiros alternativos, sanidade das mudas e a utilização de filme plástico no solo, que

diminui a umidade do solo e aumenta a temperatura, conseqüentemente diminuindo a atividade dos zoósporos (JONES, 2003; LATHAM & JONES, 2004).

A utilização de produtos químicos como carbendazem, propamocarb e thiabendazole pode aumentar a produção de alface em áreas com alta incidência da doença (FLETCHER et al., 2005). A rotação de culturas pode contribuir com a redução da fonte de inóculo.

O desenvolvimento de cultivares de alface resistentes ao MLBVV e LBVaV se iniciou com a identificação de resistência moderada na cultivar Merit, que foi utilizada como parental para as cultivares Sea Green, Thompson e Pacific (RYDER, 1981a; 1981b; 1991). As cultivares Sea Green e Pacific são comerciais, enquanto que a Thompson é utilizada como fonte de resistência (RYDER & ROBINSON, 1995). Porém, Bos & Huijberts (1990) concluíram que a resistência não era de uso prático, inclusive para a cultivar Pacific que não apresentou produção superior à cultivar suscetível. Imunidade ao MLBVV e LBVaV foi verificada em *Lactuca virosa* pelos mesmos autores.

Ryder & Robinson (1995) consideraram que a ausência de sintomas não necessariamente significa a resistência aos vírus, visto que são necessários fatores abióticos para expressão dos sintomas (WESTERLUND et al., 1978a; WALSH, 1994). A metodologia utilizada para os testes de resistência consiste no plantio das linhagens em solo contaminado com o vetor e a inoculação com raízes maceradas de plantas infectadas, que antecipam a expressão dos sintomas em duas ou três semanas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Coleta de amostras de alface e localização dos experimentos

Foram coletadas folhas velhas de alface, a partir de plantas próximas ao ponto de colheita, exibindo sintomas típicos de engrossamento das nervuras. Os locais de amostragem foram produtores comerciais situados nas regiões produtoras de Mogi das Cruzes, Campinas e Bauru, e a época de amostragem foi nos meses mais propícios para o surgimento da doença, durante o outono (abril/2005), inverno (junho/2004 e julho/2005) e início da primavera (setembro/2004), quando as temperaturas encontram-se mais amenas. Realizou-se também uma coleta no mês de dezembro de 2004, durante o verão, na região de Mogi das Cruzes, visando detectar a presença dos vírus em amostras assintomáticas (Tabela 1).

Após a coleta as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e levadas ao Laboratório de Virologia, localizado no Departamento de Produção Vegetal – Setor de Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP em Botucatu, onde se realizaram as análises laboratoriais e os experimentos. As amostras foram preservadas pelo método de dessecação, cortando as folhas com sintomas em tiras finas e colocando-as em frasco na presença de cloreto de cálcio anidro.

Tabela 1. Amostras coletadas, de acordo com o produtor, época e o tipo de alface.

Número de Plantas	Propriedade	Município	Época	Cultivar/Tipo
6	Kiomy Nakagawa	Campinas	jun/04	Vera (crespa)
9	Kiomy Nakagawa	Campinas	jun/04	Americana
13	Kiomy Nakagawa	Campinas	jun/04	Lídia (lisa)
1	Kiomy Nakagawa	Campinas	jun/04	Yuri (americana)
5	Kiomy Nakagawa	Campinas	jun/04	Feltrin (mimosa)
1	Neij Takeshita	Campinas	jun/04	Gisele
1	José Gonçalves	Campinas	jun/04	Mimosa
3	Ismael Mendonça	Campinas	jun/04	Elisa (lisa)
24	Seiti Sato	Bauru	jun/04	Elisa (lisa)
13	Seiti Sato	Bauru	jun/04	Americana (Lucybrown)
13	Seiti Sato	Bauru	jun/04	Mimosa
13	Luis Yano	Mogi das Cruzes	jun/04	Mimosa
13	Hiroshi Shitate	Biritiba-Mirim	jun/04	Verônica (Crespa)
5	Hiroshi Shitate	Biritiba-Mirim	jun/04	Americana
7	Edson Yamamoto	Biritiba-Mirim	jun/04	Verônica (Crespa)
8	Edson Yamamoto	Biritiba-Mirim	jun/04	Elisa (lisa)
10	Edson Yamamoto	Biritiba-Mirim	jun/04	Americana (Laurel)
5	Edson Yamamoto	Biritiba-Mirim	jun/04	Romana (Olsens Enke)
7	Neij Takeshita	Campinas	set/04	Americana (Lucybrown)
8	Kiomy Nakagawa	Campinas	set/04	Americana
1	Kiomy Nakagawa	Campinas	set/04	Lídia (lisa)
3	Kiomy Nakagawa	Campinas	set/04	Vera (Crespa)
7	Ismael Mendonça	Campinas	set/04	Americana (Lucybrown)
5	Eduardo Dávines	Campinas	set/04	Gisele
5	José Gonçalves	Campinas	set/04	Mimosa
3	Eduardo Dávines	Campinas	set/04	Elisa (lisa)
2	Eduardo Dávines	Campinas	set/04	Mimosa
1	Eduardo Dávines	Campinas	set/04	Vera
2	Eduardo Dávines	Campinas	set/04	Gisele
2	José Gonçalves	Campinas	set/04	
11	Seiti Sato	Bauru	set/04	Americana (Lucybrown)
4	Luis Yano	Mogi das Cruzes	set/04	Mimosa
4	Luis Yano	Mogi das Cruzes	set/04	Free Lice
8	Hiroshi Shitate	Biritiba-Mirim	set/04	Crespa (Verônica)
6	Edson Yamamoto	Biritiba-Mirim	set/04	Crespa (Verônica)
1	Edson Yamamoto	Biritiba-Mirim	set/04	Romana
5	Edson Yamamoto	Biritiba-Mirim	set/04	Mimosa
10	Edson Yamamoto	Biritiba-Mirim	dez/04	Americana
8	Hiroshi Shitate	Biritiba-Mirim	dez/04	Americana
5	Hiroshi Shitate	Biritiba-Mirim	abr/05	Americana
9	Edson Yamamoto	Biritiba-Mirim	abr/05	Americana
11	Seiti Sato	Bauru	jul/05	Lisa

Número de Plantas	Propriedade	Município	Época	Cultivar/Tipo
5	Seiti Sato	Bauru	jul/05	Americana
5	Seiti Sato	Bauru	jul/05	Mimosa
10	Luis Yano	Mogi das Cruzes	jul/05	Mimosa
7	Hiroshi Shitate	Biritiba-Mirim	jul/05	Crespa
7	Hiroshi Shitate	Biritiba-Mirim	jul/05	Lisa
10	Hiroshi Shitate	Biritiba-Mirim	jul/05	Americana
8	Edson Yamamoto	Biritiba-Mirim	jul/05	Americana
3	Edson Yamamoto	Biritiba-Mirim	jul/05	Romana
12	Edson Yamamoto	Biritiba-Mirim	jul/05	Crespa (Verônica)
2	Neij Takeshita	Campinas	jul/05	Crespa
2	Neij Takeshita	Campinas	jul/05	Lisa (Lídia)
6	Neij Takeshita	Campinas	jul/05	Mimosa
9	Neij Takeshita	Campinas	jul/05	Americana (Lucybrown)
4	Kiomy Nakagawa	Campinas	jul/05	Lisa (Lídia)
3	Kiomy Nakagawa	Campinas	jul/05	Mimosa
13	Kiomy Nakagawa	Campinas	jul/05	Americana (Lucybrown)

5.2 Extração de RNA Total

A extração do RNA total das amostras foi realizada de acordo com o método de Bertheau et al. (1998).

As amostras foram trituradas (1:5 p/v) em tampão PBS – Tween contendo PVP K25 a 2% (p/v) e Na- DIECA 20 mM. Posteriormente centrifugadas por 10 minutos a 13000 rpm em tubos de microcentrífuga a 4°C (Centrífuga Eppendorf 5804 R). Duzentos microlitros do sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo, acrescentando-se 20 µl de SDS 10%. Incubou-se a 55° C por 15 minutos em banho-maria e adicionou-se 100 µl de solução de acetato de potássio a 3 M, agitando-se bem. Seguiu-se incubação no gelo por 5 minutos e centrifugação por 5 minutos a 13000 rpm (4°C), transferindo-se o sobrenadante para um novo tubo. Adicionou-se 700 µl de NaI 6 M e 5 µl de uma solução contendo silício, previamente agitada para que o silício fosse ressuspensionado. Agitou-se bem e manteve-se a solução por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida a solução foi centrifugada por 1 minuto a 5000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o “pellet” duas vezes com 500 µl de solução de lavagem (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 1mM, NaCl 100mM e igual volume de etanol absoluto), seguida de centrifugação por 1 minuto a 5000 rpm para cada lavagem.

Posteriormente secou-se o “pellet” a vácuo (Speed Vaccum Eppendorf Concentrator 5301) e ressuspendeu-se o RNA em 400 µl de água Milli-Q tratada com DEPC, seguido de incubação por 5 minutos a 55°C em banho-maria. Seguiu-se centrifugação por 5 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante (300 µl) foi transferido para um novo tubo e armazenado a -20°C.

5.3 Detecção dos vírus por RT-PCR

Para a detecção de ambos os vírus foi utilizada a técnica de Transcrição Reversa e Reação de polimerização em cadeia (RT-PCR) e utilizados oligonucleotídeos (“primers”) específicos que amplificam parte da porção codificadora da proteína capsidial (ROSALES et al. 2003, 2004). Para o MLBVV utilizou-se os pares de “primers” MiLVV CP1 (5'CAAATCTGTCCACAATTCC 3') e MiLVVCP2 (5'TCTCACTTGAAAACCTTCC 3') que amplificam um fragmento de 562 pares de bases, MiLVV CP3 (5'TTGCAACGTGATGAAACC 3') e MiLVV CP4 (5'AAAGAAGAGAA GCCTGTTCC 3') que amplificam um fragmento de 743 pares de bases. Para a detecção de LBVV foram utilizados os pares de “primers” LBVV CP1 (5'AAGCTTTCGGTACTGTCC 3') e LBVV CP2 (5'CCTTGATACAGTTTTTGACC 3') que amplificam um fragmento de 485 pares de bases e LBVV CP3 (5'GTATGCTGATTTCTGTAGACC 3') e LBVV CP4 (5'TAGATGTTCTTCGCCACC 3') que amplificam um fragmento de 570 pares de bases.

A RT-PCR com os “primers” MiLVV CP1/CP2 foi efetuada em volume de 25 µl, utilizando-se 2,5 µl de tampão da enzima 10X (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3 e KCl 500 mM); 3,5mM de MgCl₂; 0,17% de Triton X-100; 1mM de cada oligonucleotídeo; 0,25 mM de dNTPs; 0,5 U de *Taq* DNA Polimerase; 0,75 U de transcriptase reversa do AMV (*Avian myeloblastosis virus*); 5 µl de RNA molde e quantidade suficiente de água DEPC para completar 25 µl. Para os demais pares de “primers” utilizou-se: 10µl de tampão da enzima 5x, 0,5 mM de cada primer, 0,5mM de dNTPs, 1,25 U de *Go Taq* DNA Polimerase (Promega), 0,75U de AMV, 5 µl de RNA molde e quantidade suficiente de água DEPC para completar 50 µl. A condição da RT-PCR foi realizada a 42°C por 30 minutos, desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 92°C por 30 segundos, 40 ciclos de anelamento a 50-54°C por 40 segundos, 40 ciclos de polimerização a 72°C por 40 segundos e

polimerização final a 72°C por 10 minutos. Para os “primers” MiLVV CP3/CP4 realizou-se 40 ciclos de anelamento a 50°C por 40 segundos e para os demais pares de “primers” realizou-se 40 ciclos de anelamento a 54°C.

O produto da RT-PCR (5 µl), juntamente com o marcador molecular 1kb Ladder (Invitrogen) foi visualizado em gel de agarose a 1%, em tampão TBE (0,1 M de ácido bórico; 0,02 mM EDTA pH 8,3) corado com 0,1µl/ml de Brometo de Etídio. Controles positivo, negativo e branco (reação de PCR com água substituindo o RNA molde) foram incluídos na extração e nas reações de PCR a fim de validar e confirmar a especificidade do método utilizado. Todas as amostras negativas, bem como as com presença de somente um dos vírus foi verificado duas vezes por RT-PCR para confirmação.

5.4 Preparo de Células Competentes de *Escherichia coli*

Para etapa de clonagem preparou-se células competentes de *E. coli* estirpe XL1 para serem eletroporadas com o plasmídeo contendo o inserto. Para isto foi preparada em meio SOB (sem Magnésio) uma pré-cultura de 5 ml de células de *E. coli* XL1 preservadas a -80°C. Esta pré-cultura foi deixada durante a noite a 37°C sob agitação constante. No dia posterior, a pré-cultura foi utilizada para inocular 500 ml de meio SOB-Mg e incubada a 37°C sob agitação até atingir a densidade ótica de 0.75OD₅₅₀. A suspensão foi coletada em frascos de centrífuga previamente resfriados e centrifugada a 2600 g por 15 minutos a 4°C. Em seguida o “pellet” foi ressuspensionado em glicerol 10% (gelado) e centrifugado novamente a 2600 g por 15 minutos a 4°C. Mais uma etapa de ressuspensão em glicerol 10% foi realizada e em seguida o excesso de líquido foi retirado dos tubos de centrífuga e o “pellet” ressuspensionado com algumas gotas de glicerol 10% e a OD₅₅₀ ajustada a 200-250 unidades/ml. Alíquotas de 80µl foram repartidas em tubos e armazenadas a -80°C até o momento de serem eletroporadas.

5.5 Clonagem e sequenciamento

Os fragmentos obtidos por RT-PCR de três isolados de MLBVV e quatro de LBVaV coletados em diferentes regiões (Campinas, Bauru e Mogi das Cruzes) (Tabela 2) foram clonados no vetor comercial pGEM-T Easy (Promega). Para isto, o produto de PCR foi purificado, utilizando-se os kits comerciais Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) e Concert Rapid Gel Extraction System (Invitrogen) que eliminam restos de oligonucleotídeos não incorporados e em seguida ligado ao vetor pGEM-T Easy durante uma noite a 4°C.

Após a etapa de ligação do fragmento ao vetor, este foi eletroporado em células competentes de *Escherichia coli* utilizando-se eletroporador BIO-RAD Micropulser. As células de *E. coli* eletroporadas foram plaqueadas em meio de cultura contendo ampicilina, e a presença de plasmídeos recombinantes analisada pela extração de plasmídeos pela técnica de lise alcalina.

A cultura de bactérias foi colocada para crescer durante uma noite a 37°C sob agitação constante em meio LB contendo ampicilina. Após o crescimento as bactérias foram colocadas em microtubos e precipitadas, centrifugando por 2 minutos a 13000 rpm em temperatura ambiente, sendo o sobrenadante descartado em seguida. Posteriormente foi adicionado 100 µl de solução Tris-HCl 1M pH 8,0, EDTA 0,5M pH 8,0, Glicose 1M, misturando-se até homogeneizar e mantendo-se por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 200 µl de solução NaOH 0,2N e SDS 1% e agitou-se 15 vezes por inversão, mantendo-se por 5 minutos no gelo. Após adicionou-se 150 µl de solução Acetato de Potássio 3M/5M pH 4,8, agitando-se 10 vezes por inversão e mantendo por 5 minutos no gelo. Seguiu-se uma centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4°C, transferindo-se o sobrenadante para novos microtubos. Adicionou-se 300 µl de isopropanol, misturando-se bem e centrifugando a 12000 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 µl de etanol 70% ao “pellet”, centrifugando-se por 1 minuto a 12000 g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” secado à vácuo. Após a secagem este foi ressuspenso em 20 µl de água ultrapura autoclavada contendo RNase.

Após a extração dos plasmídeos realizou-se digestão com enzima de restrição *Eco RI* e a presença ou ausência do inserto verificado através de eletroforese em gel de agarose a 0,9%.

Quando os produtos de PCR apresentaram uma banda nítida optou-se pelo sequenciamento direto, realizando-se um novo PCR com volume total de 100 µl, com mesmos reagentes e nas mesmas condições do item anterior, e a seguir purificação com kits comerciais descritos anteriormente. No caso dos plasmídeos recombinantes estes foram sequenciados com oligonucleotídeos universais (T7, SP6), cuja sequência está presente no vetor.

Tabela 2. Amostras selecionadas para o sequenciamento do gene que codifica a proteína capsidial.

Isolado	Vírus	Região	Produtor	Tipo/ cultivar	Ano de coleta
BR58	MLBVV	Bauru	Seiti Sato	Mimosa	2004
BR60	MLBVV	Campinas	Kiomy Nakagawa	Americana (Yuri)	2004
BR61	MLBVV	Mogi das Cruzes	Hiroshi Shintate	Americana (Lucy Brown)	2004
BR104	LBVaV	Campinas	Ismael Mendonça	Lisa (Elisa)	2004
BR105	LBVaV	Bauru	Seiti Sato	Lisa (Elisa)	2004
BR106	LBVaV	Mogi das Cruzes	Luis Yano	Mimosa	2004
BR107	LBVaV	Bauru	Seiti Sato	Americana	2005

5.6 Análise dos dados obtidos

As sequências obtidas a partir do plasmídeos recombinantes ou produtos de PCR foram analisadas utilizando-se os programas BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e CLUSTAL Interative W (THOMPSON et al., 1994). A sequência do LBVaV e MLBVV foi comparada com demais sequências disponíveis no GenBank. As análises filogenéticas e evolucionária foram realizadas com a versão 2.1 do programa Mega (www.megasoftware.net) (KUMAR et al., 2001). Para obtenção de ramos filogenéticos com informações sobre a origem evolutiva dos isolados utilizou-se sequências do gene codificador para a proteína capsidial de espécies de vírus diferentes, denominados “outgroups”. Para comparação com os isolados de LBVaV utilizou-se o *Northern cereal mosaic virus* (NCMV) e com os isolados de MLBVV o *Citrus psorosis virus* (CPsV).

5.7 Transmissão via extrato vegetal de isolados do LBVaV e MLBVV

Foram avaliadas a transmissão do LBVaV e MLBVV em hospedeiras pertencentes às famílias *Chenopodiaceae*: *Chenopodium quinoa* e *C. amaranthicolor*, *Asteraceae*: alface cultivar Trocadero, White Boston e *Sonchus oleraceus* e *Solanaceae*: *N. occidentalis*, *N. tabacum* TNN, *N. clevelandii*, *N. glutinosa* e *N. rustica*.

Foi utilizado um isolado de alface sintomática proveniente do campo com presença de infecção mista para o LBVaV e MLBVV, sendo as folhas maceradas (1:3 p/v) em almofariz com tampão de inoculação fosfato de sódio pH 8,3 0,03M contendo 0,2% de Na-DIECA e carvão ativado a 100mg/ml (LOT et al., 2002). A inoculação dos diferentes hospedeiros foi feita através da fricção das folhas previamente polvilhadas com abrasivo carborundum 600 mesh.

Foram inoculadas 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 e 10°C durante a noite, com 11 horas de fotoperíodo de luz artificial). As plantas foram mantidas durante três meses, com medição diária de temperatura na casa de vegetação.

5.8 Transmissão através de solo de área com histórico da doença

Foram plantadas *C. quinoa*, *C. amaranthicolor*, alface cultivar Trocadero, White Boston e *N. clevelandii* em solo coletado de duas propriedades da região de Mogi das Cruzes com histórico da doença. Duas plantas de cada espécie foram mantidas em um vaso durante 4 meses na B.O.D. nas condições especificadas no item 5.7. Um segundo experimento foi realizado com plantio de alface cv. White Boston, Trocadero, Elisa e Feltrin (tipo Americana) não é Lucybrown que voce usou ou Ryder?em solo de três propriedades da região de Mogi das Cruzes com histórico da doença, plantando-se três plantas por vaso, nas mesmas condições do experimento anterior, sendo mantidas durante três meses.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Levantamento da ocorrência de “Big-vein”

Foram encontrados sintomas de engrossamento das nervuras nas cultivares do tipo crespa, lisa, americana, mimosa e romana provenientes das três regiões analisadas, coletadas nos meses de outono, inverno e primavera (Figura 3). Os oligonucleotídeos utilizados na diagnose do MLBVV e LBVaV foram altamente eficientes na detecção dos mesmos. Os pares de “primers” MiLVV CP1/CP2 e LBVV CP1/CP2 foram mais sensíveis e utilizados para o diagnóstico de rotina, gerando um fragmento de 562 pares de bases (bp) para o MLBVV e 485bp para o LBVaV (Figura 4). Os pares de “primers” MiLVV CP3/CP4 e LBVV CP3/CP4 amplificaram um fragmento de 743bp e 570bp respectivamente (Figura 5) e foram utilizados juntamente com os demais para o sequenciamento de toda a região codificadora para a proteína capsidial.

Em todas as regiões produtoras amostradas foi verificada a presença de ambos os vírus associados com a doença, independente da época de coleta (Tabela 3). Em 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 do MLBVV nas regiões de Campinas e Bauru, principalmente para a época de inverno de 2004 e do LBVaV coletado na região de Mogi das Cruzes, principalmente na primavera de 2004 e outono de 2005 (Figura 6). Nas amostras em que o resultado foi negativo, pode ter ocorrido uma baixa concentração viral, infecção tardia ou distribuição

irregular de vírus na planta, principalmente devido a maior concentração dos vírus estar em raízes e folhas mais velhas (NAVARRO et al., 2004).

**a****b**



Figura 3. Sintomas de big-vein em alface tipo mimosa (a), romana (b), americana (c), lisa (d) e crespa (e).

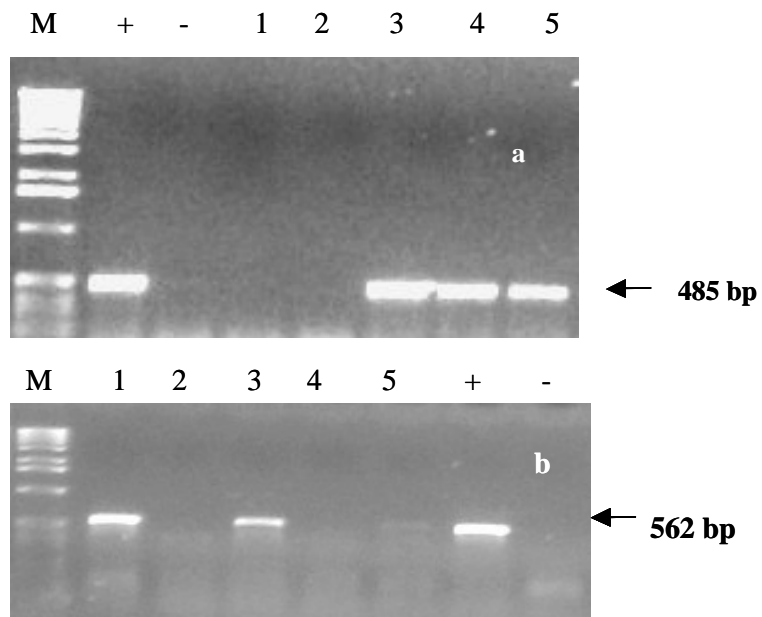


Figura 4. Padrão eletroforético obtido pelos oligonucleotídeos em RT-PCR (a- LBBV CP1/CP2 b- MiLVV CP1/CP2). M- Marcador de peso molecular; + controle positivo; - controle negativo. 1- 5 amostras de alface.

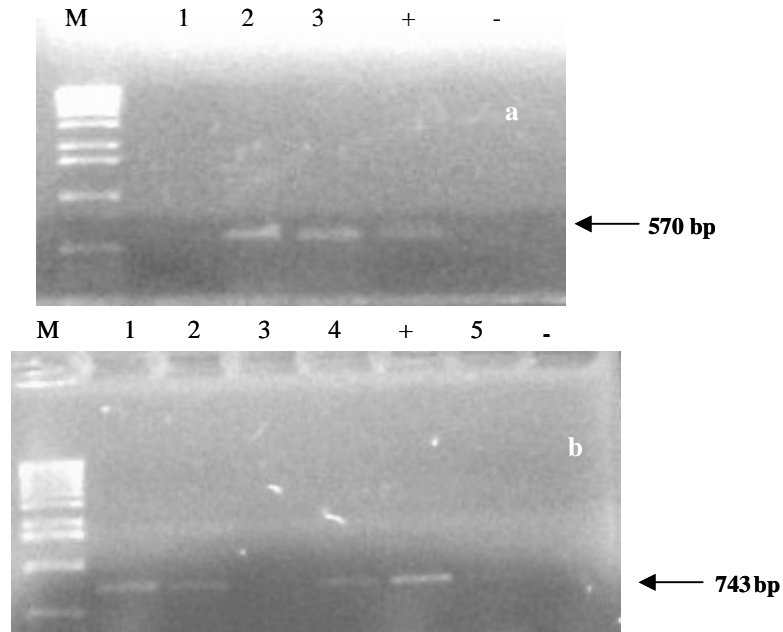


Figura 5. Padrão eletroforético obtido pelos oligonucleotídeos em RT-PCR (a- LBVV CP3/CP4 b- MiLVV CP3/CP4). M- Marcador de peso molecular; + controle positivo; - controle negativo. 1- 5 amostras de alface.

Tabela 3. Detecção através de RT-PCR dos vírus MLBVV e LBVaV em plantas de alface sintomáticas em diferentes regiões produtoras do Estado de São Paulo nos anos de 2004 e 2005.

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

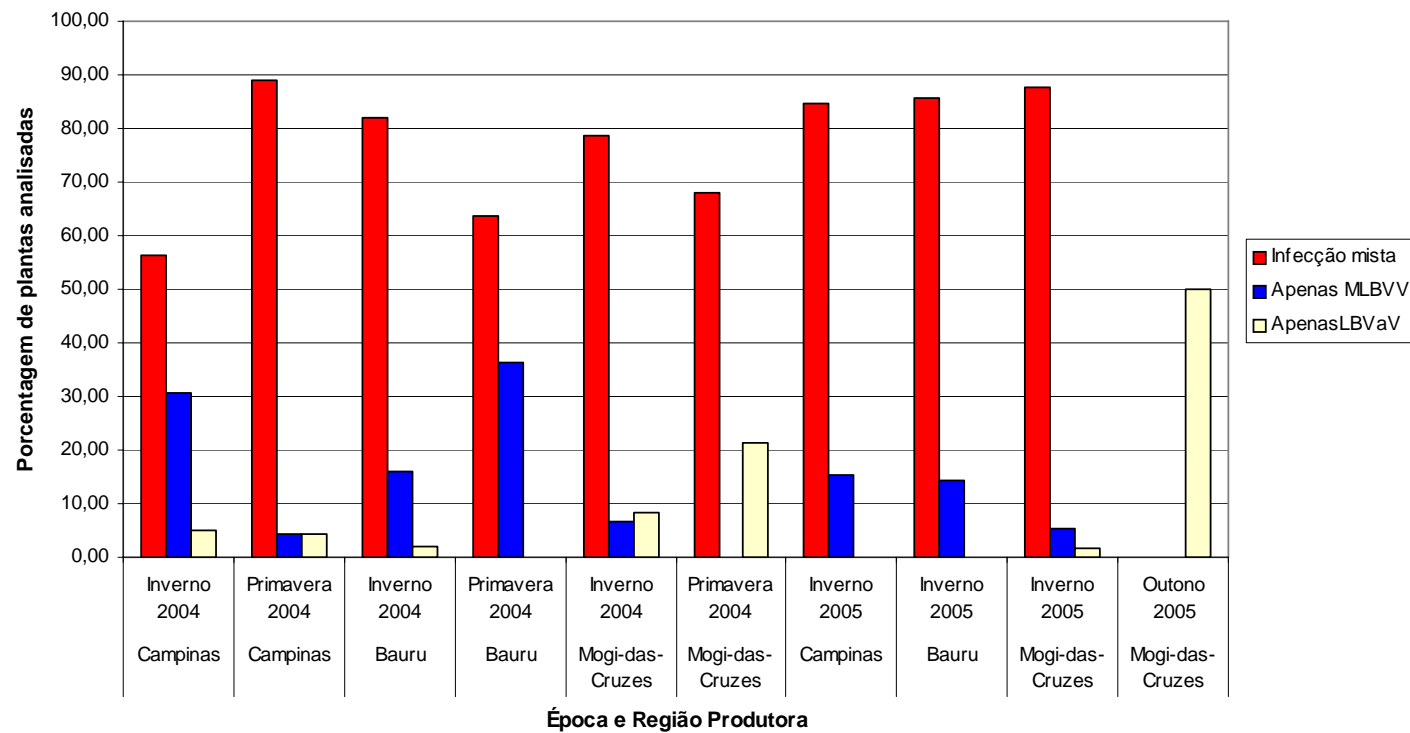


Figura 6. Porcentagem de plantas com infecção mista por LBVaV e MLBVV, ou somente com um dos vírus coletadas em diferentes épocas e regiões produtoras de alface do Estado de São Paulo nos anos de 2004 e 2005.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que ambos os vírus LBVaV e MLBVV encontram-se disseminados em três regiões produtoras do Estado de São Paulo, incluindo os cinturões verdes de Mogi das Cruzes, Campinas e em Bauru. Os vírus foram encontrados causando sintomas da doença somente nas épocas mais frias (outono, 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. Em trabalhos de detecção realizados na França e Itália (LOT et al., 2002; ROGGERO et al., 2003) respectivamente, utilizando como método de diagnóstico o teste de ELISA, os autores verificaram que existe a associação entre os dois vírus na maior parte das plantas sintomáticas analisadas, como foi verificado neste trabalho.

Lot et al. (2002) observaram que nas 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 (ROGGERO et al., 2003) e em campo aberto na Espanha (NAVARRO et al., 2004). Contudo, Roggero et al. (2003) 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 do MLBVV. Os mesmos autores verificaram que apesar da associação de sintomas de “big-vein” com o MLBVV, ao final do ciclo da cultura todas as plantas analisadas 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. (2003) 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 este com sensibilidade muito superior ao do ELISA, que na maioria dos casos existe a associação dos dois vírus, porém plantas sintomáticas apresentaram infecção isolada do MLBVV ou LBVaV no campo. A detecção de ambos os vírus em plantas de alface assintomáticas no campo, foi relatada na Espanha por Navarro et al. (2004). Segundo estes, os vírus ocorrem em maior concentração nas raízes e folhas mais velhas e os sintomas se iniciam

somente 40-50 dias após o transplântio, coincidindo com o pico de produção de esporos do vetor *Olpidium brassicae*.

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 e 6 plantas (33,3%) das 18 plantas foram negativas para ambos os vírus. Como as plantas foram colhidas ao acaso, resultados negativos eram esperados.

Mesmo durante o verão ambos os vírus infectam plantas em áreas com alta incidência da doença 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 os vírus. Segundo Walsh (1994) 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, possivelmente devido à redução da produção de componentes celulares pelas plantas e maior suscetibilidade aos vírus. Maekawa et al. (2004) encontraram alface com infecção sistêmica de LBVaV à 27° C, enquanto que o MLBVV não infectou alface nesta temperatura. O mesmo pode ter ocorrido com as amostras coletadas em Mogi das Cruzes no outono, que apresentaram apenas LBVaV, visto que a temperatura ainda se encontrava alta na época da coleta.

6.2. Sequenciamento

O gene que codifica a proteína capsidial de três isolados de MLBVV e quatro isolados de LBVaV foi seqüenciado. A seqüência completa deste gene (860 pares de bases para o LBVaV) foi obtida através da junção das seqüências obtidas com os pares de “primers” LBVV CP1/CP2 e LBVV CP3/CP4. Para o MLBVV se obteve uma seqüência de 1210 pares de bases através da junção das seqüências obtidas com os pares de “primers” MiLBVV CP1/CP2 e MiLBVV CP3/CP4. As seqüências de aminoácidos foram então comparadas com 19 seqüências de MLBVV e 22 seqüências de LBVaV (Tabela 4) disponíveis no GenBank. Como “outgroup” foi utilizada a seqüência do vírus *Northern cereal mosaic*

virus, NCMV (número de acesso: AB030277) para os isolados de LBVaV e do vírus *Citrus psorosis virus*, CPsV (numero de acesso: AF036338) para os isolados de MLBVV (Tabelas 5 e 6 respectivamente). Uma árvore filogenética com a identidade de aminoácidos foi preparada para o MLBVV (Figura 7) e LBVaV (Figura 8).

Tabela 4. Lista de isolados de MLBVV e LBVaV utilizados para análise filogenética. A origem geográfica e número de acesso no GenBank do gene codificador para a capa protéica estão indicados.

Vírus	Isolado	Localidade	Número de Acesso
MLBVV	JAP 01	Japão	BD418581
MLBVV	HOL 01	Holanda	AF525935
MLBVV	HOL 02	Holanda	AY581693
MLBVV	ESP 01	Murcia, Espanha	AY366415
MLBVV	ESP 02	Galicia, Espanha	AY366416
MLBVV	ESP 03	Pulpi, Espanha	AY366417
MLBVV	ESP 04	Pulpi, Espanha	AY366418
MLBVV	ESP 05	Pulpi, Espanha	AY581700
MLBVV	ESP 06	Pulpi, Espanha	AY581701
MLBVV	ESP 07	Pulpi, Espanha	AY581702
MLBVV	ESP 08	Espanha	AY839626
MLBVV	AUS 01	Australia	AY581696
MLBVV	DEN 01	Dinamarca	AY581692
MLBVV	UK 01	Wellesbourne, Inglaterra	AY581694
MLBVV	GER 01	Fischenich, Alemanha	AY581695
MLBVV	GER 02	Stuttgart, Alemanha	AY581697
MLBVV	GER 03	Frankfurt, Alemanha	AY581698
MLBVV	ITA 01	Itália	AY581699
MLBVV	CH 01	Chile	-
LBVaV	ESP 09	Aguilas, Espanha	AY581691
LBVaV	ESP 10	Granada, Espanha	AY581689
LBVaV	ESP 11	Pulpi, Espanha	AY581687
LBVaV	ESP 12	Pulpi, Espanha	AY581688
LBVaV	ESP 13	Murcia, Espanha	AY366411
LBVaV	ESP 14	Pulpi, Espanha	AY366413
LBVaV	ESP 15	Pulpi, Espanha	AY581684
LBVaV	ESP 16	Pulpi, Espanha	AY581685
LBVaV	ESP 17	Pulpi, Espanha	AY366414
LBVaV	ESP 18	Pulpi, Espanha	AY581686
LBVaV	ESP 19	Galicia, Espanha	AY366412
LBVaV	ESP 20	Espanha	AY839618
LBVaV	CH 02	Chile	-
LBVaV	UK 02	Inglaterra	AY581690
LBVaV	UK 03	Inglaterra	AY496054
LBVaV	USA 01	California, E.U.A.	AY496053
LBVaV	JAP 02	Japão	AB190528
LBVaV	JAP 03	Japão	AB190527
LBVaV	JAP 04	Japão	AB190526
LBVaV	JAP 05	Kagawa, Japão	AB050272
LBVaV	HOL 03	Holanda	AY496056
LBVaV	AUS 02	Australia	AY496055

Tabela 6. Porcentagem de identidade da seqüência de aminoácidos (diagonal inferior) e de nucleotídeos (diagonal superior) de parte do gene codificador para a capa proteica entre isolados brasileiros de MLBVV (BR58, BR60, BR61) e demais isolados. Outgroup CPsV (AF036338).

Isolado	B R 5 8	B R 6 0	B R 6 1	C H 0 1	H O L 0	A U S 1	G E R 1	D E N 1	U K 1	H O L 2	J A P 1	G E R 2	E S P 2	E S P 5	E S P 7	G E R 3	I T A 1	E S P 4	E S P 3	E S P 6	E S P 7	E S P 8	E S P 08	C P s V
BR58	-	98	99	98	96	96	96	95	96	95	96	95	95	97	96	96	96	97	87	87	87	87	87	23
BR60	97	-	98	98	96	96	96	95	96	95	96	95	95	97	96	96	96	96	87	87	87	87	87	23
BR61	98	98	-	98	96	96	95	95	95	95	96	95	95	97	96	96	96	97	87	87	87	87	87	23
CH 01	95	95	96	-	97	96	96	96	96	96	96	95	97	97	96	96	97	87	87	87	87	87	87	23
HOL 01	97	98	98	95	-	99	99	99	99	99	99	98	96	97	96	96	96	97	88	88	88	88	88	34
AUS 01	97	98	98	95	100	-	98	98	98	98	99	98	96	96	96	96	96	97	88	88	87	87	87	33
GER 01	96	96	97	93	98	98	-	99	98	98	99	98	95	96	95	96	96	97	87	87	87	87	87	33
DEN 01	96	96	97	94	98	98	97	-	99	98	98	97	95	96	95	96	95	97	88	88	87	87	87	33
UK 01	96	96	97	94	98	98	98	98	-	98	99	98	95	96	96	96	96	97	88	88	87	87	87	33
HOL 02	96	97	97	94	99	99	97	98	98	-	98	97	95	96	95	96	95	96	87	87	87	87	87	33
JAP 01	97	98	98	95	100	100	98	98	98	99	-	98	96	96	96	96	96	97	88	88	88	88	88	34
GER 02	96	97	97	94	98	98	97	97	97	98	98	-	95	96	95	96	96	96	87	87	87	87	87	17
ESP 01	96	96	96	93	98	98	96	96	97	97	98	97	-	96	95	95	95	96	87	86	86	86	86	31
ESP 02	98	98	98	95	99	99	97	97	98	98	99	98	97	-	98	97	97	97	87	87	87	87	87	30
ESP 05	96	96	96	93	97	97	95	95	96	96	97	96	95	97	-	97	96	97	87	87	86	86	86	30
GER 03	97	97	98	94	98	98	96	96	97	97	98	97	96	98	97	-	99	97	87	87	87	87	87	33
ITA 01	97	97	98	94	98	98	97	96	97	97	98	97	96	98	97	98	-	97	87	87	87	87	87	23
ESP 04	97	97	98	94	98	98	97	97	97	98	98	97	97	98	96	97	97	-	88	87	87	87	87	34
ESP 03	94	94	94	91	95	95	94	94	94	94	95	94	94	95	93	94	94	95	-	99	98	98	98	34
ESP 06	94	94	95	91	96	96	94	94	95	95	96	94	94	95	93	94	94	95	99	-	98	98	98	34
ESP 07	94	95	95	92	96	96	95	95	95	95	96	95	94	96	94	95	95	96	99	99	-	100	36	
ESP 08	94	95	95	92	96	96	95	95	95	95	96	95	94	96	94	95	95	96	99	99	100	-	36	
CPsV	34	33	34	32	34	34	33	34	33	34	34	34	34	34	32	34	34	34	33	33	33	33	33	-

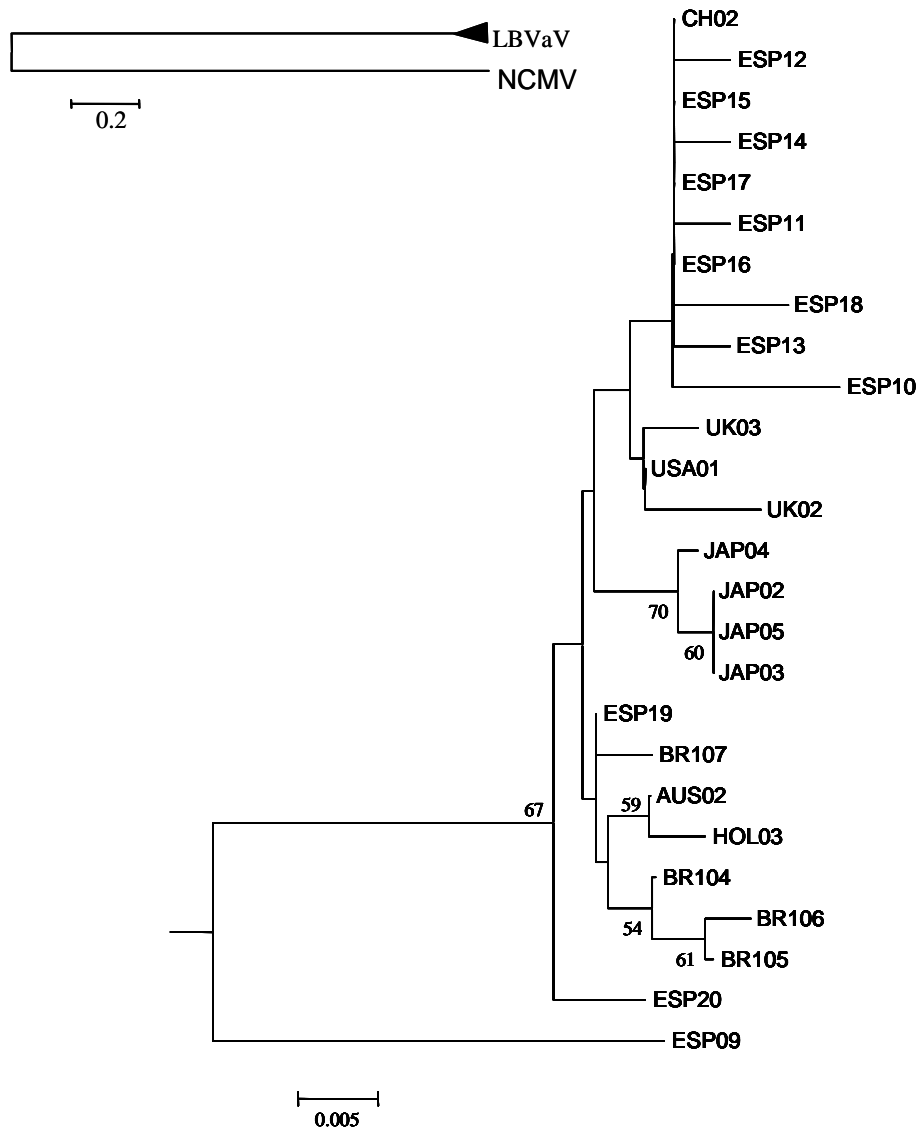


Figura 7. Análise filogenética entre isolados de LBVaV construída com aminoácidos de parte do gene codificador para a capa protéica. Valor de bootstrap 2000 e outgroup *Northern cereal mosaic virus* (NCMV, AB030277). Método Neighbor-Joining.

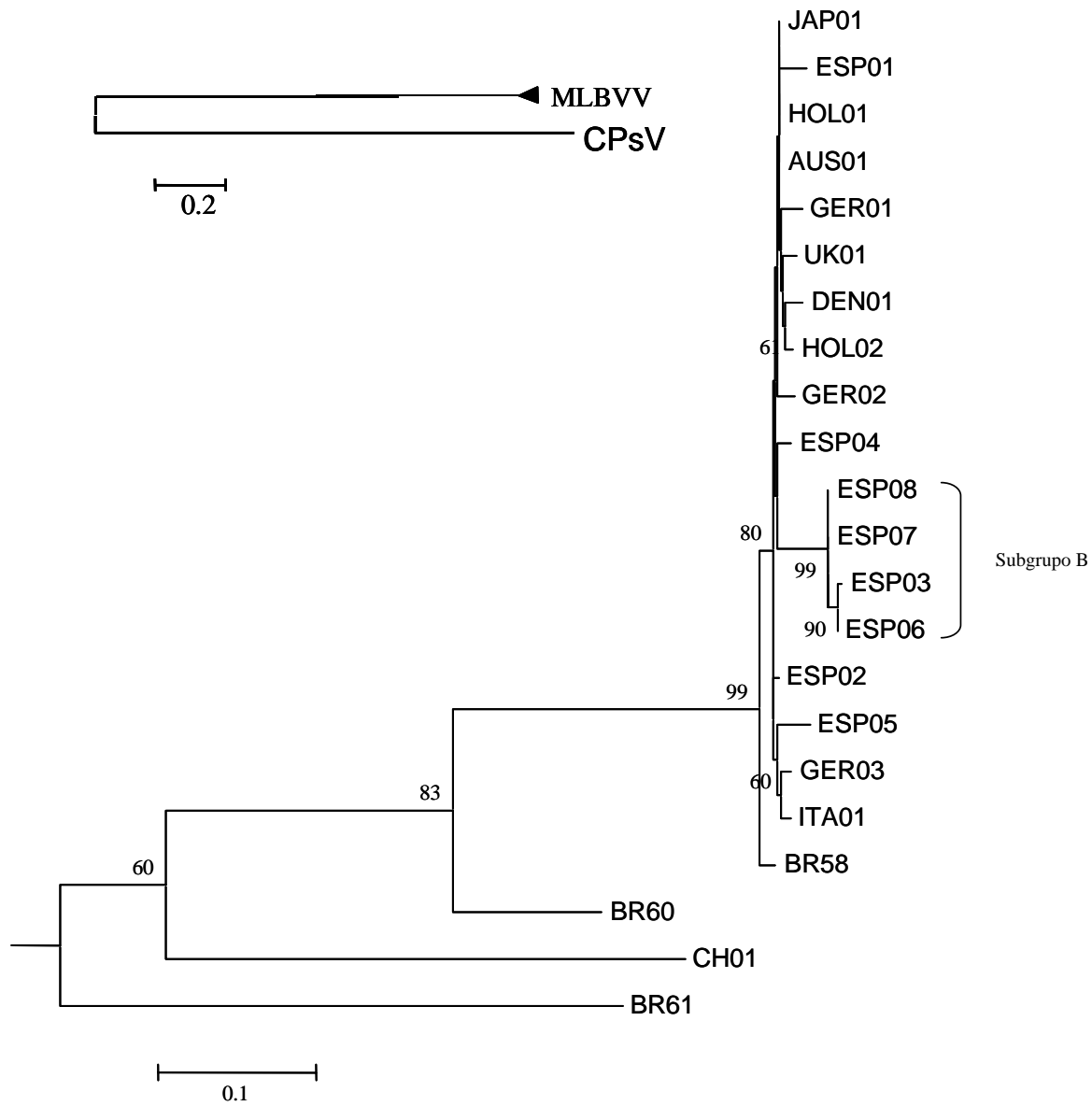


Figura 8. Análise filogenética entre isolados de MLBVV construída com aminoácidos de parte do gene codificador para a capa protéica. Valor de bootstrap 2000 e outgroup *Citrus psorosis virus* (CPsV, AF036338). Método Neighbor-Joining

A análise das seqüências de aminoácidos de MLBVV mostrou que os isolados brasileiros apresentaram identidade acima de 93% com outros isolados de MLBVV. Identidade inferior a 94% foi verificada com os isolados ESP 03, 06, 07 e 08 e que segundo Navarro et al. (2005) pertencem ao subgrupo B baseado no sítio de clivagem *Rsa* I localizado no gene que codifica a capa protéica. Deste modo, analisando-se a árvore filogenética (figura 8), e também verificando a carta de restrição enzimática do fragmento dos isolados brasileiros através do programa WEB Cutter, pode-se concluir que os isolados brasileiros pertencem ao subgrupo A, com somente um sítio de restrição à enzima *Rsa*I. Não existem diferenças quanto à agressividade entre os isolados pertencentes aos diferentes subgrupos.

Entre os isolados de LBVaV analisados foi verificada baixa variabilidade genética com identidades de aminoácidos superiores a 94%. Não há correlação entre a variabilidade observada e a possível origem geográfica dos mesmos, indicando que estes isolados devem possuir uma origem comum. Isto pode sugerir que a pressão de seleção para preservar funções biológicas particulares é maior do que para adaptação a áreas geográficas específicas, tendo sido comprovado pelo trabalho de Navarro et al. (2005), que calculando a taxa de substituições nucleotídicas não-sinônimas pelas substituições sinônimas (dN/dS), ou seja, as substituições que resultaram em aminoácidos diferentes pelas que não resultaram em aminoácidos diferentes em relação a seqüência consenso, obtiveram valores menores que 1. Segundo Nei & Kumar (2000) valores de dN/dS acima de 1 sugerem que as mudanças de aminoácidos conferem alguma vantagem e indicam seleção positiva, enquanto taxas menores que 1 indicam desvantagens funcionais resultantes da mudança e seleção negativa. As taxas encontradas para o LBVaV foram menores do que para o MLBVV e indicam uma pressão negativa para mudanças nesta região do genoma, sendo semelhante à de outros vírus.

Os dados dos isolados brasileiros confirmam estas hipóteses, já que se encontrou alta identidade e baixa diversidade genética entre isolados de LBVaV. Maior variabilidade foi observada para o MLBVV, onde o subgrupo B de MLBVV foi constituído somente por isolados espanhóis (ESP 03, ESP 06, ESP 07 , ESP 08), sugerindo que estes isolados estão restritos à Espanha. O isolado ESP 08 proveniente de *Sonchus oleraceus*, que não havia sido analisado por Navarro et al. (2005) também pertence a este subgrupo.

6.3. Caracterização Biológica

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 de luz artificial, ambos os vírus foram transmitidos mecanicamente, através de extrato de folhas, porém ocorrendo escape 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 infecções confirmadas por RT-PCR. Todas as plantas foram assintomáticas, com exceção de *C. quinoa* que reagiu com sintomas de lesão local nas folhas. 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 a máxima de 30°C, sendo a média superior de 26,5°C e temperatura mínima de 9°C com média inferior de 14,5°C.

No plantio em solo com histórico da doença, ambos os vírus foram transmitidos para alface, sendo que o MLBVV foi 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 9), sendo que no mesmo vaso uma segunda planta não foi infectada pelos vírus, caracterizando escape mesmo em solo provavelmente infestado proveniente de um mesmo vaso. No segundo experimento realizado em 2005, 28,1% (9) das plantas foram infectadas pelo LBVaV e 78,1% (25) foram infectadas pelo MLBVV, sendo que 25% (8) apresentaram infecção mista. Porém apenas três plantas apresentaram sintomas após três meses e entre estas, duas com infecção mista e uma infectada apenas por MLBVV.



Figura 9. Alface cv. White Boston cultivada em solo com histórico da doença. Planta à direita exibindo sintomas de engrossamento das nervuras e planta à esquerda sem sintomas.

Lot et al. (2002) obtiveram transmissão mecânica dos dois vírus para diversos hospedeiros, como alface, *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. occidentalis* e *C. quinoa*, porém também com baixa porcentagem de transmissão. Foi observada infecção sistêmica nestas três espécies de *Nicotiana* e alface, e lesões locais em *C. quinoa*, sendo que a alface infectada com o LBVaV permaneceu assintomática. Também transmitiram a doença para alface através do fungo infectado com o MLBVV, sendo que este infectado somente com LBVaV não causou sintomas de engrossamento das nervuras nas plantas. Verbeek et al. (2001) transmitiram mecanicamente MLBVV de *Chenopodium quinoa* e *Nicotiana benthamiana* para alface, sendo que somente algumas plantas desenvolveram a doença.

Os dados referentes à transmissão através de solo comprovaram que o solo proveniente de Mogi das Cruzes estava provavelmente contaminado com o vetor *Olpidium brassicae* e este por sua vez infectado pelo MLBVV e LBVaV. Além disto foi verificada a complexidade de se transmitir o vírus em condições de laboratório utilizando a inoculação via extrato vegetal, bem como o seu vetor, dificultando trabalhos visando a

obtenção de plantas resistentes ao MLBVV e ao LBVaV. Outro problema encontrado além da transmissão foi a visualização de sintomas da doença, uma vez que a planta pode estar infectada pelos vírus e não expressar os sintomas.

6.4. Considerações Gerais

Este trabalho, pioneiro na análise de grande quantidade de amostras sintomáticas para o “big-vein”, permitiu concluir que em grande parte das amostras ambos os vírus estão envolvidos na etiologia da doença. A detecção molecular através de RT-PCR se mostrou uma ferramenta sensível, precisa e segura na detecção e realização deste estudo, uma vez que os sintomas não permitem 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, pois permitem a fácil locomoção dos zoóporos (esporos flagelados) que transmitem o vírus de uma planta a outra, e o roguing (LATHAM & JONES, 2004). Cultivares resistentes ainda não estão presentes no mercado e devem ser incentivadas a serem obtidas, porém levando-se em conta a utilização de um bom sistema de triagem devido a alta taxa de escape mesmo utilizando-se solo com *O. brassicae* e este infectado pelo MLBVV e LBVaV.

7. CONCLUSÕES

- 1) Os vírus estão disseminados nas regiões produtoras de Bauru, Campinas e Mogi das Cruzes, tendo sido verificados durante todo o ano;
- 2) O diagnóstico molecular através de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos foi eficiente na identificação do MLBVV e LBVaV em alface;
- 3) A maioria das amostras analisadas encontrava-se com infecção mista de MLBVV e LBVaV, porém foram verificadas plantas com sintomas de engrossamento das nervuras infectadas com somente um dos vírus;
- 4) Ambos os vírus foram transmitidos para alface através de solo proveniente de áreas com histórico da doença e através de inoculação com extrato vegetal tamponado, porém com ocorrência de escape e baixas porcentagens de infecção;
- 5) Os isolados brasileiros de MLBVV pertencem ao subgrupo A segundo classificação de Navarro et al. (2005);
- 6) Os isolados de LBVaV de diferentes regiões geográficas apresentam menor variabilidade na porção codificadora para a proteína capsial, quando comparados aos isolados de MLBVV.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROSO,G.M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, v.3. Viçosa, UFV. Imprensa Universitária, 1986. 326p.

BERTHEAU, Y.D. et al. DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). In: PEROMBELON, M.C.M.; VAN DER WOLFF, J.M. **Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potatoes**. Scottish Crop Research Institute Occasional Publication. 1998.

BOS, L.; HUIJBERTS,N. Screening for resistance to big-vein disease of lettuce. **Crop Protection**, Surrey, v.9, p. 446-452. 1990.

CAMPBELL, R.N. Relationship between the lettuce big-vein virus and its vector, *Oplidium brassicae*. **Nature**. Londres, v.195, p.675-677, 1962.

CAMPBELL, R.N. Longevity of *Oplidium brassicae* in air-dry soil and the persistence of the lettuce big-vein agent. **Canadian Journal of Botany**. Ottawa, v.63, p. 2288-2289, 1985.

CAMPBELL, R.N. Fungal transmission of plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto, v. 34. p.87-108, 1996.

CHAVES, A.L.R. et al. Espécies da vegetação espontânea como reservatórios de fitovírus. IN: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, XXVIII. São Paulo, 2005.

Summa Phytopathologica. Botucatu, v.31, supl., p.50, 2005 (Resumo).

COLARICCIO, A. et al. Presence of lettuce big-vein disease and associated viruses in a subtropical area of Brazil. **Plant Pathology**. V.52, p.792. 2003.

COLARICCIO, A. et al. Detection of Varicosavirus and Ophiovirus in lettuce associated with lettuce big-vein symptoms in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, n.4, p.416-419.2005.

FILGUEIRA, F.A.R. Asteráceas – alface e outras hortaliças herbáceas. In: FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de Olericultura – Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, p.289-295, 2000.

FLETCHER, J.D.; FRANCE, C.M.; BUTLER, R.C. Virus surveys of lettuce crops and management of lettuce big-vein disease in New Zealand. **New Zealand Plant Protection**, v.58, p.239-244, 2005.

HEYWOOD, V.H. & HARBONE, J.B. **An overture to the Compositae**. v.1, p.2-20, 1977.

HUIJBERTS, N.; BLYSTAD, D.R.; BOS, L. Lettuce big-vein virus: Mechanical transmission and relationships to tobacco stunt virus. **Annals of Applied Biology**. Warwickshire, v. 116, p. 463-475, 1990.

JAGGER, I.C.; CHANDLER, N. Big Vein, a disease of lettuce. **Phytopathology**. St. Paul, v. 24, p.1253- 1256, 1934.

JONES, R.A.C. Using epidemiological information to develop effective integrated virus disease management strategies. **Virus Research**, v.100, p.5-30, 2003.

KAWAZU, Y. et al. Nucleotide sequence of the coat protein gene of Mirafiori lettuce virus. **Journal of General Plant Pathology**. Tokio, v.69, p.55-60. 2003.

KRAUSE-SAKATE, R. et al. O “big vein” ataca. **Cultivar HF**. p.13, 2003.

KUMAR, S. et al. Molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics**, v.17, p. 1244-1245, 2001.

KUWATA, S. et al.. Rod-shaped particles, a probable entity of lettuce big vein virus. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**. v.49, p.246-251. 1983.

KUWATA, S. & KUBO, S. Tobacco stunt virus. **AAB Descriptions of Plant Viruses**, n.313. 1986.

KUWATA, S. Lettuce big-vein varicosavirus. In: BRUNT, A.A. et al. **Viruses of plants**, Wallingford, CAB International, p. 715-717, 1996.

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. et al. Ocorrência de Varicosavirus e Ophiovirus associados ao espessamento clorótico das nervuras da alface no Estado do Paraná. IN: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, XXVII. Campinas, 2004. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v. 30, n.1, 2004. (Resumo).

- LIN, M.T. et al. Lettuce Big-vein Virus Transmission by Single-Sporangium Isolates of *Olpidium brassicae*. **Phytopathology**. St. Paul, v. 60, p.1630-1634, 1970.
- LOT, H. et al. 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. et al. 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**. v.70, p.320-322. 2004.
- MAYO, M.A. Genus *Varicosavirus*. In: VAN REGENMORTEL et al. **Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, p.521-523. San Diego, Academic Press, 2000.
- NAVARRO, J.A. et al. 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. et al. 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.
- NEI, M. & KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics**. Oxford University Press, New York. 2000.
- REZENDE, J.A.M. & CUPERTINO, E.P. Doenças em hortaliças. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.184, p.18-27, 1995.
- ROCHON, D. et al. Molecular aspects of plant virus transmission by *Olpidium* and Plasmodiophorid vectors. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto, v. 42. p.211-241,

2004.

ROGGERO,P. et al. An *Ophiovirus* isolated from lettuce with big-vein symptoms. **Archives of Virology**. New York, v 145, p. 2629-2642, 2000.

ROGGERO,P. et al. 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. et al. Detecção e identificação de Lettuce Big-Vein Virus (LBVV) y Mirafiori Lettuce Virus (MiLV) por RT-PCR. In: CONGRESO DE LA SOCIEDAD CHILENA DE FITOPATOLOGIA, XII. Marbella, 2003. (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.

RYDER, E.J. Sea Green lettuce. **Hortscience**, Alexandria, v.16, n.4, p.571-572. 1981a.

RYDER, E.J. Thompson lettuce. **Hortscience**, Alexandria, v.16, n.5, p.687-688. 1981b.

RYDER, E.J. Pacific lettuce. **Hortscience**, Alexandria, v.26, p.437-438. 1991.

RYDER, E.J.; ROBINSON, B.J. Big-vein resistance in lettuce: identifying, selecting, and testing resistance cultivars and breeding lines. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. Alexandria, v.120, n.5, p.741-746, 1995.

SALAS, F. S. Controle de insetos-vetores causadores de viroses em hortaliças. In: REUNIÃO INTINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO, IV. **Anais...** Ribeirão Preto, 2001.

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.

SASAYA, T.; ISHIKAWA, K.; KOGANEZAWA, H. The nucleotide sequence of RNA1 of *Lettuce big-vein virus*, genus *Varicosavirus*, reveals its relation to nonsegmented negative-strand RNA viruses. **Virology**, New York, v.297, p.289-297, 2002.

SASAYA, T. et al. Nucleotide sequence of RNA2 of *Lettuce big-vein virus* and evidence for a possible transcription termination/initiation strategy similar to that of rhabdoviruses. **Journal of General Virology**, Londres, v.85, p.2709-2717, 2004.

SASAYA, T. et al. Molecular analysis of coat protein coding region of tobacco stunt virus shows that it is a strain of *Lettuce big-vein virus* in the genus *Varicosavirus*. **Archives of Virology**, New York, v.150, p.1013-1021, 2005.

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.

TSUNECHIRO, A. et al. Estimativa preliminar do valor da produção agropecuária do Estado de São Paulo em 2004. **Informações econômicas**, São Paulo, v.34,n.10, p.43-54, 2004.

VAN DER WILK, F. et al. 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. et al. Viruses associated with the lettuce big-vein syndrome. In: Arbeitskreis Viruskrankheiten der Pflanzler Tagung. Köln, **Abstract...** p.29-30, 2001.

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**. 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.

WESTERLUND, F.V.; CAMPBELL, R.N.; GROGAN, R.G. Effect of temperature on transmission, translocation and persistence of the Lettuce Big-Vein agent and big-vein symptom expression. **Phytopathology**, St. Paul, v.68, p. 921-926, 1978a.

WESTERLUND, F.V. et al. Soil factors affecting the reproduction and survival of *Oplidium brassicae* and its transmission of Big Vein agent to Lettuce. **Phytopathology**, St. Paul, v.68, p. 927-935, 1978b.

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.

APÊNDICE

BR106	TLQTKYCADTVAAILANINSMGKLSTETSNPLNIAVLKQMAPERKRYTRQVA	286
BR105	TLQTKYCADTVAAILANINSMGKLSTETSNPLNIAVLKQMAPERKRYTRQVA	286
BR104	TLQTKYCADTVAAILANINSMGKLSTETSNPLNIAVLKQMAPERKRYTRQVA	286
AUS02	TLQTKYCADTVAAILANINSMGKLSTETSNPLNIAVLKQMAPERKRYTRQVA	286
HOL03	TLQTKYCADTVAAILANINSMGKLSTETSNPLNIAVLKQMAPERKRYTRQVA	286
JAP05	TLQTKYCADTVAAILANINSMGKLSTETSNPLNIAVLKQMAPERKRYTRQVA	286
JAP03	TLQTKYCADTVAAILANINSMGKLSTETSNPLNIAVLKQMAPERKRYTRQVA	286
JAP02	TLQTKYCADTVAAILANINSMGKLSTETSNPLNIAVLKQMAPERKRYTRQVA	286
JAP04	TLQTKYCADTVAAILANINSMGKLSTETSNPLNIAVLKQMAPERKRYTRQVA	286
ESP15	TLQTKYCADTVAAILANINSMGKLSTETSNPLNIAVLKQMAPERKRYTRQVA	286
ESP14	TLQTKYCADTVAAILANINSMGKLSTETSNPLNIAVLKQMAPERKRYTRQVA	286
ESP16	TLQTKYCADTVAAILANINSMGKLSTETSNPLNIAVLKQMAPERKRYTRQVA	286
ESP17	TLQTKYCADTVAAILANINSMGKLSTETSNPLNIAVLKQMAPERKRYTRQVA	286
CH02	TLQTKYCADTVAAILANINSMGKLSTETSNPLNIAVLKQMAPERKRYTRQVA	286
ESP13	TLQTKYCADTVAAILANINSMGKLSTETSNPLNIAVLKQMAPERKRYTRQVA	286
ESP11	TLQTKYCADTVAAILANINSMGKLSTETSNPLNIAVLKQMAPERKRYTRQVA	286
ESP18	TLQTKYCADTVAAILANINSMGKLSTETSNPLNIAVLKQMAPERKRYTRQVA	286
ESP12	TLQTKYCADTVAAILANINSMGKLSTETSNPLNIAVLKQMAPERKRYTRQVA	286
ESP10	TLQTKYCADTVAAILANINSMGKLSTETSNPLNIAVLKQMAPERKRYTRQVA	286
USA01	TLQTKYCADTVAAILANINSMGKLSTETSNPLNIAVLKQMAPERKRYTRQVA	286
UK03	TLQTKYCADTVAAILANINSMGKLSTETSNPLNIAVLKQMAPERKRYTRQVA	286
UK02	TLQTKYCADTVAAILANINSMGKLSTETSNPLNIAVLKQMAPERKRYTRQVA	286
ESP20	TLQTKYCADTVAAILANINSMGKLSTETSNPLNIAVLKQMAPERKRYTRQVA	286
ESP09	TLQTKYCADTVAAILANINSMGKLSTETSNPLNIAVLKQMAPERKRYTRQVA	286
NCMV	ELQTKNCPELVYLLVCLLQKYEAFGAGQEPTKIVGIERVPANIRAEMSRAA	287
	**** * * * * * * *	

Apêndice 2. . Alinhamento de aminoácidos de parte da porção codificadora para a proteína capsial entre isolados de MLBVV.

```

ESP03      KKIEVGVKFPFSATK-----VKELIEGKSLTLDQEKIQKVLEEYVKNLPRTAET 49
ESP06      KKIEVGVKFPFSATK-----VKELIEGKSLTLDQEKIQKVLEEYVKNLPRTAET 49
ESP07      KKIEVGVKFPFSATK-----VKELIEGKSLTLDQDKIQKVLEEYVKNLPRTAET 49
ESP08      KKIEVGVKFPFSATK-----VKELIEGKSLTLDQDKIQKVLEEYVKNLPRTAET 49
BR60       KKVEVGVKFPFSAK-----VKELIEGKSLTLDQDKIQKVLEEYVKNLPRTAET 49
BR58       KKVEVGIKFPFSAK-----VKELIEGKSLTLDQDKIQKVLEEYVKNLPRTAET 49
CH01       KKVEVGVKFPFSAK-----VKELIEGKSLTLDQDKIQKVLEEYVKNLPRTAET 49
BR61       KKVEVGVKFPFSAK-----VKELIEGKSLTLDQDKIQKVLEEYVKNLPRTAET 49
ESP02      KKVEVGVKFPFSAK-----VKELIEGKSLTLDQDKIQKVLEEYVKNLPRTAET 49
GER03      KKVKVGVKFPFSAK-----VKELIEGKSLTLDQDKIQKVLEEYVKNLPRTAET 49
ITA01      KKVEVGVKFPFSAK-----VKELIEGKSLTLDQDKIQKVLEEYVKNLPRTAET 49
ESP05      KKVEVGVKFPFSAK-----VKELIEGKSLTLDQDKIQKVLEEYVKNLPRTAET 49
ESP04      KKVELGVKFPFSAK-----VKELIEGKSLTLDQDKIQKVLEEYVKNLPRTAET 49
AUS01      KKVEVGVKFPFSAK-----VKELIEGKSLTLDQDKIQKVLEEYVKNLPRTAET 49
JAP01      KKVEVGVKFPFSAK-----VKELIEGKSLTLDQDKIQKVLEEYVKNLPRTAET 49
HOL01      KKVEVGVKFPFSAK-----VKELIEGKSLTLDQDKIQKVLEEYVKNLPRTAET 49
GER01      KKVEVGVKFPFSAK-----VKELIEGKSLTLDQDKIQKVLEEYVKNLPRTAET 49
UK01       KKVEVGVKFPFSAPK-----VKELIEGKSLTLDQDKIQKVLEEYVKNLPRTAET 49
DEN01      KKVEVGVKFPFSAK-----VKELIEGKSLTLDQDKIQKVLEEYVKNLPRTAET 49
HOL02      KKVEVGVKFPFSAK-----VKELIEGKSLTLDQDKIQKVLEEYVKNLPRTAET 49
GER02      KKVEVGVKFPFSAK-----VKELIEGKSLTLDQDKIQKVLEEYVKNLPRTAET 49
ESP01      KKVEVGVKFPFSAK-----VKELIEGKSLTLDQDKIQKVLKYEYVKNLPRTAET 49
CPsV       NPHDQGEKPTFSLASSSSNIKITDIEVIKQKMEQETFQIDQLKLKEQIENFKTIVTLDDDES 60
          : . * * . ** ..          :* : * :: : ** *::: :*: :*. :. * :

ESP03      YKPKEIEIKYFKGVFEFSVSSLLSSGTKILDAILYSTYKDSAEHNFI FGVKVLSPDFIDSK 109
ESP06      YKPKEIEIKYFKGVFEFSVSSLLSSGTKILDAILYSTYKDSAEHNFI FDKVVLSPDFIDSK 109
ESP07      YKPKEIEIKYFKGVFEFSVSSLLSSGTKILDAILYSTYKDSAEHNFI FDKVVLSPDFIDSK 109
ESP08      YKPKEIEIKYFKGVFEFSVSSLLSSGTKILDAILYSTYKDSAEHNFI FDKVVLSPDFIDSK 109
BR60       YKPKEIEIKCFKGVDFSISSLLSSGTKILDAILYSTYKDSAEHNFI FDKVLSKSPDFIDSK 109
BR58       YKPKEIEIKCFKGVDFSISSLLSSGTKILDAILYSTYKDSAGHNFI FDKVLSKSPDFIDSK 109
CH01       YKPKEIEIKCFKGVDFSISSLLSSGTKILDAILYSTYKDSAEHNFI FDKVLSKSPDFIDSK 109
BR61       YEPKEIEIKCFKGVDFSISSLLSSGTKILDAILYSTYKDSAEHNFI FDKVLSKSPDFIDSK 109
ESP02      YKPKEIEIKCFKGVDFSISSLLSSGTKILDAILYSTYKDSAEHNFI FDKVLSKSPDFIDSK 109
GER03      YKPKEIEIKCFKGVDFSISSLLSSGTKILDAILYSTYKDSAEHNFI FDKVLSKSPDFIDSK 109
ITA01      YKPKEIEIKCFKGVDFSISSLLSSGTKILDAILYSTYKDSAEHNFI FDKVLSKSPDFIDSK 109
ESP05      YKPKEIEIKCFKGVDFSISSLLSSRTKILHAILYSTYKDSAEHNFI FDKVLSKSPDFIDSK 109
ESP04      YNPKEIEIKCFKGVDFSISSLLSFGTKILDAILYSTYKDSAEHNFI FDKVLSKSPDFIDSK 109
AUS01      YKPKEIEIKCFKGVDFSISSLLSSGTKILDAILYSTYKDSAEHNFI FDKVLSKSPDFIDSK 109
JAP01      YKPKEIEIKCFKGVDFSISSLLSSGTKILDAILYSTYKDSAEHNFI FDKVLSKSPDFIDSK 109
HOL01      YKPKEIEIKCFKGVDFSISSLLSSGTKILDAILYSTYKDSAEHNFI FDKVLSKSPDFIDSK 109
GER01      YKPKEIEIKCFKGVDFSISSLLSSGTKILDAILYSTYKDSAEHNFI FDKVLSKSPDFIDSK 109
UK01       YKPKEIEIKCFKGVDFSISSLLSSGTKILDAILYSTYKDSAEHNFI FDKVLSKSPDFIDSK 109
DEN01      YKPKEIEIKCFKGVDFSISSLLSSGTKILDAILYSTYQDSAEHNFI FDKVLSKSPDFIDSK 109
HOL02      YKPKEIEIKCFKGVDFSISSLLSSGTKILDAILYSTYKDSAEHNFI FDKVLSKSPDFIDSK 109
GER02      YKPKEIEIKCFKGVDFSISSLLSSGTKILDAILYSTYKDSAEHNFI FDKVLSKSPDFIDSK 109
ESP01      YKPREIEIKCFKGVDFSISSLLSSGTKILDAILYSTYKDSMEHNFI FDKVLSKSPDFIDSK 109
CPsV       YTEGEIVIKHFGNPD AELNMLV TAGTKILDGLVYVSMKGDTKSLNLFKMEQVDG--VCDS 118
          * ** ** * . : .: * : ****. : : * : : . * : : . : . :

ESP03      ILVNNIETGNRAIKSAFCLVYDQGGPLSKTSEERPLSKFVRETIFREKDLKANELCDHLS 169
ESP06      ILVNNIETGNRAIKSAFCLVYDQGGPLSKTSEERPLSKFVRETIFREKDLKANELCDHLS 169
ESP07      ILVNNIETGNRAIKSAFCLVYDQGGPLSKTSEERPLSKFVRETIFREKDLKANELCDHLS 169
ESP08      ILVNNIETGNRAIKSAFCLVYDQGGPLSKTSEERPLSKFVRETIFREKDLKANELCDHLS 169
BR60       LLVNNIETGNRAIKAAFCLVYDQGGPLSKTSEERPLSKFVRETIFREKDLKANELCEYLS 169
BR58       LLVNNIETGNRAIKAAFCLVYDQGGPLSKTSEERPLSKFVRETIFREKDLKANELCEYLS 169
CH01       LLVNNIETGNRAIKAAFCLVYDQGGPLSKTSEERPLSKFVRETIFREKDLKANELCEYFV 169
BR61       LLVNNIETGNRAIKAAFCLVYDQGGPLSKTSEERPLSK-VRETIFREKDLKANELCEYLS 168

```

ESP02	LLVNNIETGNRAIKAAFCLVYNQGGPLSKTSEERPLSKFVRETIFREKDLKANELCEYLS	169
GER03	LLVSNIETGNRAIKAAFCLVYNQGGPLSKTSEERPLSKFVRETIFREKDLKANELCEYLS	169
ITA01	LLVSNIETGNRAIKAAFCLVYNQGGPLSKTSEDRPLSKFVRETIFREKDLKANELCEYLS	169
ESP05	LLVNHIEETGNRAIKAAFCLFYNGGLPSKTSEPTLSKFVRETIFREKDLKANELCEYLS	169
ESP04	LLVNNIETGNRAIKAAFCLVYNQGGPLSKTSEERPLSKFVRETIFREKDLKANELCEYLS	169
AUS01	LLVNNIETGNRAIKAAFCLVYNQGGPLSKTSEERPLSKFVRETIFREKDLKANELCEYLS	169
JAP01	LLVNNIETGNRAIKAAFCLVYNQGGPLSKTSEERPLSKFVRETIFREKDLKANELCEYLS	169
HOL01	LLVNNIETGNRAIKAAFCLVYNQGGPLSKTSEERPLSKFVRETIFREKDLKANELCEYLS	169
GER01	LLVNNIETGNRAIKAAFCLVYNQGGPLSKTSEDRPLSKVRETIFREKDLKANELCEYLS	169
UK01	LLVNNIETGNRAIKAAFCLVYNQGGPLSKTSEERPLSKFVRETIFREKDLKANELCEYLS	169
DEN01	LLVNNIETGNRAIKAAFCLVYHQGLPSKTSEERPLSKFVRETIFREKDLKANELCEYLS	169
HOL02	LLVNNIETGNRAIKAAFCLVYNQGGPLSKTSEERPLSKFVRETIFREKDLKANELCEYLS	169
GER02	LLVNNIETGNRAIKAAFCLVYNQGGPLSKTSEERPLSKFVRETIFREKDLKANELCEYLS	169
ESP01	LLVNNIETGNRAIKAAFCLVYNQGGPLSKTSEERPLSKFVRETIFREKDLKANELCEYLS	169
CPsV	DIVKNIRVAKRAIQAAFVLVFTQGSPLPKADDKRKPVEFVKSKLYDG-DVSLSQISEELS	177
	:*.:*...:***:** *.: **.*. *.:.. :.: *.: :. *.. :.:.:	
ESP03	SADPSLFP-SQVFLKISLENLPTVESSRCKMSIAGNKAMRYALLAQKFD-KDEVVPVTEV	227
ESP06	SADPSLFP-SQVFLKISLENLPTVESSRCKMSIAGNKAMRYALLAQKFD-KDEVVPVTEV	227
ESP07	SADPSLFP-SQVFLKISLENLPTVESSRCKMSIAGNKAMRYALLAQKFD-KDEVVPVTEV	227
ESP08	SADPSLFP-SQVFLKISLENLPTVESSRCKMSIAGNKAMRYALLAQKFD-KDEVVPVTEV	227
BR60	SADPSLFP-SQVFLKISLENLPTVESSRCKMSIAGDKAMIYALLAQKFD-KDEVVPVTEV	227
BR58	SADPSLFP-SQVFLKISLENLPTVESSRCKMSIAGNKAMRYALLAQKFD-KDEVVPVTEV	227
CH01	ISGSFFVSKSLSLFGKISLENLPTVESSRCKMSIAGNKAMRYALLAQKFD-KDEVVPVTEV	228
BR61	SADPSLFP-SQVFLKISLENLPTVESSRCKMSIAGNKAMRYALLAQKFD-KDEVVPVTEV	226
ESP02	SADPSLFP-SQVFLKISLENLPTVESSRCKMSIAGNKAMRYALLAQKFD-KDEVVPVTEV	227
GER03	SADPSLFP-SQVFLKISLENLPTVESSRCKMSIAGNKAMRYALLAQKFD-KDEVVPVTEV	227
ITA01	SADPSLFP-SQVFLKISLETLPTEVSSRCKMSIAGNKAMRYALLAQKFD-KDEVVPVTEV	227
ESP05	SADPSLFP-SQVFLKISLETLPTEVSSRCKMSIAGNKAMRYALLAQKFD-KDEVVPVTEV	227
ESP04	SADPSLFP-SQVFLKISLENLPTVESSRCKMSIAGNKAMRYALLAQKFD-KDEVVPVTEV	227
AUS01	SADPSLFP-SQVFLKISLENLPTVESSRCKMSIAGNKAMRYALLAQKFD-KDEIPVPTVEV	227
JAP01	SADPSLFP-SQVFLKISLENLPTVESSRCKMSIAGNKAMRYALLAQKFD-KDEIPVPTVEV	227
HOL01	SADPSLFP-SQVFLKISLENLPTVESSRCKMSIAGNKAMRYALLAQKFD-KDEIPVPTVEV	227
GER01	SADPSLFP-SQVFLKISLENLPAEVSSRCKMSIAGNKAMRYALLAQKFD-KDEIPVPTVEV	227
UK01	SADPSLFP-SQVFLKISLETLPTEVSSRCKMSIAGNKAMRYALLAQKFD-KDEIPVPTVEV	227
DEN01	SADPFLFP-SQVFLKISLENLPTVESSRCKMSIAGNKAMRYALLAQKFD-KDEIPVPTVEV	227
HOL02	SADPSLFP-SQVFLKISLENLPTVESSRCKMSIAGNKAMRYALLAQKFD-KDEIPVPTVEV	227
GER02	SADPSLFP-SQVFLKISLENLPTVESSRCKMSIAGNKAMRYALLAQKFD-KDEIPVPTVEV	227
ESP01	SADPSLFP-SQVFLKISLENLPTVESSRCKMSIAGNKAMRYALLAQKFD-KDEIPVPTVEV	227
CPsV	HAPTCKFP-ARVFLKIDIDNLPASVCSRCKLNIAGNRSVRYASFSSFTQKQLSPAVGA	236
	: . . . : * * * . : . * * : * * * * : * * * * : * * : * . . * : * :	
ESP03	NPTTSSEYMQRKEKVEKAKKIVDVLCSLASDFQAQVKMHPLSPERSRKNFTLQLTSAIV	287
ESP06	NPTTSSEYMQRKEKVEKAKKIVDVLCSLASDFQAQVKMHPLSPERSRKNFTLQLTSAIV	287
ESP07	NPTTSSEYMQRKEKVEKAKKIVDVLCSLASDFQAQVKMHPLSPERSRKNFTLQLTSAIV	287
ESP08	NPTTSSEYMQRKEKVEKAKKIVDVLCSLASDFQAQVKMHPLSPERSRKNFTLQLTSAIV	287
BR60	NPITSSEYMQLKKEKIEKAKKIVDVLCSLASDFQAQV-MHPLSPERSRKNFTLQLTSAIV	286
BR58	NPITSSEYMQLKKEKIEKAKKIVDVLCSLASDFQAQVKMHPLSPERSRKNFTLQLTSAIV	287
CH01	NPITSSEYMQLKKEKIEKAKKIVDVLCSLASDFQAQVKMHPLSPERSRKNFTLQLTSAIV	288
BR61	NPITSSEYMQLKKEKIEKAKKIVDVLCSLASDFQAQVKMHPLSPERSRKNFTLQLTSAIV	286
ESP02	NPITSSEYMQLKKEKIEKAKKIVDVLCSLASDFQAQVKMHPLSPERSRKNFTLQLTSAIV	287
GER03	NPITSSEYMQLKKEKIEKAKKIVDVLCSLASDFQAQVKMHPLSPERSRKNFTLQLTSAIV	287
ITA01	NPITSSEYMQLKKEKIEKAKKIVDVLCSLASDFQAQVKMHPLSPERSRKNFTLQLTSAIV	287
ESP05	NPITSSEYMQLKKEKIEKAKKIVDVLCSLASDFQAQVKMHPLSPERSRKNFTLQLTSAIV	287
ESP04	NPTTSSEYMQLKKEKIEKAKKIVDVLCSLASDFQAQVKMHPLSPERSRKNFTLQLTSAIV	287
AUS01	NPTTSSEYMQLKKEKIEKAKKIVDVLCSLASDFQAQVKMHPLSPERSRKNFTLQLTSAIV	287
JAP01	NPTTSSEYMQLKKEKIEKAKKIVDVLCSLASDFQAQVKMHPLSPERSRKNFTLQLTSAIV	287
HOL01	NPTTSSEYMQLKKEKIEKAKKIVDVLCSLASDFQAQVKMHPLSPERSRKNFTLQLTSAIV	287
GER01	NPTTSSEYMQLKKEKIEKAKKIVDVLCSLASDFQAQVKMHPLSPERSRKNFTLQLTSAIV	287
UK01	NPTTSSEYMQLKKEKIEKAKKIVDVLCSLASDFQAQVKMHPLSPERSRKNFTLQLTSAIV	287
DEN01	NPTTSSEYIQKKEKIEKAKKIVDVLCSLASDFQAQVKMHPLSPERSRKNFTLQLTSAIV	287
HOL02	NPTTSSEYMQLKKEKIEKAKKIVDVLRSLASDFQAQVKMHPLSPERSRKNFTLQLTSAIV	287

```

GER02      NPTTSSEYMQKKEKIEKAKKIVDVLCSLASDFQAQVKMHPLSRERSRKNFTLQLTSAIV 287
ESP01      NPTTSSEYMQKKEKIEKAKKIVDVLCSLASDFQAQVKMHPLSPERSRKNFTLQLTSAIV 287
CPsV       TPESLMPLLETNQKIEKAIARDFLKTMEGQWKNQKRLHPLSDEKPTIKNFTLKLTCII 296
.* :      : :*:*** * *.* : .:: * :**** *.: *****:*.**

ESP03      TSLSYKGRLDMRKAIEEKKIEAFKRDENIFGRNLALGQPTFPVLTNADADFSELSVEAVK 347
ESP06      TSLSYKGRLDMRKAIEEKKIEAFKRDENIFGRNLALGQPTFPVLTNADADFSELSVEAVK 347
ESP07      TSLSYKGRLDMRKAIEEKKIEAFKRDENIFGRNLALGQPTFPVLTNADADFSELSVEAVK 347
ESP08      TSLSYKGRLDMRKAIEEKKIEAFKRDENIFGRNLALGQPTFPVLTNADADFSELSVEAVK 347
BR60       TSLSYKGRLDMRKAIEEKKIEALKRDENIFGRNLALGQPTFPVLTNADADFSELSVEAVK 346
BR58       TSLSYKGRLDMRKAIEEKKIEAFKRDENIFGRNLALGQPTFPVLTNADADFSELSVEAVK 347
CH01       TSLSYKGRLDMRKAIEEKKIEAFKRDENIFGRNLALGQPTFPVLTNADADFSELSVEAVK 348
BR61       TSLSYKGRLDMRKAIEEKKIEAFKRDENIFGRNLALGQPTFPVLTNADADFSELSVEAVK 346
ESP02      TSLSYKGRLDMRKAIEEKKIEAFKRDENIFGRNLALGQPTFPVLTNADADFSELSVEAVK 347
GER03      TSLSYKGRLDMRKAIEEKKIEAFKRDENIFGRNLALGQPTFPVLTNADADFSELSVEAVK 347
ITA01      TSLSYKGRLDMRKAIEEKKIEAFKRDENIFGRNLALGQPTFPVLTNADADFSELSVEAVK 347
ESP05      TSLSYKGRLDMRKAIEEKKIEAFKRDENIFGRNLALGQPTFPVLTNADADFSELSVEAVK 347
ESP04      TSLSYKGRLDMRKAIEEKKIEAFKRDENIFGRNLALGQPTFPVLTNADADFSELSVEAVK 347
AUS01     TSLSYKGRLDMRKAIEEKKIEAFKRDENIFGRNLALGQPTFPVLTNADADFSELSVEAVK 347
JAP01     TSLSYKGRLDMRKAIEEKKIEAFKRDENIFGRNLALGQPTFPVLTNADADFSELSVEAVK 347
HOL01     TSLSYKGRLDMRKAIEEKKIEAFKRDENIFGRNLALGQPTFPVLTNADADFSELSVEAVK 347
GER01     TSLSYKGRLDMRKAIEEKKIEAFKRDENIFGRNLALGQPTFPVLTNADADFSELSVEAVK 347
UK01      TSLSYKGRLDMRKAIEEKKIEAFKRDENIFGRNLALGQPTFPVLTNADADFSELSVEAVK 347
DEN01     TSLSYKGRLDMRKAIEEKKIEAFKRDENIFGRNLALGQPTFPVLTNADADFSELSVEAVK 347
HOL02     TSLSYKGRLDMRKAIEEKKIEAFKRDENIFGRNLALGQPTFPVLTNADADFSELSVEAVK 347
GER02     TSLSYKGRLDMRKAIEEKKIEAFKRDENIFGRNLALGQPTFPVLTNADADFSELSVEAVK 347
ESP01     TSLSYKGRLDMRKAIEEKKIEAFKRDENIFGRNLALGQPTFPVLTNAYADFSELLVEAVK 347
CPsV      YSLTPDGRTDMAERII SDNNKGFQNDRNFFGDGEGP-IRTWSVLTKPEADF SNI TVDGLK 355
** : .** * : * .: :.: *.** :. *.:****. ** : :*.:*

ESP03      TAYGKK 353
ESP06      TAYGKK 353
ESP07      TAYGKK 353
ESP08      TAYGKK 353
BR60       TAYGKK 352
BR58       TAYGKK 353
CH01       TAYGKK 354
BR61       TAYGKK 352
ESP02      TAYGKK 353
GER03      TAYGKK 353
ITA01      TAYGKK 353
ESP05      TAYGKK 353
ESP04      TAYGKK 353
AUS01     TAYGKK 353
JAP01     TAYGKK 353
HOL01     TAYGKK 353
GER01     TAYGKK 353
UK01      TAYGKK 353
DEN01     TAYGKK 353
HOL02     TAYGKK 353
GER02     TAYGKK 353
ESP01     TAYGKK 353
CPsV      GIFGVA 361
.*

```