

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**IDENTIFICAÇÃO DOS VÍRUS CAUSADORES DE MOSAICO EM
CULTIVARES DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.) RESISTENTES AO
VÍRUS DO MOSAICO DA ALFACE NAS REGIÕES
PRODUTORAS DO ESTADO DE SÃO PAULO**

Eng.^a. Agr.^a. OLITA SALATI STANGARLIN

Orientador: Prof. Dr. MARCELO AGENOR PAVAN

Co-orientador: Prof. Dr. NORBERTO DA SILVA

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas do Campus de
Botucatu - UNESP, para a obtenção do título
de Mestre em Agronomia, Área de
Concentração: Proteção de Plantas.

**BOTUCATU - SP
1995**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

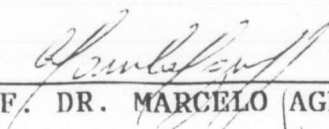
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "IDENTIFICAÇÃO DOS VÍRUS CAUSADORES DE MOSAICO EM CULTIVARES
DE ALFACE (Lactuca sativa L.) RESISTENTES AO VÍRUS DO MOSAI
CO DA ALFACE NAS REGIÕES PRODUTORAS DO ESTADO DE SÃO PAULO"

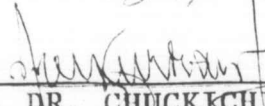
AUTOR: OLITA SALATI STANGARLIN

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN

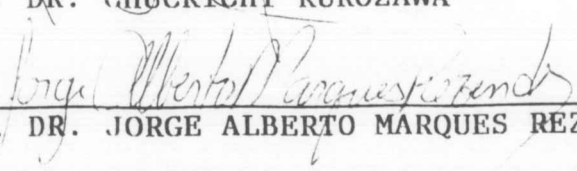
Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN



PROF. DR. CHUCKICHI KUROZAWA



PROF. DR. JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE

Data da Realização: 05 / JULHO / 1995.

Homologado pela Congregação: 04 / AGOSTO / 1995 .

Dedico

Ao Márcio com carinho

Aos meus filhos Guilherme, Tiago, Taís e Carina

Aos meus pais Affonso e Lenny

pelo apoio e incentivo na realização deste trabalho

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Dr. Marcelo Agenor Pavan, pela orientação, amizade, oportunidade e paciência de transmitir os conhecimentos necessários para que pudesse cumprir mais uma etapa da minha vida.
- Ao Professor Dr. Norberto da Silva, pela coorientação, pelos ensinamentos recebidos, pelo apoio e amizade e por poder compartilhar durante este período com o seu entusiasmo na dedicação aos alunos e à pesquisa.
- Aos pesquisadores Dr. Jorge Vega e Sandra Maria Mansur Scagliuse da Seção de Virologia Fitotécnica do Instituto Agronômico de Campinas pela colaboração no trabalho.
- Ao Dr. Álvaro Santos Costa pelas sugestões dadas nos trabalhos.
- Ao professor Dr. Wilson Badiali Crocomo, coordenador do curso de pós-graduação na época da execução deste trabalho.
- Aos docentes do Departamento de Defesa Fitossanitária pela contribuição à minha formação e ensinamentos recebidos, especialmente aos Professores Drs. Chukichi Kurozawa, Antonio Carlos Maringoni e Nilton Luiz de Souza.
- Ao meu esposo Márcio José Stangarlin pela ajuda na digitação da dissertação.
- Aos meus primos professores Doutores Adélia Maria Salati Marcondes Llistó e Daniel Antonio Salati Marcondes pelo incentivo e apoio para retornar aos estudos.

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.
- À ASGROW do Brasil pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento do presente trabalho, bem como pela importação e fornecimento do anti-soro utilizado.
- Aos Drs. Paulo Cesar Tavares de Mello, Paulo Della Vecchia, Sérgio Mitsuo Ishikawa e Jorge Ikuta, pelo auxílio na coleta das amostras virais.
- Aos meus colegas Alexandre, Carlos, Cláudio, Eduardo, Eliete, Érica, Ismael, Jael, Márcia, Márcio Pala, Marta, Nilton, Raimunda, Romulo e Selma pela amizade e constante estímulo.
- Aos funcionários do Departamento de Agricultura e Melhoramento Vegetal, em especial ao Ciro Venâncio de Oliveira, pelo incansável auxílio nas diversas atividades experimentais.
- Aos funcionários do Departamento de Defesa Fitossanitária pela atenção durante esses anos de convivência.
- Aos funcionários da Fazenda Experimental de São Manuel pela colaboração, principalmente ao funcionário José Luiz Zanela.
- Aos funcionários da biblioteca pela atenção, em particular a Célia Regina Inoue pelas devidas correções das referências bibliográficas.
- Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pela dedicada atenção.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1. Vírus do mosaico da alface (Lettuce Mosaic Virus - LMV).....	7
3.2. Vírus do mosqueado do picão (Bidens Mottle Virus - BiMoV).....	14
3.3. Vírus do mosaico do nabo (Turnip Mosaic Virus - TuMV).....	16
3.4. Vírus do mosaico do picão (Bidens Mosaic Virus - BMV)	18
3.5. Vírus do mosaico do pepino (Cucumber Mosaic Virus - CMV)	20
3.6. Vírus do mosqueado da alface (Lettuce Mottle Virus - LMoV).....	23
3.7. Vírus do vira-cabeça do tomateiro (Tomato Spotted Wilt Virus - TSWV)....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Localização experimental.....	28
4.2. Fontes de isolados virais.....	28
4.3. Manutenção dos isolados.....	31

4.3.1. Manutenção “in vitro”	31
4.3.2. Manutenção “in vivo”	32
4.4. Identificação dos vírus.....	33
4.4.1. Teste em hospedeiros diferenciais	33
4.4.2. Teste sorológico.....	35
4.4.3. Teste de microscopia eletrônica	36
4.4.3.1. Técnica de imersão foliar rápida.....	37
4.4.3.2. Técnica de “MEIAD”	37
4.4.4. Propriedades físicas “in vitro”	38
4.4.4.1. Determinação do ponto final de diluição.....	38
4.4.4.2. Determinação do ponto de inativação térmica	38
4.4.4.3. Determinação da longevidade “in vitro”	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1. Identificação dos isolados virais por meio de hospedeiros diferenciais.....	40
5.2. Identificação dos isolados virais por meio de teste sorológico	47
5.3. Identificação dos isolados virais por meio de microscopia eletrônica	48
5.4. Identificação dos isolados virais por meio de suas propriedades físicas “in vitro”	51
5.5. Considerações Gerais	53
6. CONCLUSÃO.....	58
7. SUMMARY	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01 - Reações de espécies vegetais utilizadas na identificação do vírus do mosaico da alface (LMV).	9
QUADRO 02 - Reações de espécies vegetais utilizadas na identificação do vírus do mosqueado do picão (BiMoV).	15
QUADRO 03 - Reações de espécies vegetais utilizadas na identificação do vírus do mosaico do nabo (TuMV).	17
QUADRO 04 - Reações de espécies vegetais utilizadas na identificação do vírus do mosaico do picão (BMV).	20
QUADRO 05 - Reações de espécies vegetais utilizadas na identificação do vírus do mosaico do pepino (CMV).	22
QUADRO 06 - Reações de espécies vegetais utilizadas na identificação do vírus do mosqueado da alface (LMoV) na cultura da alface.	25
QUADRO 07 - Reações de espécies vegetais utilizadas na identificação do vírus do vira-cabeça do tomateiro (TSWV).	27
QUADRO 08 - Isolados virais coletados em cultivares de alface com sintomas de mosaico e respectivas procedências e regiões de origem (1992).	29
QUADRO 09 - Reações de espécies vegetais utilizadas na identificação dos vírus que causam mosaico, mosqueado e necrose em alface.	34
QUADRO 10 - Reação de hospedeiros diferenciais utilizados na identificação dos vírus presentes nos isolados coletados no campo.	41

QUADRO 11 - Reação de hospedeiros diferenciais utilizados na identificação dos vírus presentes nos isolados coletados no campo	45
QUADRO 12 - Reação do teste PTA - ELISA em amostras procedentes de cultivares de alface resistentes, suscetíveis ao LMV e não identificadas com sintoma de mosaico.....	48
QUADRO 13 - Morfologia das partículas virais observadas na Microscopia Eletrônica em <i>Chenopodium quinoa</i> ou alface White Boston inoculadas com amostras originais de alface com sintoma de mosaico.	50
QUADRO 14 - Ponto Final de Diluição (P.F.D.), Longevidade 'in vitro' (L.I.V.) e Ponto de Inativação Térmica (P.I.T.) do isolado número 14, inoculado em <i>Chenopodium quinoa</i>	54
QUADRO 15 - Ponto Final de Diluição (P.F.D.), Longevidade 'in vitro' (L.I.V.) e Ponto de Inativação Térmica (P.I.T.) do isolado número 01, inoculado em <i>Chenopodium quinoa</i>	54
QUADRO 16 - Vírus identificados em amostras de alface com sintomas de mosaico de acordo com a cultivar, procedência e origem de coleta.	55

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 01 - Foto de microscopia eletrônica de extrato de folhas de alface cultivar White Boston, infectada por LMV, amostra número 26 (20.000 x).....52
- FIGURA 02 - Foto de microscopia eletrônica de extrato de tecido de *Chenopodium quinoa* infectado por LMoV, amostra número 01 (50.000 x).....52
- FIGURA 03 - Foto de microscopia eletrônica de extrato de tecido de *Chenopodium quinoa* infectado por mistura de LMV e LMoV, amostra número 43 (20.000 x).53

1. RESUMO

Visitas realizadas, em 1992, nas regiões produtoras de alface do Estado de São Paulo, permitiram constatar em torno de 70% de plantas de alface de cultivares resistentes ao vírus do mosaico da alface (Lettuce mosaic virus - LMV) com sintomas de mosaico. Foram coletadas cinquenta e quatro amostras provenientes de cultivares resistentes e suscetíveis, que quando inoculadas nas cultivares Babá e White Boston reproduziram os sintomas de viroses observados no campo. Para identificação dos vírus presentes, foram feitos testes de hospedeiros diferenciais, observação por microscopia eletrônica ("LEAF-DIP" e "MEIAD") e sorologia ("ELISA"). Quando inoculadas em diferentes hospedeiros, causaram sintomas em *Chenopodium quinoa*, *Gomphrena globosa*, *Pisum sativum* e *Zinnia elegans*, enquanto que *Cucurbita pepo* cv. Caserta, *Petunia hybrida*, *Datura stramonium* e *Nicotiana glutinosa* não apresentaram sintomas. A microscopia eletrônica diagnosticou a presença de partículas filamentosas flexuosas e isométricas ou ambas.

No teste sorológico, a maioria dos isolados provenientes de variedades resistentes reagiu positivamente com antisoro de LMV. Os resultados permitiram concluir a presença de LMV na maioria das amostras e alguns casos de vírus do mosqueado com infecção mista ou isolada. Como trinta e oito amostras foram provenientes de cultivares resistentes, admite-se a presença de variantes de LMV para as quais os genes de resistência presentes não foram efetivos.

2. INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa*) é uma espécie de domesticação antiga, cujos relatos são encontrados em pinturas de há 4500 A. C. no Egito e na Pérsia. Pertence ao gênero *Lactuca*, família Asteraceae, que inclui mais de cem espécies. A partir da alface selvagem, sucessivas seleções artificiais conduziram a obtenção de numerosas cultivares mais produtivas, adaptadas a diferentes condições e de melhor qualidade para consumo. A alface é entre as hortaliças folhosas a de maior importância econômica. Em 1990, foram comercializadas no Brasil 60.867 ton. de alface produzidos em 4026 ha (CAMARGO et al., 1993). O Estado de São Paulo participou com 45,6% do total, tendo sido comercializadas no CEAGESP aproximadamente 28.137,38 ton., provenientes das regiões de Ibiuna, Biritiba Mirim, Mogi das Cruzes e Salicópoli (SÃO PAULO, 1991). Como na alface o produto final para consumo são as folhas, estas precisam estar isentas de quaisquer tipos de lesões, tanto causadas por injúrias mecânicas como por doenças foliares.

Entre as diferentes doenças, as viroses caracterizam-se como uma

das mais importantes, podendo ser transmitidas por agentes vetores ou por sementes. As viroses, além de comprometerem a produção prejudicando o aspecto comercial, são de difícil controle através de produtos químicos que visam eliminar os insetos vetores. Os vírus relatados na literatura como causadores de sintomas de mosaico em alface são: Vírus do mosaico da alface (Lettuce mosaic virus - LMV), (JAGGER, 1921); Vírus do mosaico do picão (Bidens mosaic virus - BMV), (KITAJIMA et al., 1961); Vírus do mosqueado da alface (Lettuce mottle virus - LMoV), (KITAJIMA et al., 1980); Vírus do mosaico do pepino (Cucumber mosaic virus - CMV), (THOMSON & PROCTER, 1966); Vírus do mosqueado do picão (Bidens mottle virus - BiMoV), (PURCIFULL et al., 1971) e Vírus do mosaico do nabo (Turnip mosaic virus - TuMV), (ZINK & DUFFUS, 1969). O Vírus do vira-cabeça do tomateiro (Brazilian tomato spotted wilt virus - TSWV) também é causador de mosaico na espécie, mas geralmente é acompanhado de sintomas necróticos (COSTA & FORSTER, 1942). No Brasil, o vírus do mosaico da alface é o de maior importância, tendo sido relatado pela primeira vez por KRAMER et al. (1945).

A resistência ao LMV foi encontrada, na Argentina, na cultivar Gallega de Invierno por von der PAHLEN & CRNKO (1965). MARROU (1969) demonstrou que plantas de alface da cultivar Gallega de Invierno quando inoculadas com o LMV permitiam a multiplicação do vírus, mas não apresentavam sintomas de mosaico. A herança da tolerância foi determinada como sendo devida a um par de genes recessivos (BANNEROT et al., 1969).

Em 1968, o Instituto Agrônomo de Campinas (I.A.C.) introduziu a cultivar Gallega de Invierno, utilizando-a como fonte de resistência ao LMV para obtenção das cultivares série Brasil (Brasil-48, Brasil-202, Brasil-221 e Brasil-303).

Posteriormente, outras cultivares resistentes ao LMV foram desenvolvidas em outros programas de melhoramento no Brasil. Desses programas resultaram as cultivares Vivi, Regina, Aurea, Vanessa, Karina, Gloria, Elisa e Floresta, resultando na não constatação visual do mosaico da alface nas regiões produtoras. Em 1992, em visitas realizadas nas regiões produtoras de alface de Campinas, Mogi das Cruzes e Sorocaba durante a primavera e o verão, observou-se em torno de 70% de plantas de cultivares de alface resistentes ao LMV com sintomas de mosaico.

O objetivo do presente trabalho foi identificar os vírus causadores de mosaico ocorrentes nas amostras de alface coletadas nas regiões produtoras do Estado de São Paulo .

3. REVISÃO DE LITERATURA

São muitos os vírus relatados na literatura mundial que infectam a cultura da alface (*Lactuca sativa*): Arabis mosaic virus (Walkey, 1967); Beet western yellows virus (Duffus, 1960); Beet yellow stunt virus (Duffus, 1964); Bidens mottle virus (Christie et al., 1968); Broad bean wilt virus (Gippert & Schmelzer, 1975); Cucumber mosaic virus (Thomson & Procter, 1965); Lettuce big vein virus (Campbell et al., 1961); Lettuce mosaic virus (Jagger, 1921); Lettuce necrosis virus (Kassanis, 1947); Lettuce necrosis yellows virus (Stubbs & Grogan, 1963); Sowthistle yellow virus (Duffus et al., 1970); Strawberry latent ringspot virus (Cock, 1968); Tobacco necrosis virus (Verhoyen, 1965); Tobacco rattle virus (Drost, 1965); Tomato black ring virus (Smith & Short, 1959); Tomato spotted wilt virus (Schmelzer & Wolf, 1971); Turnip mosaic virus (Purcifull, 1968); citados por HORVÁTH (1980a). Sugar beet yellow stunt virus (Duffus, 1964); Tobacco black ring virus (Murant, 1970); Beet mild yellowing virus (Russel, 1965); Malva yellow virus (Costa et al., 1959); Carnation italian ringspot virus (Hollings et al., 1970); Alfalfa mosaic virus (Bos & Jaspars,

1971); Beet pseudo yellows virus (Duffus, 1965); Dandelion yellows mosaic vírus (Kassanis, 1947); Lettuce speckles mottle virus (Falk et al., 1979); Vírus do mosaico do picão (Kuhn, 1978); Vírus do mosqueado da alface (Kitajima et al., 1980), citados por MARINHO (1982). No Brasil os vírus que causam mosaico e mosqueado em alface são: Vírus do mosaico da alface (KRAMER et al., 1945); Vírus do mosaico do picão (KITAJIMA et al., 1961); Vírus do mosqueado da alface (KITAJIMA et al., 1980) e Vírus do mosaico do pepino (COSTA, 1983), além do vírus do vira-cabeça do tomateiro (COSTA & FORSTER, 1942) que causa sintoma de mosaico associado a necrose foliar. As principais características para identificação e diagnose desses vírus como: morfologia, gama de hospedeiros, hospedeiros diferenciais, propriedades físicas, mecanismos de transmissão, disseminação e sintomas são descritas a seguir.

3.1. Vírus do mosaico da alface (Lettuce Mosaic Virus - LMV)

O vírus do mosaico da alface é o vírus mais importante nas áreas de produção comercial de alface do mundo. Foi primeiramente descrito na Flórida, EUA, por JAGGER (1921). Com base na sintomatologia, gama de hospedeiros e transmissibilidade foi descrito como, *Lactuca vírus 1*, *Marmor lactucae* ou Lettuce mosaic vírus por SMITH (1937), HOLMES (1937) e AINSWORTH & OGILVIE (1939), respectivamente. NEWBALL (1923) foi o primeiro a demonstrar que o vírus do mosaico da alface é transmitido pela semente. O vírus foi observado em microscópio eletrônico pela primeira vez por COUCH & GOLD (1954) na Inglaterra. Em 1950, o mosaico causado por LMV foi considerado a doença de maior importância em alface na Europa e na Califórnia, EUA. O

LMV encontra-se disseminado por todo o mundo, provavelmente devido ao intercâmbio de sementes através do comércio internacional (DINANT & LOT, 1992).

O LMV pertence ao grupo dos potyvirus, que possui partícula de estrutura filamentosa e flexuosa, medindo aproximadamente 730x13 nm. As propriedades físicas "in vitro" do LMV, utilizando a alface como hospedeira, segundo TOMLINSON (1970a) são: Ponto de Inativação Térmica está entre 55 e 60 °C, Ponto Final de Diluição de 10^{-1} a 10^{-2} e Longevidade "in vitro" a 20 °C é de 1 a 2 dias.

O vírus do mosaico da alface apresenta uma gama de hospedeiros bem ampla. HORVÁTH (1980b) relacionou 121 espécies vegetais pertencentes à 17 famílias botânicas e 60 gêneros como hospedeiras de LMV. A maioria das espécies podem ser enquadradas nas seguintes famílias: *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Asteraceae*, *Boraginaceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Geraniaceae*, *Lamiaceae*, *Leguminosae*, *Malvaceae*, *Martyniaceae*, *Papilionaceae*, *Polygonaceae*, *Primulaceae* e *Solanaceae*.

Algumas espécies são comumente utilizadas como diferenciadoras para diagnose de LMV, mediante os sintomas macroscópicos, causados pela presença do vírus na planta (Quadro 01).

Para a propagação do vírus, as espécies indicadas são *Chenopodium quinoa* e algumas cultivares de alface, onde os sintomas aparecem no período de 10 a 15 dias após a inoculação (TOMLINSON, 1970a).

Os sintomas em cultivares de alfaces suscetíveis foram relatados por: AINSWORTH & OGILVIE (1939); GROGAN et al. (1952); MARROU (1960); TOMLINSON (1962, 1970a). Os sintomas na alface do grupo manteiga na fase adulta são

QUADRO 01- Reações de espécies vegetais utilizadas na identificação do vírus do mosaico da alface (LMV).

Espécies	Sintomas	Referências
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LL	COSTA & DUFFUS (1958); TOMLINSON (1970a)
<i>Chenopodium quinoa</i>	LL / S	TOMLINSON (1970a); MARINHO (1982)
<i>Cucurbita pepo</i>	+	HORVÁTH (1980b)
<i>Datura stramonium</i>	-	COSTA & DUFFUS (1958); EDWARDSON & CHRISTIE (1991a)
<i>Gomphrena globosa</i>	LL	TOMLINSON (1970a); MARINHO (1982)
<i>Helianthus annuus</i>	-	EDWARDSON & CHRISTIE (1991a)
<i>Lactuca sativa</i>	S / MS	KRAMER et al. (1945); TOMLINSON (1970a)
<i>Nicotiana clevelandii</i>	LL	COSTA & DUFFUS (1958); MARINHO (1982)
<i>Nicotiana glutinosa</i>	-	COSTA & DUFFUS (1958); EDWARDSON & CHRISTIE (1991a)
<i>Petunia hybrida</i>	-	COSTA & DUFFUS (1958); EDWARDSON & CHRISTIE (1991a)
<i>Pisum sativum</i>	M	KRAMER et al. (1945); MARINHO (1982)
<i>Zinnia elegans</i>	M	MARINHO (1982)

LL: lesão local; M: mosaico; S: sistêmico; -: não hospedeira; +: hospedeira.

fáceis de reconhecer: mosqueado, distorções e amarelecimento foliares, podendo desenvolver necrose de nervuras na dependência da cultivar, resultando na mal formação ou distorção das cabeças. Clareamento de nervura e mosaico são comuns em plantas jovens e adultas, porém, esses sintomas são menos visíveis em cultivares com presença de antocianina. Quando

plantas jovens são infectadas, as folhas internas permanecem pequenas e se inclinam para o centro.

Em cultivares de alface de cabeça crespa, o mosaico e clareamento de nervura são menos visíveis, porém, pontuações, redução no crescimento e distorção foliar são comumente observadas, principalmente quando as plantas são infectadas no estágio inicial de desenvolvimento. Na Califórnia, EUA, a síndrome descrita como "June Yellows", que ocorre em cultivares da alface do grupo americano, consiste no amarelecimento das folhas da saia e redução de crescimento (GROGAN, 1980). Alguns autores, entretanto, duvidam que o LMV é o único responsável por esta síndrome e sugerem que o vírus do amarelo da beterraba (Beet western yellows virus) pode estar envolvido (DUFFUS, 1960). Na cultivar Clímax, o LMV induz uma necrose interna das nervuras e provoca uma descoloração castanha enferrujada em cabeças armazenadas (COAKLEY et al., 1973).

Em cultivares do grupo Romana, clareamento de nervuras e mosqueamento são visíveis em plantas jovens infectadas e estas ficam atrofiadas e declinam formando uma cabeça pequena. Em todos os tipos de alface, o efeito do LMV é perfeitamente visível durante o pendoamento. As brácteas da inflorescência mostram mosqueamento e áreas necróticas. As plantas infectadas produzem menor quantidade de sementes (ZINK et al., 1956).

Isolados muito agressivos provocam severa redução do crescimento, necroses e as vezes morte de cultivares suscetíveis. A reação de cultivares resistentes, quando inoculadas com LMV, variam da ausência absoluta de sintomas a um leve mosqueamento na dependência do background genético do material ou da fonte de resistência utilizada para o seu desenvolvimento.

A disseminação de LMV pode ocorrer através das sementes obtidas de plantas infectadas ou por afídeos.

O primeiro relato de transmissão do LMV pela semente foi feito por NEWBALL (1923). Foi verificado que a taxa de transmissão variou entre cultivares e dentro de cultivares e indicando a possibilidade de seleção para pouca ou nenhuma transmissão (COUCH, 1955).

Vários estudos foram feitos e verificaram que a taxa de transmissão do LMV pela semente é baixa. Segundo estudos de COUCH (1955), a percentagem de transmissão entre diferentes plantas da cultivar Bibb variou de 4,03% a 11,31%.

RYDER (1973) verificou que plantas cultivadas em baixas temperaturas apresentaram uma taxa mais elevada de transmissão via semente do que plantas de alface submetidas a altas temperaturas. RYDER (1964) verificou também que o LMV pode ser transmitido tanto pelo pólen como pelo óvulo. A transmissão do LMV por afídeos é de maneira não persistente e pode ser feito por várias espécies, sendo o *Myzus persicae* o mais eficiente.

A resistência ao LMV em alface foi primeiramente identificada na Argentina por von der PAHLEN & CRNKO (1965) na cultivar Gallega de Invierno. MARROU (1969) demonstrou que a resistência desta cultivar é do tipo tolerância caracterizada pela ausência de sintomas nas plantas infectadas. BANNEROT et al. (1969) demonstraram que a herança da tolerância da cultivar Gallega de Invierno é devido a um par de alelos recessivos denominado gg. RYDER (1968) encontrou uma resistência similar em três introduções de *Lactuca serriola*, provenientes do Egito. RYDER (1970), estudando herança de tolerância no PI-251245, relatado anteriormente como resistente, concluiu que a

herança é devida a um par de genes recessivos denominado *momo*. O mesmo autor concluiu, em teste de alelismo, que a tolerância de Gallega e do PI-251245 era controlada pelos mesmos genes. Este gene não previne infecção viral sistêmica, mas impede o aparecimento de sintomas nas plantas infectadas e o crescimento das mesmas não é afetado, havendo mesmo grande proporção de plantas que escapam da infecção.

Na Europa, os pesquisadores de alface utilizaram a fonte de resistência Gallega para incorporar o par de alelos *gg* em inúmeras cultivares de alface dos tipos manteiga, cabeça crespa, romana e latino. A fonte Egípcia de resistência foi utilizada nos E.U.A. para introduzir resistência em algumas cultivares comerciais de cabeça crespa, tais como Vanguard 75 e Salinas 88 (DINANT & LOT, 1992).

Estudos dos efeitos de LMV, em cultivares comerciais de alface resistentes, foram feitos por WALKEY et al. (1985a), que verificaram a resposta de 16 cultivares de alface, conhecidas por possuírem o gene *mo* de resistência ao LMV. Durante dois anos, algumas cultivares desenvolveram sintomas negligíveis de mosaico após a inoculação e apresentaram baixa quantidade de vírus quando analisadas pelo teste de ELISA, enquanto que outras cultivares apresentaram sintomas mais severos e elevada quantidade de vírus. Com isso mostrou-se que o nível de resistência das cultivares homozigotas para o gene *gg* depende da constituição genética e possivelmente da interação com o meio ambiente.

Em outubro de 1968, o Instituto Agrônomo de Campinas (I.A.C.) introduziu sementes da cultivar Gallega de Invierno e do PI-251245-9 (*Lactuca serriola*), iniciando um programa de melhoramento, visando incorporar resistência ao LMV, em cultivares de alface adaptadas ao mercado brasileiro (NAGAL, 1993). Em 1973, foi liberado a primeira cultivar comercial de alface do tipo manteiga no Brasil denominada de Brasil-48.

Novos lançamentos, visando resistência ao mosaico e características comerciais e adaptadas às condições climáticas do Brasil, incluindo resistência ao calor, foram feitos pelo I.A.C., pela Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz" e companhias privadas de sementes, resultando em várias cultivares, tais como: Brasil-201, Brasil-221, Brasil-303, Vivi, Regina, Aurea, Vanessa, Karina, Gloria, Elisa e Floresta.

MCLEAN & KINSEY (1962, 1963) diferenciaram variantes de LMV baseados na sintomatologia de cultivares suscetíveis de alface e ervilha, classificando-as quanto à agressividade dos sintomas causados.

ZINK et al. (1973) isolaram uma variante de LMV, denominado de LMV-L, que era letal a algumas cultivares de alface, o que mostrou ser virulento na cultivar Gallega, que possui gene de resistência para LMV. Variantes semelhantes ao LMV-L foram também relatadas na Grécia (KYRIAKOPOULOU, 1985), na França (LOT & MAURY-CHOVELON, 1985), nos EUA e Yemen (PINK et al., 1992a). PINK et al. (1992b) diferenciaram cinco isolados de LMV, em três grupos pelos sintomas causados em seis cultivares de alface. O grupo I foi constituído de isolados que infectam a cultivar suscetível Saladin, mas não cultivares com genes de resistência ou nem cultivar Ithaca. O grupo II (denominado patotipo II) foi virulento nas cultivares Saladin e Ithaca, mas não em cultivares com gene de resistência. O grupo III, o que provoca severos sintomas em todas as cultivares, incluindo todas aquelas que carregam os genes *mo* e *g*. O grupo I pode ser considerado o isolado comum de LMV, enquanto os demais grupos constituem-se em novos isolados.

3.2. Vírus do mosqueado do picão (Bidens Mottle Virus - BiMoV)

O Vírus do mosqueado do picão foi descrito pela primeira vez em 1966 na Flórida, EUA, onde foi isolado a partir de *Bidens pilosa* (CHRISTIE et al., 1968). Pertence ao grupo dos potyvirus, possuindo partícula filamentosa flexuosa medindo 720 nm de comprimento e apresenta as seguintes propriedades físicas “in vitro”: Ponto de Inativação Térmica em 10 min. a 50 e 55 °C, Ponto Final de Diluição de 10^{-3} e Longevidade “in vitro” de 16 dias (PURCIFULL et al., 1976). É transmitido de maneira não persistente pelos afídeos: *Aphis craccivora*, *Acysthosiphon pisum*, *Aphis spiraeicola*, *Hyadaplis pseudobrassicae* e *Myzus persicae* (CHRISTIE et al., 1968).

O BiMoV pode infectar 32 espécies em 28 gêneros das 8 famílias: *Acanthaceae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Chenopodiaceae*, *Leguminosae*, *Papaveraceae*, *Solanaceae* e *Verbenaceae* (EDWARDSON & CHRISTIE, 1991b).

A reação de espécies utilizadas como diferenciadoras para diagnose são apresentadas no Quadro 02. Para propagação do vírus é recomendado o híbrido de *Nicotiana clevelandii* com *Nicotiana glutinosa* (PURCIFULL et al., 1976).

O primeiro relato do BiMoV em alface e escarola foi em 1970, na Flórida, onde foi coletado material comercial durante o verão. Para estudar a gama de hospedeiros, foram inoculadas mecânicamente várias espécies, entre elas *Lactuca sativa* cvs. Bibb e Climax, que apresentaram sintomas de manchas cloróticas sistêmicas, mosqueado e paralização do crescimento. Foram observados em *Lactuca serriola* PI-273539 e PI-273431 mosqueado clorótico, necrose e distorção foliar. O BiMoV não é transmitido por semente em alface (PURCIFULL et al., 1971).

QUADRO 02 - Reações de espécies vegetais utilizadas na identificação do vírus do mosqueado do picão (BiMoV).

Espécie	Sintomas	Referências
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LL / MaC / S	PURCIFULL et al. (1971, 1976)
<i>Chenopodium quinoa</i>	MaC / S	PURCIFULL et al. (1971)
<i>Cucurbita pepo</i>	-	EDWARDSON & CHRISTIE (1991b)
<i>Datura stramonium</i>	-	EDWARDSON & CHRISTIE (1991b)
<i>Gomphrena globosa</i>	-	PURCIFULL et al. (1971)
<i>Helianthus annuus</i>	Mq	PURCIFULL et al. (1971)
<i>Lactuca sativa</i>	MaC / S / Mq	PURCIFULL et al. (1971)
<i>Nicotiana clevelandii</i>	+ / Mq	COSTA & DUFFUS (1958); EDWARDSON & CHRISTIE (1991b)
<i>Nicotiana glutinosa</i>	-	EDWARDSON & CHRISTIE (1991b)
<i>Petunia hybrida</i>	+	EDWARDSON & CHRISTIE (1991b)
<i>Pisum sativum</i>	-	CHRISTIE et al. (1968); PURCIFULL et al. (1971)
<i>Zinnia elegans</i>	Mq	PURCIFULL et al. (1976)

LL: lesão local; MaC: mancha clorótica; M: mosaico; Mq: mosqueado; S: sistêmico; -: não hospedeira; +: hospedeira.

Levantamento realizado por ZITTER & GUZMAN (1974), em campos de produção de alface dos Estados Unidos, indicaram a presença de mosaico causado por BiMoV em cultivares de alface do grupo cabeça crespa, bem como em escarola cultivar Full Heart NR65. Inoculações em diferentes populações de alface demonstraram que todas as cultivares com genes de resistência a LMV, provenientes de PI-251245 ou

Gallega, são suscetíveis ao BiMoV. A cultivar Valmaine do grupo de alface romana mostrou-se resistente em teste posterior (ZITTER & GUZMAN, 1977).

3.3. Vírus do mosaico do nabo (Turnip Mosaic Virus - TuMV)

O vírus do mosaico do nabo foi descrito por Gardener & Kendrick (1921) e por Schutz (1921). Está incluído no grupo dos potyvirus por apresentar partícula filamentosa flexuosa, podendo ser transmitido por 40 a 50 espécies de afídeos de maneira não persistente (TOMLINSON, 1970b).

A gama de hospedeiros do vírus é constituída de 318 espécies pertencentes a 156 gêneros e 43 famílias (EDWARDSON & CHRISTIE, 1991c).

Algumas espécies, utilizadas como diferenciadoras para diagnose, mediante os sintomas macroscópicos causados pela presença do vírus na planta, estão apresentadas no Quadro 03.

Para propagação do vírus do mosaico do nabo, são recomendadas as espécies *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa* e *Nicotiana tabacum* (TOMLINSON, 1970b).

Conforme ZINK & DUFFUS (1969), em alface *Lactuca sativa*, esse vírus foi encontrado causando sintoma de mosaico em 1966, no vale de Salinas, Califórnia, EUA, na cultivar Calmar, que apresenta resistência ao míldio causado por *Bremia lactuca* (Welch et al., 1955). Esses autores concluíram que outras cultivares americanas, também resistentes ao míldio, são suscetíveis ao TuMV. Essa associação é

QUADRO 03 - Reações de espécies vegetais utilizadas na identificação do vírus do mosaico do nabo (TuMV).

Espécie	Sintomas	Referência
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LL	ZINK & DUFFUS (1969)
<i>Chenopodium quinoa</i>	LL	ZINK & DUFFUS (1969)
<i>Cucurbita pepo</i>	MaC	PURCIFULL (1968)
<i>Datura stramonium</i>	+	EDWARDSON & CHRISTIE (1991c)
<i>Gomphrena globosa</i>	+	ZINK & DUFFUS (1969)
<i>Helianthus annuus</i>	+	EDWARDSON & CHRISTIE (1991c)
<i>Lactuca sativa</i>	MaC / Mq	ZINK & DUFFUS (1969)
<i>Nicotiana clevelandii</i>	LL	ZINK & DUFFUS (1969)
<i>Nicotiana glutinosa</i>	+	ZINK & DUFFUS (1969)
<i>Petunia hybrida</i>	+	EDWARDSON & CHRISTIE (1991c)
<i>Pisum sativum</i>	+	EDWARDSON & CHRISTIE (1991c)
<i>Zinnia elegans</i>	+	EDWARDSON & CHRISTIE (1991c)

LL: lesão local; MaC: mancha clorótica; Mq: mosqueado; +: hospedeira.

proveniente do PI-91532 de *Lactuca serriola*, que participou da genealogia destas populações, já que cultivares resistentes ao míldio, de origem européia, foram também resistentes ao TuMV.

ZINK & DUFFUS (1969) estudaram a gama de hospedeiro de TuMV e constataram que várias espécies pertencentes às famílias *Aizoaceae*, *Asteraceae*, *Boraginaceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Geraniaceae*, *Chenopodiaceae*, *Leguminosae*, *Malvaceae*, *Papaveraceae*, *Portulacaceae*, *Solanaceae* e *Umbelliferae* são hospedeiras deste vírus.

As propriedades físicas “in vitro” foram obtidas a partir de plantas de alface e nabo infectadas pelo vírus e verificaram-se que o Ponto de Inativação Térmica em 10 min. é a 55 °C; Ponto Final de Diluição a 5^{-4} e Longevidade “in vitro” em temperatura ambiente foi a 48 horas. Observações em microscopia eletrônica constataram a presença de partículas medindo 800 nm de comprimento. O vírus é transmitido mecanicamente com facilidade, não sendo, entretanto, transmitido através de sementes das cultivares Calmar e Valverde.

Os sintomas causados por TuMV em *Lactuca sativa*, inoculada mecanicamente em casa de vegetação, foram iguais aos da cultivar Calmar, infectada naturalmente (ZINK & DUFFUS, 1969). Sintomas precoces consistem em pequenas lesões verde-claras irregulares distribuídas ao acaso entre e próximos das nervuras. Dentro de poucos dias, as lesões cloróticas nas plantas de alface tornam-se numerosas conferindo às folhas uma cor clorótica distinta e um mosqueado grosseiro. A infecção é quase sempre acompanhada pela curvatura da nervura central e distorção assimétrica dos limbos foliares, causando uma atrofia no crescimento de plantas jovens e, ocasionalmente, é letal durante a fase reprodutiva, quando lesões necróticas podem desenvolver-se na haste floral.

3.4. Vírus do mosaico do picão (Bidens Mosaic Virus - BMV)

Foi pela primeira vez relatado no Brasil, no Estado de São Paulo, onde foram realizados estudos através de microscopia eletrônica, mostrando que é um vírus de partícula alongada, de comprimento aproximado de 720 nm por 12 a 13 nm de diâmetro, sendo classificado como um potyvirus. As partículas do vírus foram encontradas em extratos

de plantas de fumo Turkish (*Nicotiana tabacum*), girassol (*Helianthus annuus*), erva-de-Santa-Maria (*Chenopodium ambrosioides*), *Physalis floridana*, *Chenopodium amaranticolor*, fedegoso (*Cassia occidentalis*), cordão-de-frade (*Leonotis nepaetifolia*) e picão (*Bidens pilosa*) (KITAJIMA et al., 1961).

O BMP foi relatado por COSTA & KITAJIMA (1966), infectando plantas de girassol e outras, entre elas a alface.

KUHN et al. (1980) estudaram a transmissão, ciclo de hospedeiro e sintomatologia do VMP e a suscetibilidade de algumas cultivares de alface. O vírus foi facilmente transmitido por inoculação mecânica e pelas espécies de afídeos *Myzus persicae*, *Aphis coreopsidis* e *Dactynotus* sp, de maneira não circulativa e não se verificou a transmissão do vírus através de sementes. Exames no microscópico eletrônico, com preparações "leaf dip", detectaram partículas alongadas e flexuosas com comprimento de 735 nm. Suas propriedades físicas "in vitro" são: Ponto de Inativação Térmica está entre 55 e 60 °C, Ponto Final de Diluição a 10^{-3} e Longevidade "in vitro" é de: 5 dias na temperatura entre 24 a 26 °C ou 21 dias entre 4 a 5 °C. O círculo de hospedeiros de BMP foi testado por esses autores, verificando que somente 5 famílias foram infectadas pelo vírus, quais sejam *Amaranthaceae*, *Asteraceae*, *Chenopodiaceae*, *Leguminosae* e *Solanaceae*.

Algumas espécies utilizadas como diferenciadoras, para diagnose mediante os sintomas macroscópicos causados pelo vírus na planta, podem ser encontradas no Quadro 04.

KUHN et al. (1980), através de transmissão por pulgão *Myzus persicae*, testaram a resistência em cultivares de alface Brasil-48, Brasil-221, White Boston, Crespa Hanson, Babá e Grand Rapids. Todas foram suscetíveis, mas as cultivares White

QUADRO 04 - Reações de espécies vegetais utilizadas na identificação do vírus do mosaico do picão (BMV).

Espécie	Sintomas	Referências
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LL	KUHN et al. (1980)
<i>Chenopodium quinoa</i>	LL	KUHN et al. (1980)
<i>Cucurbita pepo</i>	*	
<i>Datura stramonium</i>	—	KUHN et al. (1980)
<i>Gomphrena globosa</i>	—	KUHN et al. (1980)
<i>Helianthus annuus</i>	MaN / MaC	KUHN et al. (1978, 1980)
<i>Lactuca sativa</i>	M	KUHN et al. (1980)
<i>Nicotiana clevelandii</i>	*	
<i>Nicotiana glutinosa</i>	MaC / S	KUHN et al. (1980)
<i>Nicotiana tabacum</i> TNN	MaC / S	KUHN et al. (1980)
<i>Petunia hybrida</i>	MaC / S	KUHN et al. (1982)
<i>Pisum sativum</i>	M	KUHN et al. (1980)
<i>Zinnia elegans</i>	M	KUHN et al. (1980)

LL: lesão local; M: mosaico; MaC: mancha clorótica; MaN: mancha necrótica; S: sistêmico; —: não hospedeira; *: não encontrada.

Boston, Brasil-48 e Brasil-221 foram as mais prejudicadas, apresentando-se sem valor comercial.

3.5. Vírus do mosaico do pepino (Cucumber Mosaic Virus - CMV)

Cucumber Mosaic Virus (CMV) foi descrito por DOOLITTLE (1916) e JAGGER (1916). Pertence ao grupo dos Cucumovírus, apresentando partícula isométrica, medindo 30 nm de diâmetro, sendo transmitida por 60 espécies de pulgões de

maneira não persistente, entre as quais *Aphis gossypii* e *Myzus persicae* são as mais eficientes. As propriedades físicas "in vitro" desse vírus, a partir de planta de fumo, são: Ponto de Inativação Térmica a 70 °C, Ponto Final de Diluição 10^{-4} e Longevidade "in vitro" de 3 a 6 dias na temperatura de 20 °C (GIBBS & HARRISON, 1970).

A gama de hospedeiros de CMV é ampla, podendo infectar 536 espécies vegetais pertencentes a 53 famílias botânicas e 106 gêneros. A maioria das espécies podem ser enquadradas nas seguintes famílias: *Acanthaceae*, *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Apiaceae*, *Araceae*, *Bignoniaceae*, *Boraginaceae*, *Brassicaceae*, *Bromeliaceae*, *Campanulaceae*, *Cannaceae*, *Capparidaceae*, *Caryophyllaceae*, *Chenopodiaceae*, *Commelinaceae*, *Asteraceae*, *Convolvulaceae*, *Crassulaceae*, *Cucurbitaceae*, *Dipsacaceae*, *Euphorbiaceae*, *Geraniaceae*, *Hydrophyllaceae*, *Iridaceae*, *Lamiaceae*, *Leguminosae*, *Lobeliaceae*, *Lythraceae*, *Moraceae*, *Papilionaceae*, *Poaceae*, *Malvaceae*, *Marantaceae*, *Musaceae*, *Nolanaceae*, *Nyctaginiaceae*, *Oenotheraceae*, *Orchidaceae*, *Papaveraceae*, *Passifloraceae*, *Pedaliaceae*, *Phytolaccaceae*, *Polemoniaceae*, *Polygonaceae*, *Portulacaceae*, *Primulaceae*, *Ranunculaceae*, *Resedaceae*, *Rutaceae*, *Scrophulariaceae*, *Solanaceae*, *Verbenaceae* e *Violaceae* (HORVÁTH, 1980b).

Algumas espécies utilizadas como diferenciadoras para diagnose, mediante os sintomas macroscópicos causados pela presença do vírus na planta, são citados no Quadro 05. Para propagação do vírus as espécies indicadas são *Cucurbita pepo*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana glutinosa* e *Nicotiana tabacum* (GIBBS & HARRISON, 1970).

Este vírus foi relatado em alface pela primeira vez na Nova Zelândia em 1961, onde causou sérios problemas na cultura. O vírus foi identificado como CMV

QUADRO 05 - Reações de espécies vegetais utilizadas na identificação do vírus do mosaico pepino (CMV).

Espécie	Sintomas	Referências
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LN / LL	THOMSON & PROCTER (1966); HORVÁTH et al. (1981)
<i>Chenopodium quinoa</i>	LL	HORVÁTH et al. (1981)
<i>Cucurbita pepo</i>	+	WALKEY et al. (1985b)
<i>Datura stramonium</i>	S	HORVÁTH et al. (1981)
<i>Gomphrena globosa</i>	LL / S	HORVÁTH et al. (1981)
<i>Helianthus annuus</i>	+	HORVÁTH (1980b)
<i>Lactuca sativa</i>	M / Mq	WALKEY et al. (1985b)
<i>Nicotiana clevelandii</i>	+	HORVÁTH (1980b)
<i>Nicotiana glutinosa</i>	LL / S	THOMSON & PROCTER (1966)
<i>Petunia hybrida</i>	+	HORVÁTH (1980b)
<i>Pisum sativum</i>	+	HORVÁTH (1980b)
<i>Zinnia elegans</i>	LN	GIBBS & HARRISON (1970)

LL: lesão local; M: mosaico; Mq: mosqueado; LN: lesão necrótica; S: sistêmico; +: hospedeira.

através de gama de hospedeiros e reação sorológica com o antisoro preparado nos Estados Unidos. A transmissão através de sementes de alface foi negativa (THOMSON & PROCTER, 1966).

Nas cultivares sensíveis, os sintomas de CMV abrangem desde mosqueado a um mosaico moderadamente severo, com distorção foliar e necrose, podendo ocorrer atrofia e a não formação da cabeça. O vírus pode ocorrer sozinho ou juntamente com LMV (WALKEY et al., 1985a).

No Brasil, esse vírus foi relatado em alface por COSTA (1983) ressaltando a pequena importância do mesmo em culturas extensas e isoladas dos hospedeiros.

3.6. Vírus do mosqueado da alface (Lettuce Mottle Virus - LMoV)

Trata-se de um vírus isométrico que causa mosaico sistêmico em alface e foi encontrado primeiramente no Núcleo Rural de Vargem Bonita, Distrito Federal, apresentando propriedades similares ao LMV. Inicialmente foi designado de vírus do mosaico necrótico da alface, mas em função de um melhor estudo de suas propriedades teve a nomenclatura modificada, passando a ser designado por vírus do mosqueado da alface - VMqA (KITAJIMA et al., 1980).

O LMoV foi caracterizado por MARINHO (1982), apresentando partículas de natureza isométrica, de 30 nm de diâmetro, ocorrendo em baixa concentração na preparação de "leaf dip" para microscopia eletrônica. É facilmente transmitido mecanicamente para alface. É transmitido de maneira não persistente pelo pulgão *Hyperomyzus lactucae*, apresentando as seguintes propriedades físicas "in vitro": Ponto de Inativação Térmica está entre 55 a 60 °C, Longevidade "in vitro" de 24 horas a 4° C ou a temperatura ambiente e Ponto Final de Diluição entre 10^{-2} e 10^{-3} . Os testes feitos para estudar a transmissão por sementes foram negativos. Com relação a gama de hospedeiro, conforme MARINHO & KITAJIMA (1986), foram testadas dezenove famílias, compreendendo noventa e quatro espécies e cultivares. Apenas uma espécie de *Amaranthaceae* (*Gomphrena globosa*); três de *Chenopodiaceae* (*Chenopodium*

amaranticolor; *Chenopodium murali* e *Chenopodium quinoa*) e duas de *Asteraceae* (*Lactuca sativa* e *Zinnia elegans*) foram suscetíveis ao LMoV. No caso de *Zinnia elegans*, o sintoma foi latente, sendo recuperado através da retroinoculação em *Chenopodium quinoa* que reage com lesões locais.

Algumas espécies, utilizadas como diferenciadoras para diagnose, mediante os sintomas macroscópicos causados pela presença do vírus na planta, são citadas no Quadro 06.

Em alface, o aparecimento dos primeiros sintomas de mosaico demoram de 10 a 15 dias após a inoculação. As folhas mais jovens apresentam distorções e redução do tamanho, diminuindo a cabeça da alface. MARINHO & KITAJIMA (1986) também estudaram a reação de várias cultivares de alface e constataram que Brasil-48, IAC-4930, Capitan IAC e Cazard IAC-4183 não apresentavam sintomas quando inoculadas mecânicamente, mas multiplicavam o vírus. Esses autores recuperaram o vírus em *Chenopodium quinoa* causando sintoma positivo.

3.7. Vírus do vira-cabeça do tomateiro (Tomato Spotted Wilt Virus - TSWV)

O TSWV foi identificado pela primeira vez em tomate por BRITTLEBANK (1919). Pertence ao grupo chamado Tospovírus, denominação esta que vem sendo recentemente utilizada em substituição ao grupo do vira-cabeça do tomateiro. Apresenta partículas complexas com diâmetro variando entre 70 a 110 nm, circundadas por uma membrana de lipídeos.

QUADRO 06 - Reações de espécies vegetais utilizadas na identificação do vírus do mosqueado da alface (LMoV) na cultura da alface.

Espécie	Sintomas	Referências
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LL / S	MARINHO & KITAJIMA (1986)
<i>Chenopodium quinoa</i>	LL / S	MARINHO & KITAJIMA (1986)
<i>Cucurbita pepo</i>	—	MARINHO & KITAJIMA (1986)
<i>Datura stramonium</i>	—	MARINHO & KITAJIMA (1986)
<i>Gomphrena globosa</i>	LL	MARINHO & KITAJIMA (1986)
<i>Helianthus annuus</i>	—	MARINHO & KITAJIMA (1986)
<i>Lactuca sativa</i>	Mq	KITAJIMA et al. (1980)
<i>Nicotiana clevelandii</i>	—	MARINHO & KITAJIMA (1986)
<i>Nicotiana glutinosa</i>	—	MARINHO & KITAJIMA (1986)
<i>Nicotiana tabacum</i> TNN	—	MARINHO & KITAJIMA (1986)
<i>Petunia hybrida</i>	*	
<i>Pisum sativum</i>	—	MARINHO & KITAJIMA (1986)
<i>Zinnia elegans</i>	Lat	MARINHO & KITAJIMA (1986)

LL: lesão local; Lat: Latente; Mq: mosqueado; S: sistêmico; —: não hospedeira; *: não encontrada.

As espécies de Tospovirus apresentam partículas em baixa concentração nos tecidos de seus hospedeiros, de fácil inativação termal e curta longevidade “in vitro” (AVILA, 1992). Parece ser transmitido por sete espécies de Tripes: *Thrips tabaci* Lindeman (Pittman, 1927); *Frankliniella schultzei* Trybom (Samuel et al., 1930); *F. occidentalis* Pergande (Gardner et al., 1935); *F. fusca* (Sakimura, 1963); *Scirtothrips dorsalis* Hood (Rao et al., 1981); *Thrips sitosus* Moulton (Kobatake et al., 1984) citados por PAVAN (1992) e *Thrips palmi* Karny (YEY, 1992). No Brasil, o vírus do vira-cabeça do tomateiro é transmitido por *Frankliniella schultzei*. Também há relato de que a espécie

Thrips tabaci, que ocorre comumente em plantações de cebola no Estado de São Paulo, é vetor do vírus em outros países (COSTA et al., 1964).

A gama de hospedeiros do TSWV é constituída de 550 espécies, em aproximadamente 70 famílias botânicas incluindo monodicotiledôneas e dicotiledôneas (AVILA, 1992; DURVAL, 1993).

Algumas espécies, utilizadas como diferenciadoras para diagnose, mediante os sintomas macroscópicos causados pela presença do vírus na planta, são citados no Quadro 07.

Para a propagação do vírus, as espécies indicadas são: *Gomphrena globosa*, *Nicotiana rustica*, *N. glutinosa* e *Tropaeolum majus* (Ic, 1970). Na cultura de alface tem sido relatado no Hawaí causando perdas significativas desde a década de 60 onde 50% das culturas de alface foram atingidas independente da época da estação do ano no plantio. A produção de alface tipo crespa (*Lactuca sativa*) e tipo romana (*L. sativa* var. *Longitolia*) foi severamente afetada (CHO et al., 1987).

Outras áreas são citadas, da presença do TSWV em alface na Califórnia (Harris, 1939), Sul da Austrália (Moller & Rogers, 1960), Chile (Docampo & Nome, 1970), e Sul da África (Boelma & Bolton, 1984), citados por O' MALLEY & HARTMAN (1989) e na França por MARCHOUX et al. (1991).

No Brasil, o TSWV é encontrado em alface desde 1939 no sul do país (COSTA, A.S., dados não publicados). A *Lactuca sativa* é relatada como hospedeira naturalmente infectada (COSTA & FORSTER, 1942).

Em 1986, agricultores de Natuba, em Pernambuco, perderam lavouras de alface da cultivar Verdinha, a única plantada na região, pela disseminação da

QUADRO 07 - Reações de espécies vegetais utilizadas na identificação do vírus do vira-cabeça do tomateiro (TSWV).

Espécie	Sintomas	Referências
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LN	AVILA (1992)
<i>Chenopodium quinoa</i>	LC	AVILA (1992)
<i>Cucurbita pepo</i> cv. <i>caserta</i>	LC	FRANCK & HATTA (1981); PAVAN (1992)
<i>Datura stramonium</i>	MaN	COSTA & FOSTER (1942)
<i>Gomphrena globosa</i>	LL	IE (1970), ALLEN et al. (1983)
<i>Helianthus annuus</i>	*	
<i>Lactuca sativa</i>	AN / Mq	MARCHOUX et al. (1991)
<i>Nicotiana clevelandii</i>	LL / S	IE (1970); MARCHOUX et al. (1991)
<i>Nicotiana glutinosa</i>	MaC / MaN	COSTA & FOSTER (1942)
<i>Petunia hybrida</i>	LL	COSTA & FORSTER (1942); MARCHOUX et al. (1991)
<i>Pisum sativum</i>	A N	AVILA (1992)
<i>Zinnia elegans</i>	MaC / Mq	AVILA (1992)

AN: anel necrótico; LC :lesão clorótica; LL: lesão local; LN: lesão necrótica; M: mosaico; MaC: mancha clorótica; MaN: mancha necrótica; Mq: mosqueado; S: sistêmico; *: não encontrada.

virose (MORAES et al., 1988). Em Agudos, Estado de São Paulo foi identificado o TSWV nas cultivares Sem Rival e Crespa Romana (CHAGAS, 1970).

Os sintomas iniciam-se depois de 4 a 7 dias após a inoculação. As plantas apresentam manchas necróticas nas folhas e a infecção se torna sistêmica após 12 a 14 dias (CHO et al., 1987; MACHOUX et al., 1991).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Localização experimental

Os trabalhos foram conduzidos no Departamento de Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agronômicas - Campus de Botucatu - Universidade Estadual Paulista / UNESP.

4.2. Fontes de isolados virais

Os isolados virais foram coletados em cinco regiões produtoras de alface do Estado de São Paulo: Bauru, Campinas, Mogi das Cruzes, São Manoel e Sorocaba, durante o segundo semestre de 1992, totalizando cinquenta e seis amostras (Quadro 08).

Foram coletadas amostras foliares de plantas de alface que

QUADRO 08 - Isolados virais coletados em cultivares de alface com sintomas de mosaico e respectivas procedências e regiões de origem (1992).

AMOSTRA	CULTIVAR	PROCEDÊNCIA	REGIÃO
01	Regina	Asgrow do Brasil	Campinas
02	Regina	Asgrow do Brasil	Campinas
03	Regina	Asgrow do Brasil	Campinas
04	Elisa	Asgrow do Brasil	Campinas
07	Floresta	Kazume	Campinas
08	Floresta	Kazume	Campinas
09	Salinas	Kazume	Campinas
10	Floresta	Maheda	Campinas
11	Floresta	Maheda	Campinas
12	Veronica	Maheda	Campinas
13	Brisa	Wanderley Cavassan	Campinas
14	Floresta	Wanderley Cavassan	Campinas
15	Veronica	Wanderley Cavassan	Campinas
16	Floresta	Wanderley Cavassan	Campinas
17	Floresta	Ariovaldo Takano	Campinas
18	Floresta	Ariovaldo Takano	Campinas
19	Veronica	Seishin Nakazone	Campinas
20	Regina	UNESP	São Manuel
21	Aurora	Jorge Horita	Mogi das Cruzes
22	Aurora	Jorge Horita	Mogi das Cruzes
23	Aurora	Jorge Horita	Mogi das Cruzes
24	Grand Rapids	Jorge Horita	Mogi das Cruzes
25	Elisa	Nilo Umeda	Mogi das Cruzes
26	Floresta	Nilo Umeda	Mogi das Cruzes
27	Mimosa	Nilo Umeda	Mogi das Cruzes
28	Floresta	Nelson Harano	Mogi das Cruzes
29	Veronica	Nelson Harano	Mogi das Cruzes

(Continuação do Quadro 08)

AMOSTRA	CULTIVAR	PROCEDÊNCIA	REGIÃO
30	Floresta	Anisio Kato	Mogi das Cruzes
31	Não Identificado	Mário Tanaka	Mogi das Cruzes
32	Aurea	Jânio Miranda	Bauru
33	Aurea	Fernando Kussagima	Sorocaba
34	Aurea	Fernando Kussagima	Sorocaba
35	Aurea	Fernando Kussagima	Sorocaba
36	Veronica	Fernando Kussagima	Sorocaba
37	Floresta	Jorge Takeuti	Sorocaba
38	Floresta	Jorge Takeuti	Sorocaba
39	Floresta	Jorge Takeuti	Sorocaba
40	Regina	Jorge Takeuti	Sorocaba
41	Regina	Jorge Takeuti	Sorocaba
42	Regina	Jorge Takeuti	Sorocaba
43	Brisa	Jorge Takeuti	Sorocaba
44	Brisa	Jorge Takeuti	Sorocaba
45	Brisa	Jorge Takeuti	Sorocaba
46	Floresta	Cesar Yohoi	Sorocaba
47	Contaminante ^{1/}	Cesar Yohoi	Sorocaba
48	Floresta	Cesar Yohoi	Sorocaba
49	Floresta	Otávio Tikamori	Sorocaba
50	Brisa	Otávio Tikamori	Sorocaba
51	Elisa	Otávio Tikamori	Sorocaba
52	Elisa	Otávio Tikamori	Sorocaba
53	Veronica	Seishin Nakazone	Sorocaba
54	Brasil-303	Seishin Nakazone	Sorocaba
55	Brasil-303	Seishin Nakazone	Sorocaba
56	Brasil-303	Seishin Nakazone	Sorocaba

1 / Planta contaminante, de cultivar não identificado, presente em cultura comercial de alface Grand Rapids.

apresentavam exclusivamente sintomas de mosaico e mosqueado. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, colocadas em caixa de isopor com gelo e transportadas para o laboratório.

4.3. Manutenção dos isolados

As amostras foliares coletadas foram divididas em duas partes para a manutenção dos isolados “in vitro” e “in vivo”.

4.3.1. Manutenção “in vitro”

As amostras foliares com sintomas de mosaico foram cortadas em tiras finas e colocadas em placas de Petri contendo papel de filtro no fundo, sendo em seguida colocadas em dessecadores, com sílica gel e armazenados em refrigerador à temperatura de 4 °C para a desidratação das folhas. O armazenamento das folhas desidratadas contendo o vírus foi efetuado em pequenos frascos esterilizados, previamente preparados com uma camada fina de sílica gel no fundo, sobre algodão e papel de filtro. Os frascos foram vedados, etiquetados e armazenados em freezer a - 20 °C de maneira que as amostras originais permaneceram disponíveis para diagnose, mantendo a infectividade viral.

4.3.2. Manutenção "in vivo"

A manutenção "in vivo" foi inicialmente feita pela inoculação das amostras coletadas em plantas da cultivar Babá. Em todas as multiplicações posteriores utilizou-se a cultivar White Boston. Essas cultivares foram utilizadas por serem suscetíveis ao LMV.

Para a obtenção de plantas multiplicadoras e mantenedoras dos isolados virais foram semeadas sementes em bandejas de isopor com substrato apropriado. Quando as plântulas estavam em torno de 20 dias de idade, foram transplantadas para vasos plásticos de 250 ml. Esse procedimento foi usado para todas as plantas utilizadas neste trabalho.

O substrato para os vasos foi preparado com uma parte de esterco, uma parte de areia lavada e uma parte de solo argiloso, nas quais acrescentou-se 2 Kg de fertilizantes da fórmula 04 - 14 - 08 para cada metro cúbico.

Para a inoculação, o preparo do inóculo consistiu da maceração de parte das amostras foliares, em um almofariz, na presença de tampão de fosfato de sódio 0,05M, pH 7,0, contendo 0,01M de sulfito de sódio, na proporção de 1g de folha fresca infectada para 10 ml de solução de fosfato, tendo sido este procedimento feito com os almofarizes e o tampão submetidos a baixa temperatura. A inoculação foi efetuada por fricção em plântulas de alface com 20 dias de idade, previamente polvilhadas com abrasivo carborundum (600 mesh).

4.4. Identificação dos vírus

Para a identificação dos vírus presentes nas amostras coletadas, foram feitos os seguintes testes: inoculação em hospedeiros diferenciais, teste sorológico, microscopia eletrônica e determinação de propriedades físicas “in vitro”.

4.4.1. Teste em hospedeiros diferenciais

Os isolados coletados no campo, com sintomas de mosaico, multiplicados na cultivar de alface White Boston, foram inoculados mecânicamente como descrito no item 3.3.2, em hospedeiros diferenciais em duas etapas. A reação destes hospedeiros, descritas na literatura, podem ser observadas no Quadro 09.

Na primeira etapa foram escolhidos os seguintes hospedeiros diferenciais: *Chenopodium quinoa*, *Cucurbita pepo* cv. caserta, *Datura stramonium*, *Heliantus annuus*, *Lactuca sativa* cv. White Boston, *Nicotiana glutinosa* e *Petunia hybrida*. Excluindo-se *Chenopodium quinoa*, que é suscetível a todos os vírus descritos que ocorrem em alface, os demais hospedeiros foram utilizados para indicar as presenças de TSWV, TuMV, CMV, BMV e BiMoV.

Uma vez observados os sintomas causados nestes hospedeiros, as amostras originais foram inoculadas em uma segunda etapa nos seguintes hospedeiros: *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa*, *Gomphrena globosa*, *Lactuca sativa* cv. White Boston, *Nicotiana clevelandii*, *Pisum sativum* cv. Triofin e *Zinnia elegans*.

QUADRO 09 - Reações de espécies vegetais utilizadas na identificação dos vírus que causam mosaico, mosqueado e necrose em alface.

Hospedeiros	V Í R U S						
	LMoV	LMV	BiMoV	BMV	CMV	TuMV	TSWV
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LL / S	LL	LL / MaC / S	LL	LL	LL	LN
<i>Chenopodium quinoa</i>	LL / S	LL / S	MaC / S	LL	LL	LL	LC
<i>Cucurbita pepo</i>	-	+	-	*	+	MaC	LC
<i>Datura stramonium</i>	-	-	-	-	S	+	MaN
<i>Gomphrena globosa</i>	LL	LL	-	-	LL / S	+	LL
<i>Helianthus annuus</i>	-	-	Mq	MaC / MaN	+	+	*
<i>Lactuca sativa</i>	Mq	S / MS	MaC / S / Mq	M	M / Mq	MaC	AN / Mq
<i>Nicotiana clevelandii</i>	-	LL	+ / Mq	*	+	+	LL / S
<i>Nicotiana glutinosa</i>	-	-	-	MaC / S	S / LL	+	MaC / MaN
<i>Nicotiana tabacum</i> TNN	-	-	*	MaC / S	*	*	*
<i>Petunia hybrida</i>	*	-	+	MaC / S	+	+	LL
<i>Pisum sativum</i>	-	M	-	M	+	+	AN
<i>Zinnia elegans</i>	Lat	M	Mq	M	LN	+	MaC / Mq

AN: anel necrótico; Lat: latente; LC: lesão clorótica; LL: lesão local; LN: lesão necrótica; M: mosaico; MaC: mancha clorótica; MaN: mancha necrótica; Mq: mosqueado; S: sistêmico; -: não hospedeira; +: hospedeira; *: não encontrada.

Os testes em hospedeiros diferenciais foram repetidos, conforme os resultados das reações, para verificar a repetibilidade dos sintomas manifestados na primeira inoculação, tantas vezes quantas necessárias.

4.4.2. Teste sorológico

Como técnica auxiliar para diagnóstico de LMV nas amostras de alface coletadas, utilizou-se uma modificação da técnica ELISA ("Enzyme Linked Immunosorbent Assay"), denominada de PTA - ELISA ("Plate Trapped Antigen") descrita por MOWART & DAWSON (1987). Para tal foram utilizados os seguintes tampões e soluções:

- Tampão Carbonato: 0,015 M carbonato de sódio e 0,035 M de bicarbonato de sódio, pH 9,6.
- Tampão Fosfato alcalino (PBS): 0,02 M fosfato, 0,15 M de cloreto de sódio, pH 7,4.
- Tampão Fosfato alcalino + Tween (PBS-T): PBS, 0,05% de Tween 20.
- Ácido Dietilditiocarbâmico: DIECA 0,1%.
- Tampão Dietanolamina: 10%, pH 9,8.

As etapas para a execução do teste foram:

- Folhas de alface (0,1g) com sintomas de mosaico, previamente inoculadas com os isolados de vírus coletados no campo, foram maceradas em 1,0 ml de Tampão Carbonato acrescido de DIECA (0,1%), utilizado como um antioxidante. Aliquotas de 100 µl foram colocados na placa de ELISA e incubados por uma hora a 37 °C. Após, enxaguou-se as paredes da placa com PBS-T por 3 vezes. Adicionou-se o anticorpo monoclonal adquirido da AGDIA (Indiana, EUA), específico para LMV, diluído 1 µl /ml em PBS e incubou-se por 1 hora a 37 °C. Após nova lavagem das placas com PBS-T, por 3 vezes, adicionou-se o conjugado de Fosfatase alcalina e IgG anti rato (Sigma) diluída (1 : 5000) em PBS e incubou-se por

uma hora a 37 °C. Após, enxaguou-se as placas com PBS-T, por 3 vezes, adicionou-se 100 µl do substrato (P - Nitrophenyl phosphate 0,6 mg/ml de tampão Dietanolamina 10% pH 9,8) e incubou-se a temperatura ambiente por duas hora no escuro. Como branco foi pipetado 100 µl do substrato em pocinhos limpos. As leituras foram feitas logo após esse procedimento e as placas foram colocadas no refrigerador a 4 °C em "over night" onde foram lidas novamente. O leitor foi ELISA Microplate Reader modelo EL 307c da BIOTEK, utilizando-se filtro de comprimento de onda de 405 nm.

4.4.3. Testes de microscopia eletrônica

Para visualização da morfologia das partículas de vírus presentes, foram feitos testes de microscopia eletrônica utilizando-se plantas de *Chenopodium quinoa* ou alface cultivar White Boston com sintomas, previamente inoculadas com as amostras originais de alface, usando a técnica de Imersão Foliar Rápida ("Leaf dip"), descrito por KITAJIMA (1965). Para diferenciar partículas virais morfologicamente idênticas, mas sorologicamente diferentes, foi utilizada a técnica de Microscopia Eletrônica de Imuno-Adsorção "MEIAD" descrita por VEGA & KUNYUKI (1986). O microscópio eletrônico utilizado foi de transmissão modelo ZEISS EM 10C / CR. A grade para microscopia eletrônica, utilizada na visualização das partículas, foi de cobre com película de Parlodium-carbono. O teste de microscopia eletrônica foi feito em trinta e três amostras das coletadas originalmente, selecionando-se pelo menos uma amostra procedente das diferentes regiões e produtores.

4.4.3.1. Técnica de imersão foliar rápida

A técnica de imersão foliar rápida consistiu em colocar extratos de folha de *Chenopodium quinoa*, infectada com vírus, sobre a grade para microscopia eletrônica contendo uma gota de ácido fosfotúngstico PTA 1% pH 7,0. Após a secagem, com ajuda de papel de filtro, procedeu-se à observação no microscópio eletrônico.

4.4.3.2. Técnica de "MEIAD"

A técnica de MEIAD consistiu em colocar uma gota do antisoro específico para LMV na grade, diluído na proporção de 1 : 1000, deixou-se incubando por 30 minutos, a seguir lavou-se as grades com tampão fosfato, colocou-se uma gota do extrato da planta infectada, incubou-se por duas horas em câmara úmida, novamente procedeu-se à lavagem da grade com tampão fosfato e água destilada. A seguir, contrastou-se com uma gota de Acetato de Uranila a 1% e procedeu-se à observação no microscópio eletrônico.

As técnicas sorológicas e de microscopia eletrônica, executadas neste trabalho, foram desenvolvidas na Seção de Virologia Fitotécnica do Instituto Agrônomo de Campinas - IAC.

4.4.4. Propriedades físicas “in vitro”

Após a identificação dos vírus nas amostras coletadas, selecionaram-se aquelas em que uma única virose encontrava-se presente, para determinar as seguintes propriedades físicas do vírus: Ponto Final de Diluição (P.F.D.), Ponto de Inativação Térmica (P.I.T.) e Longevidade “in vitro” (L.I.V.).

4.4.4.1. Determinação do ponto final de diluição

Para determinação do P.F.D., amostras previamente selecionadas e multiplicadas em alface da cultivar White Boston, foram maceradas em tampão fosfato pH 7,0, na proporção 1 : 1 (g de folha fresca / ml de tampão fosfato). O extrato obtido foi diluído nas seguintes proporções: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} . Estes extratos foram inoculados mecânicamente em plantas de *Chenopodium quinoa*, com aproximadamente 30 dias de idade.

4.4.4.2. Determinação do ponto de inativação térmica

Para determinar o P.I.T., o extrato necessário foi preparado na proporção de 1g de folha da cultivar de alface White Boston infectada para 10 ml de tampão fosfato. A seguir, foram retiradas cinco aliquotas de 2 ml cada e transferidas para 5 tubos de ensaio, submetidos às temperaturas de 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C e 70 °C por 10 minutos

em banho-maria. Após foram resfriados e as aliquotas foram individualmente inoculadas mecânicamente em plantas de *Chenopodium quinoa*, com aproximadamente 30 dias de idade.

4.4.4.3. Determinação da longevidade “in vitro”

Para determinar a L.I.V., o extrato necessário foi preparado na proporção de 1 g de folha de alface da cultivar White Boston infectada por 10 ml de tampão fosfato. A seguir, foram retiradas cinco aliquotas de 2 ml cada e transferidas individualmente para 5 tubos de ensaios. Esses tubos foram colocados em temperatura ambiente e a cada 24 horas, a partir do preparo, o conteúdo de um tubo foi inoculado mecânicamente em plantas de *Chenopodium quinoa*.

Os testes para determinar as propriedades físicas foram acompanhados durante os 30 dias a partir da inoculação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação dos isolados virais por meio de hospedeiros diferenciais

Das cinquenta e seis amostras coletadas nas diferentes regiões produtoras (Quadro 08), cinquenta e quatro induziram sintomas de mosaico quando inoculadas na cultivar de alface Babá. As amostras 05 e 06 não apresentaram sintomas quando inoculadas, resultando na perda destas amostras.

As reações dos sete hospedeiros diferenciais, utilizados na primeira etapa frente à inoculação com os cinquenta e quatro isolados, multiplicados na cultivar de alface White Boston, podem ser observadas no Quadro 10. Por meio da reação positiva de *Chenopodium quinoa* utilizado como controle, quando inoculado com todos os isolados, confirma-se a presença de vírus na planta multiplicadora utilizada como fonte de inóculo.

Comparando-se os resultados obtidos nos demais hospedeiros com aqueles descritos na literatura (Quadro 09), pode-se concluir que nas amostras coletadas não

QUADRO 10 - Reação de hospedeiros diferenciais utilizados na identificação dos vírus presentes nos isolados coletados no campo.

Hospedeiros	Isolados virais														
	01	02	03	04	07	08	09	10	11	12	13	14	15		
<i>Cucurbita pepo</i> cv. caserta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Petunia hybrida</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Nicotiana glutinosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Datura stramonium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Helianthus annuus</i>	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Lactuca sativa</i> cv. W. Boston	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	
<i>Chenopodium quinoa</i>	LL / MCS	MCS	MCS	MCS	MCS	MCS	MCS	MCS	MCS	MCS	MCS	MCS	LL / MCS		

Continua...

MCS: mancha clorótica sistêmica; - sem sintomas

Continua...

LL: lesão local; M: mosaico; MCS: mancha clorótica sistêmica; -: sem sintomas.

Hospedeiros	Isolados virais												
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
<i>Cucurbita pepo</i> cv. caserta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Petunia hybrida</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nicotiana glutinosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Datura stramonium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Helianthus annuus</i>	-	-	M	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-
<i>Lactuca sativa</i> cv. W. Boston	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<i>Chenopodium quinoa</i>	LL / MCS	MCS	LL / MCS	MCS	LL / MCS	MCS	MCS	MCS	LL / MCS	MCS	MCS	MCS	LL / MCS

Continua...

LL: lesão local; M: mosaico; MCS: mancha clorótica sistêmica; -: sem sintomas.

QUADRO 10 - Continuação

Hospedeiros	Isolados virais													
	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
<i>Cucurbita pepo</i> cv. caserta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Petunia hybrida</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nicotiana glutinosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Datura stramonium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Helianthus annuus</i>	-	-	-	M	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactuca sativa</i> cv. W. Boston	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<i>Chenopodium quinoa</i>	LL / MCS	MCS	MCS	LL / MCS	MCS	MCS	MCS	MCS	LL / MCS	MCS	MCS	LL / MCS	MCS	MCS

Continua...

LL: lesão local; M: mosaico; MCS: mancha clorótica sistêmica; -: sem sintomas.

Hospedeiros	Isolados virais													
	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
<i>Cucurbita pepo</i> cv. caserta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Petunia hybrida</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nicotiana glutinosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Datura stramonium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Helianthus annuus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactuca sativa</i> cv. W. Boston	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<i>Chenopodium quinoa</i>	LL / MCS	MCS	LL / MCS	MCS	MCS	LL / MCS	MCS	MCS	LL / MCS	LL / MCS	LL / MCS	MCS	MCS	MCS

LL: lesão local; M: mosaico; MCS: mancha clorótica sistêmica; -: sem sintomas.

foram detectados os vírus TSWV, CMV e TuMV, já que *Cucurbita pepo* cv. Caserta, *Datura stramonium*, *Nicotiana glutinosa* e *Petunia hybrida* não apresentaram sintomas.

Apesar do TSWV ocorrer frequentemente em culturas de alface, segundo MORAIS et al. (1988) e NAGAI (1989), a inexistência deste vírus nas amostras coletadas era de certa forma esperada, já que, na coleta, procurou-se incluir somente plantas com sintomas de mosaico e ausência de necroses e plantas enfezadas, sintomas estes descritos como característicos da presença de TSWV em alface por CHAGAS (1970), CHO et al. (1987), MORAIS et al. (1988).

O vírus do mosaico do nabo, TuMV, até a presente data não foi relatado em alface no Brasil, apesar da sua ocorrência ter sido descrita em outras espécies incluindo várias pertencentes à família Asteraceae (ÁVILA et al., 1980).

O vírus do mosaico do pepino, segundo COSTA (1983), tem ocorrido raramente em culturas de alface, apesar de ter sido frequente nas décadas de 40 e 50. A possível explicação é a tendência atual do cultivo de alface em grandes áreas, em contraposição ao cultivo próximo a plantas ornamentais que funcionavam como reservatório do vírus no passado.

As amostras 09, 18, 22, 32 e 33 induziram leve clareamento de nervuras e mosaico muito fraco em Girassol. Esse sintoma foi sugestivo da presença do vírus do mosqueado do picão (BiMoV) ou do vírus do mosaico do picão (BMV). Tentativas de transmissão em mais três testes complementares não reproduziram os sintomas originalmente observados, que inclusive diferem dos descritos por PURCIFULL et al. (1971) para BiMoV e por KUHN et al. (1978, 1980) para BMV. Deve-se observar ainda que em nenhum dos cinco casos houve manifestação de sintomas em *Petunia hybrida*, hospedeiro de ambos os

vírus, ou em *Nicotiana glutinosa*, hospedeiro de BMV segundo KUHN et al. (1980).

Por meios dos resultados obtidos na primeira etapa, pode-se concluir que as amostras originalmente coletadas apresentavam o vírus do mosqueado da alface (LMoV), vírus do mosaico da alface (LMV) ou misturas de ambos.

Na segunda etapa, as reações de sete hospedeiros inoculados com as amostras originais podem ser observadas no Quadro 11. Mais uma vez *Chenopodium quinoa* e *Lactuca sativa* cv. White Boston apresentaram sintomas para todos os isolados virais, indicando a eficiência da inoculação. Exceto para a amostra número 01, a reação positiva de *Gomphrena globosa*, *Pisum sativum* e *Zinnia elegans* para as demais amostras indicaram a presença de LMV ou infecção mista deste com LMoV.

Segundo MARINHO & KITAJIMA (1986), o LMoV não induz sintomas em *Pisum sativum*, entretanto ausência de sintomas neste hospedeiro quando inoculados com as amostras 07, 09, 13, 16, 17, 21, 22, 30, 38, 40 e 41, não pode ser explicada pela presença exclusiva do vírus do mosqueado da alface, já que, *Zinnia elegans* apresentou mosaico para todas as amostras inoculadas. Segundo MCLEAN & KINSEY (1962), a taxa de infecção e os sintomas causados por LMV em ervilha variam na dependência do isolado utilizado. Além disso, o fato da utilização da cultivar de ervilha Triofin de comportamento desconhecido frente ao LMV poderia explicar a variação dos resultados obtidos. *Chenopodium amaranticolor* e *Nicotiana clevelandii* apresentaram reações inconsistentes quando inoculados com as diferentes amostras, entretanto, esses hospedeiros não são necessários para identificar a presença de LMV ou infecção mista de LMV e LMoV.

QUADRO 11 - Continuação

Hospedeiros	Isolados virais													
	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
<i>Gomphrena globosa</i>	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL
<i>Zinnia elegans</i>	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<i>Pisum sativum</i>	M	-	M	M	M	M	M	M	M	-	M	-	-	M
<i>Nicotiana clevelandii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	LL	-	-	LL	-	-
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	LL	-	LL	-	-	-
<i>Lactuca sativa</i> cv. W. Boston	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<i>Chenopodium quinoa</i>	LL/ MCS	MCS	MCS	LL/ MCS	MCS	MCS	MCS	MCS	LL/ MCS	MCS	MCS	LL/ MCS	MCS	MCS

LL: lesão local; M: mosaico; MCS: mancha clorótica sistêmica; -: sem sintomas.

Continua...

Hospedeiros	Isolados virais													
	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
<i>Gomphrena globosa</i>	LL	LL	LL	LL	LL	-	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL
<i>Zinnia elegans</i>	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<i>Pisum sativum</i>	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<i>Nicotiana clevelandii</i>	-	-	LL	LL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	-	LL	LL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactuca sativa</i> cv. W. Boston	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<i>Chenopodium quinoa</i>	LL/ MCS	MCS	LL/ MCS	MCS	MCS	LL/ MCS	MCS	MCS	LL/ MCS	LL/ MCS	LL/ MCS	MCS	MCS	MCS

LL: lesão local; M: mosaico; MCS: mancha clorótica sistêmica; -: sem sintomas.

A amostra número 01, procedente de Campinas, demonstrou possuir somente o vírus do mosqueado da alface, já que, *Zinnia elegans* não apresentou sintoma de mosaico quando inoculada com essa amostra, mas demonstrou possuir um vírus latente que induziu infecção sistêmica em *Chenopodium quinoa* em teste de retroinoculação.

5.2. Identificação dos isolados virais por meio de teste sorológico

Conforme a leitura da placa de ELISA, os controles positivos apresentaram uma absorbância na faixa de 0,5 a 0,6 e os controles negativos apresentaram leitura de absorbância entre 0,001 a 0,037. Foram consideradas amostras positivas quando a média da absorbância era maior que duas vezes a média do controle negativo. Os resultados do teste sorológico PTA - ELISA para LMV, efetuado nas amostras originais, podem ser observados no Quadro 12.

Quarenta e duas amostras, representando 84% do total das amostras testadas, foram positivas contra o AS-LMV, sendo trinta e uma procedentes de cultivares resistentes a LMV, nove de cultivares suscetíveis e duas de cultivares não identificados. Oito amostras coletadas na maioria de cultivares resistentes, foram sorologicamente negativas contra AS-LMV. Destas, a amostra número 01 confirmou ser portadora do vírus do mosqueado da alface como sugerido por meio de reações dos hospedeiros diferenciais (Quadro 11). As demais amostras (08, 18, 32, 34, 38, 43 e 48), apesar de induzirem sintomas de LMV nos hospedeiros diferenciais, reagiram negativamente contra o AS-LMV.

QUADRO 12 - Reação das amostras procedentes de cultivares de alface resistentes, suscetíveis ao LMV e não identificadas com sintoma de mosaico, com antisoro para o LMV em teste de PTA-ELISA.

Procedência de Amostras	Reação PTA - ELISA para LMV	
	Positiva	Negativa
Cultivares suscetíveis	12, 13, 15, 19, 27, 44, 45, 50, 53.	43
Cultivares resistentes	02, 03, 04, 07, 10, 11, 14, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 28; 30, 33, 35, 37, 39, 40, 41, 42, 46, 49, 51, 52, 54, 55, 56.	01, 08, 18, 32, 34, 38, 48.
Cultivares não identificados	31, 47.	-
TOTAL	42	8

Considerando-se que o teste ELISA não pôde ser executado para o vírus do mosqueado da alface, devido à indisponibilidade de antisoro específico, não foi possível através de sorologia identificar a presença exclusiva de LMV ou a sua mistura com LMoV, entretanto, foi possível confirmar sua presença na maioria das amostras coletadas.

5.3. Identificação dos isolados virais por meio de microscopia eletrônica

Os resultados dos exames de extratos de plantas de *Chenopodium quinoa* com lesões locais e mancha clorótica sistêmica ou de plantas de alface cv. White

Boston com mosaico, inoculadas com trinta e duas amostras individuais em preparações "leaf dip", são apresentados no Quadro 13. Pode-se observar que das trinta e duas amostras, treze apresentaram partículas alongadas; oito partículas isométricas e onze ambos os tipos.

Na amostra número 01, que tanto pela reação de hospedeiros diferencias como pelo resultado negativo na sorologia contra AS-LMV, confirmou-se somente a presença de vírus do mosqueado da alface.

As demais que apresentaram somente partículas isométricas, constituem-se em amostras cujas identidades dos vírus presentes é duvidosa.

As amostras 20, 27, 40, 49 e 53, foram sorologicamente positivas contra AS-LMV, mas partículas filamentosas flexuosas não foram observadas.

Considerando-se que LMV é facilmente observado na microscopia eletrônica, pode-se admitir que multiplicações do isolado original com possível seleção de sintomas ou lesões particulares utilizadas para a microscopia, tenham eliminado o vírus do mosaico da alface. Neste caso, pode-se supor que as amostras apresentam originalmente infecção mista de LMV e LMoV.

As amostras 24 e 29, também possuidoras de partículas isométricas, não foram analisadas sorologicamente contra AS-LMV e, por coerência com os casos discutidos anteriormente, não permitem conclusão definitiva sobre as viroses presentes, exceto estarem infectadas por LMoV.

Das amostras que apresentaram somente partículas flexuosas (Quadro 13), a de número 08 foi sorologicamente negativa contra AS-LMV e, portanto, é duvidosa. As demais apresentaram exclusivamente o vírus do mosaico da alface, já que, associado ao tipo de partícula presente, foram sorologicamente positivas para essa virose.

QUADRO 13 - Morfologia das partículas virais observadas na Microscopia Eletrônica em *Chenopodium quinoa* ou alface White Boston inoculadas com amostras originais de alface com sintoma de mosaico.

Morfologia das partículas	Amostras	Número de amostras
Alongadas e flexuosas	04, 08, 10, 12, 14, 19, 21, 23, 26, 39, 44, 46, 55.	13
Isométricas	01, 20, 24, 27, 29, 40, 49, 53.	8
Alongadas e isométricas	15, 16, 18, 28, 30, 32, 37, 43, 45, 51, 52.	11

Das onze amostras que apresentaram partículas filamentosas e isométricas, oito foram sorologicamente positivas contra AS-LMV, confirmando-se a existência das duas viroses. Entretanto, as amostras 18, 32 e 43 foram sorologicamente negativas contra AS-LMV e, portanto, não permitem conclusões quanto à sua constituição.

Dezenove amostras originais, sendo treze provenientes de cultivares de alface resistentes a LMV (02, 03, 07, 11, 17, 22, 25, 33, 35, 41, 42, 54 e 56), quatro de cultivares suscetíveis (09, 13, 36 e 50) e duas de cultivares não identificados (31 e 47) não foram submetidas a microscopia eletrônica. Pelo resultado dos testes de sorologia e de hospedeiros diferenciais, pode-se concluir que pelo menos o vírus do mosaico da alface está presente, mas, os resultados não permitem inferências à respeito da sua associação ou não com LMoV.

Partículas alongadas flexuosas, características de LMV, de acordo com COUCH & GOLD (1954), partículas isométricas características de LMoV, de acordo com MARINHO (1982), ou misturas de ambas podem ser observadas nas Figuras 01, 02 e 03.

5.4. Identificação dos isolados virais por meio de suas propriedades físicas “in vitro”

O isolado número 14, caracterizado pelos testes sorológicos, microscopia eletrônica e gama de hospedeiro como sendo LMV, apresentou o ponto final de diluição de 10^{-3} , a infectividade perdurou por 2 dias em temperatura ambiente e o ponto de inativação térmica foi a 60 °C (Quadro 14).

O isolado número 01, caracterizado como sendo LMoV, apresentou o seu ponto final de diluição de 10^{-1} , a infectividade perdurou até o 2º dia em temperatura ambiente e o ponto de inativação térmica foi a 60 °C (Quadro 15).

As propriedades físicas “in vitro” obtidos são similares às estabelecidas por TOMLINSON (1970a) para o LMV e por MARINHO & KITAJIMA (1986) para LMoV. Segundo MARINHO (1982), o vírus do mosqueado da alface apresenta propriedades similares ao vírus do mosaico da alface, fato também confirmado pelos resultados obtidos.

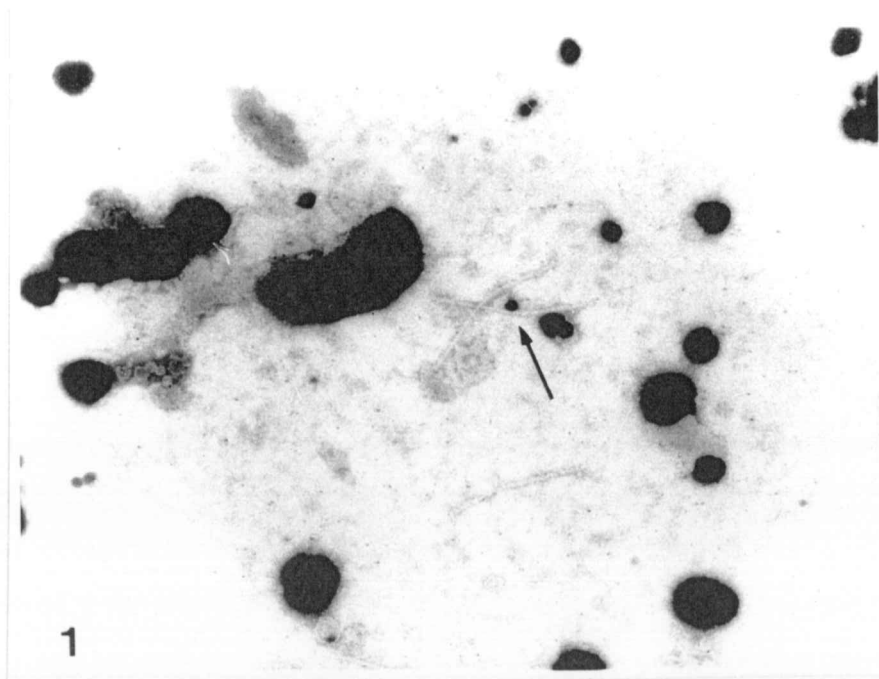


FIGURA 01 - Foto de microscopia eletrônica de extratos de alface cultivar White Boston, infectada por LMV, amostra número 26 (20.000 x).

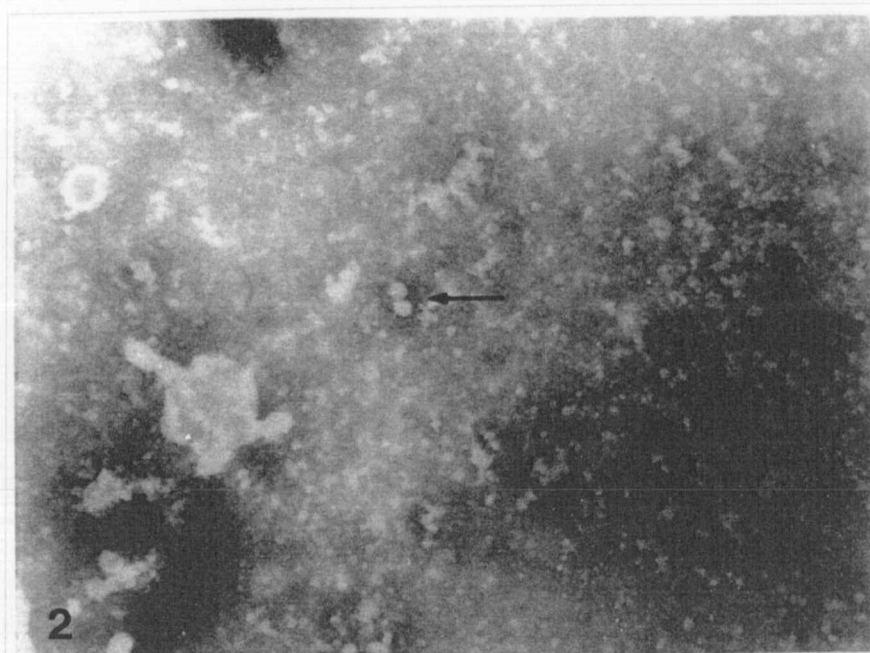


FIGURA 02 - Foto de microscopia eletrônica de extratos de *Chenopodium quinoa* infectado por LMoV, amostra número 01 (50.000 x).

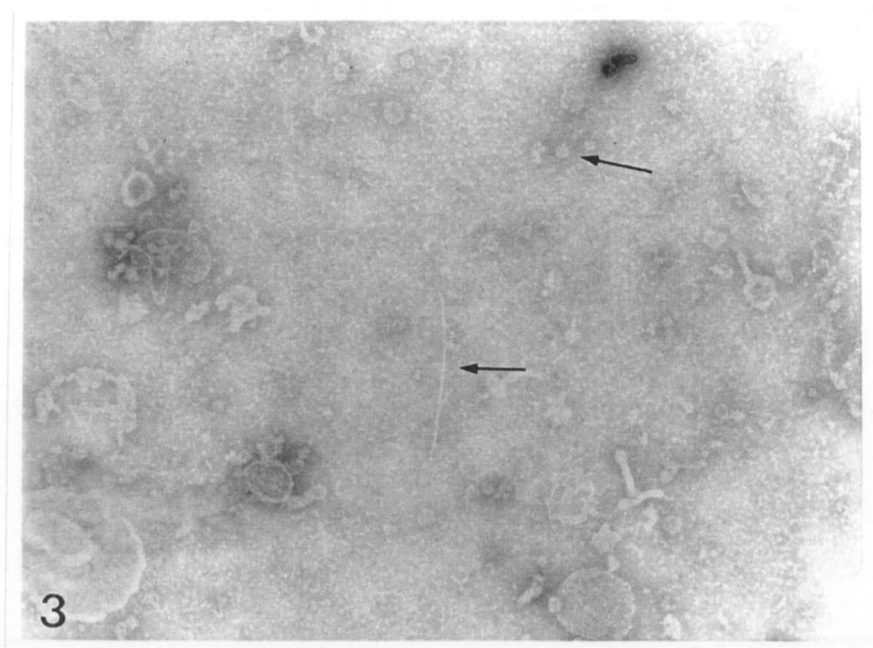


FIGURA 03 - Foto de microscopia eletrônica de extratos de *Chenopodium quinoa* infectado por mistura de LMV e LMoV, amostra número 43 (20.000 x).

5.5. Considerações Gerais

No Quadro 16, estão apresentadas as vinte e uma amostras coletadas de alface com sintomas de mosaico de acordo com a cultivar, procedência e origem de coleta que tiveram as viroses plenamente identificadas conforme o agente causal.

O vírus do mosqueado da alface ocorreu isoladamente ou em combinação com o vírus do mosaico da alface em 42,86% das amostras coletadas. Esses dados são próximos dos 57,14% encontrados por MARINHO (1982), em amostras coletadas em vários locais do Brasil e demonstrou a ocorrência generalizada também nas regiões produtoras de alface do Estado de São Paulo.

QUADRO 14 - Ponto Final de Diluição (P.F.D.), Longevidade 'in vitro' (L.I.V.) e Ponto de Inativação Térmica (P.I.T.) do isolado número 14, inoculado em *Chenopodium quinoa*.

Diluição em água destilada	Plantas infectadas* /inoculadas	Dias após inoculação	Plantas infectadas* /inoculadas	Temperatura em banho maria	Plantas infectadas* /inoculadas
10^{-1}	2/4	0	4/4	50°C	3/4
10^{-2}	3/4	1	3/4	55°C	0/4
10^{-3}	1/4	2	4/4	60°C	1/4
10^{-4}	0/4	3	0/4	65°C	0/4
10^{-5}	0/4	4	0/4	70°C	0/4

*Sintoma de lesão local e mancha clorótica sistêmica

QUADRO 15- Ponto Final de Diluição (P.F.D.), Longevidade 'in vitro' (L.I.V.) e Ponto de Inativação Térmica (P.I.T.) do isolado número 01, inoculado em *Chenopodium quinoa*.

Diluição em água destilada	Plantas infectadas* /inoculadas	Dias após inoculação	Plantas infectadas* /inoculadas	Temperatura em banho maria	Plantas infectadas* /inoculadas
10^{-1}	4/4	0	4/4	50°C	4/4
10^{-2}	0/4	1	3/4	55°C	4/4
10^{-3}	0/4	2	4/4	60°C	1/4
10^{-4}	0/4	3	0/4	65°C	0/4
10^{-5}	0/4	4	0/4	70°C	0/4

* Sintoma de lesão local e mancha clorótica sistêmica.

QUADRO 16 - Vírus identificados em amostras de alface com sintomas de mosaico de acordo com a cultivar, procedência e origem de coleta.

Amostra número	Procedência	Região	Cultivar	Vírus presente
04	ASGROW	Campinas	Elisa	LMV
10	Maheda	Campinas	Floresta	LMV
12	Maheda	Campinas	Verônica	LMV
14	W. Cavassan	Campinas	Floresta	LMV
19	S. Nakazone	Campinas	Verônica	LMV
21	J. Horita	M. das Cruzes	Aurora	LMV
23	J. Horita	M. das Cruzes	Aurora	LMV
26	N. Umeda	M. das Cruzes	Floresta	LMV
39	J. Takeuti	Sorocaba	Floresta	LMV
44	J. Takeuti	Sorocaba	Brisa	LMV
46	C. Yohoi	Sorocaba	Floresta	LMV
55	S. Nakazone	Sorocaba	Brasil-303	LMV
15	W. Cavassan	Campinas	Verônica	LMV + LMoV
16	W. Cavassan	Campinas	Floresta	LMV + LMoV
28	N. Harano	M. das Cruzes	Floresta	LMV + LMoV
30	A. Kato	M. das Cruzes	Floresta	LMV + LMoV
37	J. Takeuti	Sorocaba	Floresta	LMV + LMoV
45	J. Takeuti	Sorocaba	Brisa	LMV + LMoV
51	O. Tikamori	Sorocaba	Elisa	LMV + LMoV
52	O. Tikamori	Sorocaba	Elisa	LMV + LMoV
01	ASGROW	Campinas	Regina	LMoV

Deve-se ressaltar que no trabalho daquela autora, não existe especificação da cultivar na qual as amostras foram coletadas. Os dados do presente trabalho, entretanto, ressaltam que LMoV ocorre indistintamente em cultivares suscetíveis ou

resistentes ao LMV, o que o torna muito importante, por invalidar os esforços no controle de viroses na cultura por meio da utilização exclusiva de cultivares com resistência ao vírus do mosaico da alface.

Programas de melhoramento futuro deverão, portanto, incorporar resistência genética ao LMoV em alface juntamente com resistência para o LMV. Sob este aspecto, MARINHO (1982) encontrou dez cultivares entre vinte e sete testadas, que não mostraram sintomas quando inoculadas com LMoV, entre estas, três cultivares multiplicam o vírus e as demais foram imunes. Estas cultivares poderiam servir como possível fonte de resistência a ser utilizada em programas de melhoramento após serem previamente retestadas.

Um fato inédito foi a ocorrência de LMV em vinte das vinte e uma amostras coletadas que tiveram os vírus presentes plenamente identificados. Somando-se a essas vinte amostras, mais dezenove em que LMV também estava presente, o vírus ocorreu em trinta e nove amostras isoladamente ou em combinação entre quarenta com viroses identificadas, pelo menos parcialmente. Destas quarenta amostras coletadas, vinte e oito foram provenientes de cultivares resistentes, nove de cultivares suscetíveis e duas de cultivares não identificados.

Segundo RYDER (1968) e NAGAI (1971), cultivares resistentes de alface não multiplicam o LMV ou o fazem em pequena porcentagem em função do processo de seleção para obtenção das mesmas. Portanto, a ocorrência de LMV, na grande maioria das amostras provenientes de cultivares resistentes, era de certa forma inesperado.

Deve-se considerar que quando o LMV ocorre em mistura com o LMoV, pode não ser o causador do mosaico presente. No presente trabalho, esse fato ocorreu em oito das vinte e uma amostras cujos vírus foram identificados. Entretanto, ao

analisarem-se as doze amostras em que o vírus do mosaico da alface ocorreu isoladamente, observa-se a existência de nove amostras provenientes de cultivares consideradas resistentes ao LMV, tais como Elisa, Floresta, Aurora e Brasil-303. Essas cultivares, apesar de serem originadas de cruzamentos distintos, possuem todas o mesmo gene para tolerância ao LMV, procedente da cultivar Gallega de Invierno, designado por gg (NAGAI, 1993).

Tal fato indica a ocorrência de isolados de LMV para a qual o gene g não é eficiente. Trabalhos sobre a ocorrência de variantes de LMV, causando mosaico em populações com genes para tolerância procedentes de Gallega ou PI-251245 foram recentemente relatados na Europa por PINK et al. (1992a,b).

Deve-se notar que a distribuição deste isolado de LMV, capaz de causar sintomas em cultivares resistentes no estado de São Paulo, não foi confinada a uma região ou produtor particular, mas encontra-se igualmente distribuída nas regiões de Campinas (41,7%), Mogi das Cruzes (25,0%) e Sorocaba (33,3%).

Futuros estudos são, portanto, necessários para caracterizá-lo, identificar novas fontes de tolerâncias e orientar novos programas de melhoramento de alface que visem solucionar a ocorrência de mosaico em cultivares consideradas resistentes.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- As viroses ocorrentes em alface nas principais regiões produtoras do Estado de São Paulo são causadas exclusivamente pelos vírus do mosaico da alface e vírus do mosqueado da alface.
- O vírus do mosaico da alface é predominante na maioria das amostras, podendo ocorrer isoladamente ou em mistura com o vírus do mosqueado da alface.
- Todas as cultivares de alface resistentes a LMV apresentaram sintoma de mosaico, causado por este vírus, indicando a ocorrência de variante.
- A ocorrência dessa variante é generalizada e semelhante em todas as regiões de onde os materiais foram coletados.

7. SUMMARY

In 1992, 70% of lettuce grown in the State of São Paulo showed mosaic symptoms. Fifty four samples from resistant and susceptible cultivars were collected in the field and inoculate Babá and White Boston lettuce cultivars in the greenhouse. Symptoms observed in these plants were similar to the symptoms seen in the field. In order to characterize these viruses presents in the samples host range tests, electron microscopy ('LEAF-DIP' and 'MEIAD'), and serology ('ELISA') were performed. Symptoms were observed on *Chenopodium quinoa*, *Gomphrena globosa*, *Pisum sativum* and *Zinnia elegans*. Inoculated plants of *Cucurbita pepo* cv Caserta, *Datura Stramonium*, *Nicotiana glutinosa* and *Petunia hybrida*, did not showed symptoms. Electron microscopy revealed the presence of flexous and / or isometric particles. Serology test showed that most of the isolates from resistant varieties reacted with LMV antiserum. The results of these test indicate the presence of LMV in most of the samples assayed. Some samples where infected with lettuce mottle virus alone or mixed with LMV. Since thirty eight samples

were provided from LMV resistant cultivars, the presence of a new isolate of LMV is possible in which the resistant genes were not effective.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ^(1, 2)

AINSWORTH, G.C. , OGILVIE, L. Lettuce mosaic. *Ann. Appl. Biol.*, v.26, p.279-97, 1939.

ALLEN, T.C., Mc. MORRAN, J.P., LOCATELLI, E.A. Isolation of tomato spotted wilt virus from hydrangea and four weed species. *Plant Dis.*, v.67, p.429-30, 1983.

AVILA, A.C., et al. Caracterização de um isolado do vírus do mosaico do nabo obtido de Couve-Manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala* DC) sem sintomas. *Fitopatol. Bras.*, v.5, p.311-28, 1980.

.....

(1) BIOSIS. Serial sources for the BIOSIS previews database. Philadelphia, 1990. 413p.

(2) UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas, Editora UNESP. *Normas para publicações da UNESP*. São Paulo: Editora UNESP, 1994. 4v., v.2. Referências bibliográficas.

- AVILA, A.C. *Diversity of Topovirus*. Wageningen, 1992. 136p. Thesis (Doctor in virology) - Wageningen Agricultural University.
- BANNEROT, H. et al. Etude de l'hérédité de la tolérance au virus de la mosaïque de la laitue chez la variété Gallega de Invierno. Etudes de Virologie. *Ann. de Phytopathol.*, v.1, p.219-26, 1969.
- BRITTLEBANK, C.C. Tomato disease. *J. Agr.*, v.17, p.231-5, 1919.
- CAMARGO, A.M.M.P. et al. Estrategia de ação para a produção orientada de Hortaliças no Estado de São Paulo. *Inf. Econ.*, v.23, n.11, p.45-60, 1993.
- CHAGAS, C.M. Vira cabeça em alface. *Biológico*, v.36, p.256, 1970.
- CHO, J.J. et al. Epidemiology of tomato spotted wilt virus disease on crisphead lettuce in Hawaii. *Plant Dis.*, v.71, n.6, p.505-8, 1987.
- CHRISTIE, S.R., EDWARDSON, J.R., ZETTLER, F.W. Characterization and electron microscopy of a virus isolated from Bidens and Lepidium. *Plant Dis. Rep.* v.52, p.763-8, 1968
- COAKLEY, S.M., CAMPBELL, R.N., KIMBLE K. A. Lettuce mosaic virus causes internal rib necrosis, stimulates rusty brown discoloration in cultivar Climax. *Calif. Agric.* v.9, n.27, p.6-7, 1973.

- COSTA, A.S. Tornou-se rara a ocorrência do vírus do mosaico do pepino em plantações de alface e tomate em São Paulo. *Summa Phytopathol.*, v.9, p.39, 1983.
- COSTA, A.S., DUFFUS, J.E. Observations on Lettuce Mosaic in California. *Plant Dis. Rep.*, v.42, p.583-6, 1958.
- COSTA, A.S., FOSTER, R. Lista de hospedeiros do vírus do vira-cabeça. *Bragantia*, v.2, n.3, p.83-91, 1942.
- COSTA, A.S., KITAJIMA, E.W. Vírus do mosaico do picão ataca girassol. *O Estado de São Paulo*, São Paulo, 30 nov.1966. Suplemento Agrícola, p.13.
- COSTA, A.S., CARVALHO, M. B., COSTA, C.L. Moléstia de vírus do tomateiro. *Boletim do Campo*, v.183, p.8-26, 1964.
- COUCH, H.B.A. Studies on seed transmission of lettuce mosaic virus. *Phytopathology*, v.45, p.63-70, 1955.
- COUCH, H.B.A , GOLD, A.H. Rod-shaped particles associated with Lettuce mosaic. *Phytopathology*, v.44, p.715-7, 1954
- DINANT, S., LOT, H. Lettuce Mosaic Vírus. *Plant Pathol.*, v.41, p.528-42, 1992.
- DOOLITTLE, S.P.A. New infections mosaic disease of cucumber. *Phytopathology*, v.6, p.145, 1916.

DUFFUS, J. E. Two viruses that induce symptoms typical of June Yellows of lettuce. *Plant Dis. Rep.*, v.44, p.406-8, 1960.

DURVAL, C. M. et al. Metodologia de inoculação de Tospovirus visando avaliação de germoplasma de tomate. *Fitopatol. Bras.*, v.18, n.4, p.516-21, 1993.

EDWARDSON, J.R., CHRISTIE, S.R. Lettuce Mosaic virus. In: __. *The potyvirus group*. Gainesville: University of Florida, 1991a. v. 2, p.572-588.

EDWARDSON, J.R., CHRISTIE, S.R. Bidens Mottles Virus. In: __. *The potyvirus group*. Gainesville: University of Florida, 1991b. v. 2, p.378-384.

EDWARDSON, J.R., CHRISTIE, S.R. Turnip. Mosaic Virus. In: __. *The potyvirus group*. Gainesville: University of Florida, 1991c. v. 3, p.973-1007.

FRANCKI, R.I.B., HATTA, T. Tomato spotted wilt virus. In: KURSTAK, E. (ed.). *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*. New York: Elsevier, North Holland Biomedical Press, 1981, p.491-12.

GIBBS, A.J., HARRISON, B.D. Cucumber mosaic virus. In: Commonwealth Agricultural Bureaux Association of Applied Biologists. *Descriptions of plant viruses*, n.1.. Kew 1970.

- GROGAN, R.G. Control of lettuce mosaic with virus-free seed. *Plant Dis.*, v.64, p.446-9, 1980.
- GROGAN, R.G., WELCH, J.E., BARDIN, R. Common lettuce mosaic and its control by the use of mosaic-free seed. *Phytopathology*, v.42, p.573-8, 1952.
- HOLMES, F.O. *Handbook of Phytopathogenic Viruses*. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1937. p.221.
- HORVÁTH, J. Viruses of Lettuce. I Natural Occurrence. *Acta Agron. Hung.*, v.29, p.62-7, 1980a.
- HORVÁTH, J. Viruses of Lettuce. II. Host range of lettuce mosaic virus and cucumber mosaic virus. *Acta Agron. Hung.*, v.29, p.333-52, 1980b.
- HORVÁTH, J. et al. Virus of lettuce III. Isolation and identification of lettuce mosaic virus and cucumber mosaic virus. *Acta Agron. Hung.*, v 30, p.41-86, 1981.
- IE, T. S. Tomato Spotted Wilt Virus. In: Commonwealth Agricultural Bureaux Association of Applied Biologists *Description of plant viruses*, n.39. Kew, 1970.
- JAGGER, I.C. Experiments with the cucumber mosaic disease. *Phytopathology*, v.6, p.148, 1916.

JAGGER, I.C. A transmissible mosaic disease of lettuce. *J. Agr. Res.*, v.20, p.737-41, 1921.

KITAJIMA, E.W. A rapid method to detect particles of spherical plant viruses in fresh preparations. *J. Electron Microsc.*, v.20, p.503-12, 1965.

KITAJIMA, E. W., CARVALHO, A. M. B., COSTA, A. S. Morfologia do vírus do mosaico do picão. *Bragantia*, v.20, p.503-12, 1961.

KITAJIMA, E.W. et al. Mosaico necrótico da alface - Um vírus isométrico transmitido por afídeos. *Fitopatol. Bras.*, v.5, p.409, 1980.

KRAMER, M., ORLANDO, A., SILBERSCHIMIDI. Estudos sobre uma grave doença de vírus, responsável pelo depercimento de nossas culturas de alface. *O Biológico*, v.11, p.121-34, 1945.

KUHN, C.B., LIN, M.T., COSTA, C.L. Transmissão, círculo de hospedeiros e sintomatologia do vírus do mosaico do picão. *Fitopatol. Bras.*, v.5, p.39-50, 1980.

KUHN, G.B., LIN, M.T., KITAJIMA, E.W. Comparação entre o vírus do mosaico do picão e bidens mottle virus. *Fitopatol. Bras.*, v.3, p.93, 1978.

KUHN, C.B., LIN, M.T., KITAJIMA, E.W. Algumas propriedades do vírus do mosaico do picão. *Fitopatol. Bras.*, v.7, p.185-95, 1982.

KYRIAKOPOULOU, P.E. A lethal strain of lettuce mosaic virus in Greece.

Phytoparasitica, v.13, p.271, 1985.

LOT, H. , MAURY-CHOVELON, V. New data on the two major viruses of lettuce in

France: lettuce mosaic virus and beet western yellows virus. *Phytoparasitica*, v.13,

p.277, 1985.

MARCHOUX, G., GÉBRÉ-SELASSIE, K. ,VILLEVIEILLE, M. Detection of tomato

spotted wilt virus and transmission by *Frankliniella occidentalis* in France. *Plant*

Pathol., v.40, p. 347-51, 1991.

MARINHO, V.L.A. *Vírus do mosqueado da alface*. Brasília, 1982. 84p. Dissertação

(Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília.

MARINHO, V.L.A., KITAJIMA, E.W. Vírus do Mosqueado da Alface. Um vírus

isométrico transmitido por afídeos. *Fitopatol. Bras.*, v.11, p.923-35, 1986.

MARROU, J. La mosaïque de la laitue. *Ann. Soc. Nat. Hort. Française*, v.21, p.8-11,

1960.

MARROU, J. Confirmation de la non transmission du virus de la mosaïque de la laitue par

les graines chez la variété Gallega de Invierno. *Ann. de Phytopathol.*, v.1, p.213-8,

1969.

MCLEAN, D.L., KINSEY, M.G. Three variant of lettuce mosaic virus and methods utilized for differentiation. *Phytopathology*, v.52, p.403-6, 1962.

MCLEAN, D.L., KINSEY, M.G. Transmission studies of a highly virulent variant of lettuce mosaic virus. *Plan. Dis. Rep.*, v.47, p.473-6, 1963.

MORAES, J.G., WANDERLEY, J.L., COSTA, A.S. Surto de vira-cabeça na cultura de alface em Pernambuco. *Hort. Bras.*, v.6, p.24-5, 1988.

MOWAT, W.P., DAWSON, S. Detection and identification of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. *J. Virol. Methods*, v.15, p.233-47, 1987.

NAGAI, H. Incorporação de resistência ao vírus do mosaico em alface tipo manteiga. *Arqui. Inst. Biológico*, v.38, p.95-8, 1971.

NAGAI, H. PI-342517 uma introdução de alface com resistência ao vírus de vira-cabeça. *Hort. Bras.*, v.7, p.66, 1989. (resumo 162).

NAGAI, H. Alface tipo manteiga. In: FURLANI A.M.C., VIEGAS J.P. *O melhoramento de plantas no Instituto Agrônômico*. 1ed. Campinas: IAC, 1993. p.204-21.

NEWBALL, A.G. Seed transmission of lettuce mosaic. *Phytopathology*, v.13, p.104-6, 1923.

O' MALLEY, P.J., HARTMANN, R.W. Resistance to tomato spotted wilt virus in lettuce.

HortScience, v.24, p.360-2, 1989.

PAHLEN, A., CRNKO, J. El virus del mosaico de la lechuga (*Marmor lactucae* Holmes)

en Mendoza y Buenos Aires. *Rev. Invest. Agropec. Ser.*, v. 2, p.25-31, 1965.

PAVAN, A. M. *Sintomas de vira-cabeça só em frutos: explicação do fato com base no estudo de alguns parâmetros relacionados com a epidemiologia de doença.*

Piracicaba, 1992. 93p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

PINK, D.A.C., KOSTOVA, D., WALKEY, D.G.A. Differentiation of strains of lettuce mosaic virus. *Plant Pathol.*, v.41, p.5-12, 1992a.

PINK, D.A.C., LOT, H., JOHNSON, R. Novel pathotypes of lettuce mosaic virus breakdown of a durable resistente. *Euphytica*, v.63, p.169-74, 1992b.

PURCIFULL, D.E. Occurrence of turnip mosaic virus in Florida. *Plant Dis. Rep.*, v.52, p.759-60, 1968.

PURCIFULL, D.E., CHRISTIE, S.R., ZITTER, T.A. Bidens mottle virus. In:

Commonwealth Agricultural Bureaux Association of Applied Biologists. *Descriptions of Plant Viruses*, n.161. Kew, 1976.

PURCIFULL, D.E. et al. Natural infection of lettuce and endive by Bidens mottle virus.

Plant Dis., v.55, p.1061-3, 1971.

RYDER, E.J. Transmission of common lettuce mosaic virus through the gametes of lettuce

plants. *Plant Dis. Rep.*, v.48, p.522-3, 1964.

RYDER, E.J. Evaluation of lettuce varieties and breeding lines for resistance to common

lettuce mosaic. *U. S. Dep. Agric. Tech. Bull.*, v.1391, p.18, 1968.

RYDER, E.J. Inheritance of resistance to common lettuce mosaic. *J. Amer. Soc. Hort.*

Sci., v.95, p.378-9, 1970.

RYDER, E.J. Seed transmission of lettuce mosaic virus in mosaic resistant lettuce. *J. Amer.*

Soc. Hort. Sci., v.98, p.610-4, 1973.

SÃO PAULO (Estado). Coordenadoria de Abastecimento. *Perfil dos hortigranjeiros*

comercializados no ETSP: verduras. São Paulo, 1990. v.3, 174p.

SMITH, K.M. A Textbook of Plant Virus Diseases. London: J & A. London Churchill,

1937. p.615.

THONSON, A.D., PROCTER, C.H. Cucumber mosaic virus in lettuce. *N. Z. J. Agric.*

Res., v.9, p.142-4, 1966.

TOMLINSON, J.A. Purification of lettuce mosaic virus. *Nature*, v.193, p.299, 1962.

- TOMLINSON, J.A. Lettuce mosaic virus. In: Commonwealth Agricultural Bureaux Association of Applied Biologists. *Descriptions of Plant Viruses, n.9*. Kew, 1970a.
- TOMLINSON, J.A. Turnip mosaic virus. In: Commonwealth Agricultural Bureaux Association of Applied Biologists. *Descriptions of Plant Viruses, n.8*. Kew, 1970b.
- VEGA, J., KUNIYUKI, H. Aperfeiçoamento da técnica de MELAD para detecção do vírus do mosaico do Traviú. *Summa Phytopathol.*, v.12, p.14, 1986 (Resumo).
- WALKEY, D.G.A., WARD, C.M., PHELPS, K. Studies on lettuce mosaic virus resistance in commercial lettuce cultivars. *Plant Pathol.*, v.34, p.545-51, 1985a.
- WALKEY, D.G.A., WARD, C.M., PHELPS, K. The reaction of lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivares to cucumber mosaic virus. *J. Agric. Sci.*, v.105, p.291-7, 1985b.
- YEH, S. Identification of tomato spotted wilt-like virus infecting watermelon in Taiwan. *Plant Dis.* v.76, p.835-40, 1992.
- ZINK, F.W., DUFFUS, J.E. Relationship of turnip mosaic virus susceptibility and downy mildew (*Bremia lactucae*) resistance in lettuce. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, v.94, n.4, p.403-7, 1969.
- ZINK, F.W., DUFFUS, J.E., KIMBLE, K.A. Relationship of a non-lethal reaction to a virulent isolate of lettuce mosaic virus and turnip mosaic susceptibility in lettuce. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, v.1, n. 98, p.41-5, 1973.

ZINK, F.W., GROGAN, R.G., WELCH, J.E. The effect of the percentage of seed transmission upon subsequent spread of lettuce mosaic virus. *Phytopathology*, v.46, p.662-4, 1956.

ZITTER, A.T., GUZMAN, V.L. An incidence of lettuce mosaic and bidens mottle viruses in lettuce and ecarole fields in Florida. *Plant Dis. Rep.*, v.58, p.1087-91, 1974.

ZITTER, A.T., GUZMAN, V.L. Evaluation of cos lettuce crosses, endive cultivars, and cichorium introductions for resistance to bidens mottle virus. *Plant Dis. Rep.*, v.61, p.767-70, 1977.