

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**VARIABILIDADE DO VÍRUS DO MOSAICO DA ALFACE E
COMPORTAMENTO DE CULTIVARES TOLERANTES
DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.)**

Eng^a Agr^a OLITA SALATI STANGARLIN

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

**BOTUCATU - SP
Fevereiro - 1997**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**VARIABILIDADE DO VÍRUS DO MOSAICO DA ALFACE E
COMPORTAMENTO DE CULTIVARES TOLERANTES DE
ALFACE (*Lactuca sativa* L.)**

Eng^a. Agr^a. OLITA SALATI STANGARLIN

Orientador: Prof. Dr. NORBERTO DA SILVA

Coorientador: Prof. Dr. MARCELO AGENOR PAVAN

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

BOTUCATU - SP
Fevereiro - 1997

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIENCIAS AGRONOMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

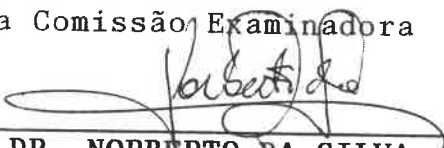
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TITULO: "VARIABILIDADE DO VÍRUS DO MOSAICO DA ALFACE E COMPORTAMENTO
DE CULTIVARES TOLERANTES DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.)"

AUTOR: OLITA SALATI STANGARLIN

ORIENTADOR: PROF.DR. NORBERTO DA SILVA

Aprovado pela Comissão Examinadora



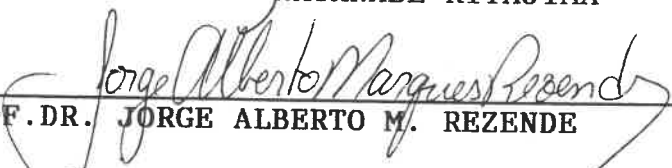
PROF.DR. NORBERTO DA SILVA



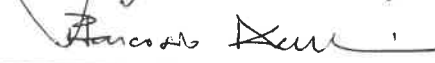
PROFA.DRA. RUMY GOTO



PROF. DR. ELLIOT WATANABE KITAJIMA



PROF.DR. JORGE ALBERTO M. REZENDE



DR. PAULO DELLA VECCHIA

Data da Realização: 21 / FEVEREIRO / 1997

Aos meus pais Affonso e Lenny,

Aos meus irmãos Eloisa, Afonso, Marcelo e Raquel,

Às minhas tias Anesiades, Naia, Olga e Zuma,

Pelo constante estímulo.

AGRADEÇO

Ao meu companheiro Márcio,

Aos meus filhos Guilherme, Tiago, Tais e Carina,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Norberto da Silva, pela orientação, apoio e amizade, pelos ensinamentos necessários para que pudesse realizar mais este trabalho.

Ao Professor Dr. Marcelo Agenor Pavan, pela coorientação, ensinamento, amizade e pela convivência durante esses anos.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Aos docentes do Departamento de Defesa Fitossanitária pela contribuição à minha formação e ensinamentos recebidos, Professores Drs. Chukichi Kurozawa, Antonio Carlos Maringoni, Edson Luiz Furtado e Nilton Luiz de Souza.

Aos Drs. Paulo Cesar Tavares de Mello, Paulo Della Vecchia, Sérgio Mitsuo Ishikava e Jorge Ikuta, pelo auxílio na coleta das amostras virais.

Ao Dr. Álvaro Santos Costa da seção de Virologia Fitotécnica do Instituto Agronômico de Campinas por ceder o isolado padrão do vírus do mosaico da alface.

Ao Dr. Francisco Murilo Zerbini do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa por ceder o isolado patótipo II do vírus do mosaico da alface.

À seção de Virologia Fitotécnica do Instituto Agronômico de Campinas, por permitir o uso do microscópio eletrônico.

À pesquisadora Sandra Maria Mansur Scagliuse, pela ajuda na microscopia eletrônica.

Ao Instituto de Biociências, Seção de Microscopia Eletrônica, UNESP - Botucatu.

Ao Dr. Márcio José Stangarlin pela ajuda na digitação da tese.

Aos jovens Guilherme e Tiago Salati Stangarlin pela ajuda na digitação dos dados durante esses anos.

Aos meus colegas virologistas, Alexandre e Ilza pela convivência durante esses anos.

Aos casais Paulo e Marleide, Raimunda e Gusmão pelo apoio e incentivo.

Ao funcionário Ciro Venâncio de Oliveira, do Departamento de Agricultura e Melhoramento Vegetal, pelo auxílio nas diversas atividades experimentais.

Aos funcionários do Departamento de Defesa Fitossanitária pela atenção durante esses anos.

Aos funcionários da Fazenda Experimental de São Manuel pela colaboração, principalmente aos funcionários Nilton Aparecido de Moraes e José Luiz Zanela.

Aos funcionários da biblioteca pela atenção, em particular à Célia Regina Inoue pelas devidas correções nas referências bibliográficas.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pela dedicada atenção.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	X
1. RESUMO.....	1
2. INTRODUÇÃO.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1. Morfologia e propriedades físicas.....	6
3.2. Mecanismos de disseminação.....	6
3.3. Gama de hospedeiros.....	8
3.4. Sintomatologia em alface.....	12
3.5. Tolerância ao LMV em alface.....	13
3.6. Variabilidade do LMV.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1. Localização experimental.....	23
4.2. Obtenção de isolados do LMV utilizados.....	24
4.2.1. Obtenção do LMV e determinação da taxa de transmissão via sementes.....	24
4.2.2. Obtenção de isolados monolesionais do LMV.....	26
4.2.3. Técnicas de inoculação e manutenção do LMV.....	27
4.3. Caracterização dos isolados do LMV.....	28
4.3.1. Reações de hospedeiros diferenciais.....	28
4.3.2. Determinação de propriedades físicas.....	29

4.3.3. Microscopia eletrônica.....	31
4.4. Determinação da variabilidade de isolados do LMV.....	32
4.4.1. Isolados obtidos através de sementes de alface.....	32
4.4.2. Isolados monolesionais.....	33
4.5. Tolerância ao LMV em cultivares de alface.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1. Variabilidade de isolados do LMV e transmissão por sementes.....	36
5.2. Tolerância ao LMV em cultivares de alface.....	50
6. CONCLUSÕES.....	60
7. SUMMARY.....	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 01 - Relação de espécies vegetais que podem ser infectadas pelo vírus do mosaico da alface e respectivas famílias botânicas.....	9
QUADRO 02 - Reações de espécies vegetais mais utilizadas na identificação do vírus do mosaico da alface.....	11
QUADRO 03 - Reações de cultivares de alface em função dos patótipos do LMV (Pink et al., 1992b).....	19
QUADRO 04 - Isolados virais coletados de plântulas de alface cultivar Babá de verão com sintoma de mosaico e respectiva identificação: nº do isolado, cultivar original, procedência e região.....	25
QUADRO 05 - Cultivares de alface testadas para a reação aos patótipos II e IV do LMV, (sensu Pink et al., 1992b), procedência e reação esperada ao patótipo II.....	35
QUADRO 06 - Porcentagem de transmissão do LMV através de sementes de alface cultivar Babá de verão, inoculadas mecanicamente e com sintomas de mosaico. Botucatu, 1993.....	37
QUADRO 07 - Reação de hospedeiros diferenciais a isolados de vírus causadores de mosaico em alface, obtidos de plântulas sintomáticas provenientes de sementes de plantas de alface cultivar Babá de verão previamente inoculadas.....	39
QUADRO 08 - Propriedades físicas dos isolados causadores de mosaico em alface, obtidos de plântulas sintomáticas provenientes de sementes de plantas de alface cultivar Babá de verão	

previamente inoculadas.....	40
QUADRO 09 - Reação de cultivares de alface e <i>Chenopodium quinoa</i> a isolados do LMV obtidos de plântulas sintomáticas provenientes de sementes de plantas de alface cultivar Babá de verão previamente inoculadas.....	43
QUADRO 10 - Reação de cultivares de alface e <i>Chenopodium quinoa</i> a isolados monolesionais do LMV comparativamente ao patótipo II. Resultados expressos em número de plantas com sintomas/número de plantas inoculadas. Botucatu (1994).....	46
QUADRO 11 - Reação de genótipos de alface a isolados monolesionais do LMV comparativamente ao patótipo II. Resultados expressos em porcentagem de plantas com sintomas de mosaico.....	47
QUADRO 12 - Patótipos identificados em isolados monolesionais do LMV, com base em cultivares diferenciais de alface, segundo critério de Pink et al. (1992b).....	48
QUADRO 13 - Propriedades físicas comparativas ao patótipo II (típico) e o isolado L ₇ representante do patótipo IV.....	51
QUADRO 14 - Reação comparativa de hospedeiros diferenciais ao patótipo II (RR) e ao isolado representante do patótipo IV (L ₇).....	52
QUADRO 15 - Reações das cultivares introduzidas de alface ao patótipo II e IV do LMV, expressa em porcentagem de plantas com sintomas de mosaico.....	53
QUADRO 16 - Reações das cultivares nacionais de alface ao patótipo II e IV do LMV, expressa em porcentagem de plantas com sintomas de mosaico.....	54

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Reação da cultivar Brasil-303 ao patótipo II (a) e IV (b) do LMV.....	56
FIGURA 2 - Reação das cultivares Gallega de Invierno (a) e Vanguard-75 (b) ao patótipo IV do LMV.....	59

1. RESUMO

Com objetivo de se estudar a variabilidade do vírus do mosaico da alface “Lettuce mosaic virus” - LMV nos plantios comerciais do Estado de São Paulo, 32 isolados obtidos em condições de campo foram inoculados na cultivar suscetível de alface Babá de verão. A recuperação de plântulas através de sementes das plantas infectadas garantiu a obtenção de isolados do LMV isentos de outros vírus que afetam a cultura. A caracterização e a confirmação do LMV foi feita por meio de hospedeiros diferenciais, propriedades físicas e microscopia eletrônica.

A presença de sintomas em cultivares portadores de genes de tolerância ao LMV foi o indicativo que patótipos do vírus, diferentes do tipo comum (patótipo II), ocorrem em condições de campo em São Paulo.

Visando identificar quais os patótipos presentes de acordo com o conceito de Pink et al. (1992b), isolados monolesionais obtidos por repetidas inoculações em *Chenopodium amaranticolor* e *C. quinoa*, foram inoculados em cultivares diferenciadoras internacionais de alface (Salinas, Gallega de Invierno, Malika, Calona, Salinas-88, Vanguard-75 e Ithaca).

Constatou-se a presença dos patótipos II e III e na maioria dos casos do patótipo IV, para o qual não existe fonte de tolerância descrita em *Lactuca sativa*.

Trinta e nove cultivares introduzidas e nacionais de alface foram simultaneamente e isoladamente testadas para a reação aos patótipos II e IV. A maioria das cultivares introduzidas da Europa, tolerantes ao LMV, bem como a cultivar Gallega de Invierno, utilizada como fonte original de tolerância no desenvolvimento dessas cultivares, foram assintomáticas para o patótipo II do LMV. As cultivares nacionais consideradas como tolerantes a este mesmo patótipo, foram suscetíveis (Brasil-303, Regina-440), variáveis (Brasil-48, Brasil-202, Karina, Elisa) ou uniformemente tolerantes (Aurea, Aurora, Glória, Floresta e Vanessa). Todas as cultivares testadas tanto nacionais como introduzidas foram suscetíveis ao patótipo IV.

2. INTRODUÇÃO

O mosaico da alface causado pelo vírus do mosaico da alface, “Lettuce mosaic virus” - LMV, foi por muitos anos uma das doenças de maior importância em alface, devido a facilidade de disseminação por afídeos vetores e transmissão por sementes infectadas. O LMV foi primeiramente descrito na Flórida por Jagger (1921) e no Brasil por Kramer et al. (1945). Nas nossas condições deixou de ser problema em plantios comerciais após a introdução de cultivares nacionais possuidoras dos genes “gg” provenientes da cultivar argentina Gallega de Invierno (Nagai, 1979). Apesar desta tolerância ter durado por mais de vinte e cinco anos, nos últimos anos tem-se observado grande porcentagem de mosaico em plantios comerciais de alface em cultivares tolerantes ao LMV.

Stangarlin et al. (1995) identificaram os vírus presentes nestas cultivares tolerantes sintomáticas e constataram que os sintomas observados não podem ser atribuídos exclusivamente à vírus diferentes do LMV, pois este foi encontrado na maioria das amostras coletadas. Paralelamente trabalhos desenvolvidos em outros países apontam para a variabilidade do LMV com a existência de diferentes patótipos para os quais os genes de tolerância conhecidos não são efetivos (Kyriakopoulou, 1985; Dinant & Lot, 1992; Pink et al., 1992a,b. e Bos et al., 1994). Esta hipótese já havia também sido levantada por Stangarlin et al. (1995).

O objetivo do presente trabalho é verificar a ocorrência de patótipos do LMV no Estado de São Paulo, responsáveis pela ocorrência de mosaico em cultivares tolerantes de alface e verificar o comportamento das cultivares nacionais e introduzidas para os mesmos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

O vírus do mosaico da alface é 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 o vírus foi denominado de *Lactuca virus 1* (Smith, 1937), *Marmor lactucae* e finalmente *Lettuce mosaic virus* (LMV) por Ainsworth & Ogilvie (1939). O LMV foi observado pela primeira vez em microscópio eletrônico por Couch & Gold (1954). Em 1950, o mosaico causado por LMV foi considerado a doença de maior importância em alface na Europa e nos Estados Unidos. Atualmente encontra-se disseminado por todo o mundo, provavelmente tendo sido levado a outros países por meio de sementes infectadas (Horváth, 1980a, Dinant & Lot, 1992). No Brasil, o vírus do mosaico da alface foi relatado pela primeira vez por Kramer et al. (1945).

3.1. Morfologia e propriedades físicas

O vírus do mosaico da alface, “Lettuce mosaic virus” - LMV pertence ao gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae* (Murphy et al., 1995), possuindo partículas filamentosas e flexuosas, com dimensões aproximadas de 730x13 nm. Suas propriedades físicas “in vitro”, utilizando-se extrato de alface como hospedeira, são: ponto de inativação térmica entre 55 e 60°C; ponto final de diluição entre 10^{-1} e 10^{-2} e longevidade “in vitro” a 20°C de 1 a 2 dias. Variações em torno desses valores foram observados por outros autores e citados por Edwardson & Crhristie (1991) tais como: ponto de inativação térmica entre 52 e 62°C (Lahdenpura, 1981; Horváth et al., 1981); ponto final de diluição 10^{-1} a 10^{-6} (Cannizzaro et al., 1975; Horváth et al., 1981); longevidade “in vitro” de 1 a 8 dias (Klinkowski & Uschdraweit, 1968a; Cannizzaro et al., 1975).

3.2. Mecanismos de disseminação

A disseminação do LMV pode ocorrer por meio das sementes obtidas de plantas infectadas, ou por afídeos de maneira não persistente e pode ser feita por várias espécies entre as quais: *Acyrtosiphon pelargonii*, *A. pisum*, *A. scariolo*, *A. scarioli barri*, *Aphis fafragulae*, *A. gossypii*, *A. sambuci*, *Aulacorthum*

barri, *A. pelagonii*, *A. scariolae*, *A. solani*, *Brachycaudus tragopogonis*, *Cerosipha gossypii*, *Dactynotus sonchi*, *Dysaulacorthum pseudosolanii*, *Hyperomyzus lactucae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *M. solanifolii*, *Myzus hiracii*, *M. persicae*, *Nasonovia ribis-nigri* e *Pemphigus bursarius*, sendo o *Myzus persicae* o mais eficiente (Edwardson & Christie, 1991)

O primeiro relato de transmissão do LMV por semente de alface foi feito por Newball (1923). Estudos posteriores indicaram que essa taxa de transmissão é baixa, podendo variar de 4,03 a 11,31% entre plantas infectadas da cultivar Bibb (Couch, 1955), de 1 a 12% entre cultivares suscetíveis, ou o vírus não ser transmitido por cultivares tolerantes de alface (Marrou, 1969; Ryder, 1973).

Segundo Ryder (1964) plantas infectadas, cultivadas a altas temperaturas, transmitem o vírus em porcentagem menor do que quando comparado à plantas cultivadas em baixas temperaturas.

Quando a transmissão ocorre, o LMV localiza-se no embrião, pericarpo ou endosperma, sempre em baixa concentração (Ryder, 1973; Lot & Deogratias, 1991), podendo ainda ser transmitido por grãos de pólen e óvulos (Ryder, 1964).

Além de espécies do gênero *Lactuca*, *Chenopodium quinoa* e *Senecio vulgaris* podem também transmitir o LMV por meio de suas sementes (Edwardson & Christie, 1991).

3.3. Gama de hospedeiros

Segundo Horváth (1980b) o LMV apresenta uma ampla gama de hospedeiros, compreendendo 120 espécies vegetais pertencentes a 60 gêneros e 16 famílias botânicas, podendo ser observadas no Quadro 01, tais como relacionadas por Edwardson & Christie (1991).

Recentemente, em Salinas Valley na Califórnia foi relatada nova hospedeira do LMV, *Gazania* spp., comprovada por teste sorológico e transmissão por afídeos, *Myzus persicae* (Zerbini et al., 1993).

Entre as espécies citadas, algumas são mais comumente utilizadas como diferenciadoras para diagnose do LMV, mediante os sintomas macroscópicos, causados pela presença do vírus na planta (Quadro 02).

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

QUADRO 01 - Relação de espécies vegetais que podem ser infectadas pelo vírus do mosaico da alface e respectivas famílias botânicas.

Espécie	Família	Espécie	Família	Espécie	Família	Espécie	Família
<i>Amaranthus caudatus</i>	Amaranthaceae	<i>Calendula algeriensis</i>	Compositae	<i>Chenopodium capitatum</i>	Chenopodiaceae	<i>Dimorphotheca sinuata</i>	Compositae
<i>Ammobium alatum</i>	Compositae	<i>Calendula arvensis</i>	Compositae	<i>Chenopodium murale</i>	Chenopodiaceae	<i>Emilia coccinea</i>	Compositae
<i>Anacychis clavatus</i>	Compositae	<i>Calendula fulgida</i>	Compositae	<i>Chenopodium quinoa</i>	Chenopodiaceae	<i>Erodium cicutarium</i>	Geraniaceae
<i>Anacychis officinarum</i>	Compositae	<i>Calendula officinalis</i>	Compositae	<i>Chenopodium rubrum</i>	Chenopodiaceae	<i>Felicia amelloides</i>	Compositae
<i>Anagallis arvensis</i>	Primulaceae	<i>Callistephus chinensis</i>	Compositae	<i>Chenopodium segetum</i>	Chenopodiaceae	<i>Galinsoga ciliata</i>	Compositae
<i>Anchusa officinalis</i>	Boraginaceae	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Cruciferae	<i>Chenopodium urdicum</i>	Chenopodiaceae	<i>Galinsoga parviflora</i>	Compositae
<i>Anthemis arvensis</i>	Compositae	<i>Carduus broteri</i>	Compositae	<i>Chrysanthemum coronarium</i>	Compositae	<i>Gomphrena decumbens</i>	Amaranthaceae
<i>Anthemis tinctoria</i>	Compositae	<i>Carthamus lanatus</i>	Compositae	<i>Cichorium endiva</i>	Compositae	<i>Gomphrena globosa</i>	Amaranthaceae
<i>Aster sp.</i>	Compositae	<i>Carthamus tinctorius</i>	Compositae	<i>Cichorium intybus</i>	Compositae	<i>Guizothia abyssinica</i>	Compositae
<i>Baeria californica</i>	Compositae	<i>Centaurea cyanus</i>	Compositae	<i>Clandanthus arabicus</i>	Compositae	<i>Helipterum roseum</i>	Compositae
<i>Baeria maritima</i>	Compositae	<i>Centaurea solstitialis</i>	Compositae	<i>Coreopsis tinctoria</i>	Compositae	<i>Iberis umbellata</i>	Cruciferae
<i>Bellis perennis</i>	Compositae	<i>Chenopodium album</i>	Chenopodiaceae	<i>Crepis setosa</i>	Compositae	<i>Lactuca altaica</i>	Compositae
<i>Beta vulgaris</i>	Chenopodiaceae	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Chenopodiaceae	<i>Cucurbita pepo</i>	Cucurbitaceae	<i>Lactuca augustana</i>	Compositae
<i>Brachycome ideridifolia</i>	Compositae	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Chenopodiaceae	<i>Dimorphotheca aurantiaca</i>	Compositae	<i>Lactuca capensis</i>	Compositae
<i>Brachycome pachyptera</i>	Compositae	<i>Chenopodium aristatum</i>	Chenopodiaceae	<i>Dimorphotheca pluvialis</i>	Compositae	<i>Lactuca dissecta</i>	Compositae

QUADRO 01 - Continuação

Espécie	Família	Espécie	Família	Espécie	Família	Espécie	Família
<i>Lactuca dracogllossa</i>	Compositae	<i>Lactuca tatarica</i>	Compositae	<i>Primula malacoides</i>	Primulaceae	<i>Taraxacum echinata</i>	Aizoaceae
<i>Lactuca gracogllossa</i>	Compositae	<i>Lactuca tuberosa</i>	Compositae	<i>Primula obconica</i>	Primulaceae	<i>Taraxacum eremaea</i>	Aizoaceae
<i>Lactuca kochiana</i>	Compositae	<i>Lactuca virosa</i>	Compositae	<i>Proboscidae jussieui</i>	Martyniaceae	<i>Taraxacum expansa</i>	Aizoaceae
<i>Lactuca lavida</i>	Compositae	<i>Lamium amplexicale</i>	Labiatae	<i>Rumex britannica</i>	Polygonaceae	<i>Tolpis barbata</i>	Compositae
<i>Lactuca longifolia</i>	Compositae	<i>Lathyrus odoratus</i>	Leguminosae	<i>Senecio cruentus</i>	Compositae	<i>Tragopogon parvifolius</i>	Compositae
<i>Lactuca macrorrhiza</i>	Compositae	<i>Malva parviflora</i>	Malvaceae	<i>Senecio vulgaris</i>	Compositae	<i>Trifolium incarnatum</i>	Leguminosae
<i>Lactuca muralis</i>	Compositae	<i>Melilotus italica</i>	Leguminosae	<i>Silybum marianum</i>	Compositae	<i>Urospermum picroides</i>	Compositae
<i>Lactuca perennis</i>	Compositae	<i>Mycelis muralis</i>	Compositae	<i>Sonchus asper</i>	Compositae	<i>Xeranthemum annuum</i>	Compositae
<i>Lactuca quercina</i>	Compositae	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Solanaceae	<i>Sonchus glaucescens</i>	Compositae	<i>Zinnia elegans</i>	Compositae
<i>Lactuca raddeana</i>	Compositae	<i>Nicotiana clevelandii</i>	Solanaceae	<i>Sonchus oleraceus</i>	Compositae	<i>Zinnia haageana</i>	Compositae
<i>Lactuca salinga</i>	Compositae	<i>Nicotiana x edwardsonii</i>	Solanaceae	<i>Spinacia oleraceae</i>	Chenopodiaceae	<i>Zinnia multiflora</i>	Compositae
<i>Lactuca sativa</i>	Compositae	<i>Nicotiana tabacum</i>	Solanaceae	<i>Stellaria media</i>	Caryophyllaceae	<i>Zinnia pauciflora</i>	Compositae
<i>Lactuca sativa</i> var. capitata	Compositae	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Leguminosae	<i>Tagetes erecta</i>	Compositae	<i>Zinnia pumila</i>	Compositae
<i>Lactuca sativa</i> var. romana	Compositae	<i>Picris echioides</i>	Compositae	<i>Taraxacum bicornis</i>	Compositae	<i>Zinnia tenuiflora</i>	Compositae
<i>Lactuca serriola</i>	Compositae	<i>Pisum sativum</i>	Leguminosae	<i>Taraxacum officinale</i>	Compositae	<i>Zinnia verticillata</i>	Compositae

QUADRO 02 - Reações de espécies vegetais mais utilizadas na identificação do vírus do mosaico da alface.

Espécies	Sintomas	Referências
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LL	Costa & Duffus (1958); Tomlinson (1970)
<i>Chenopodium quinoa</i>	LL / S MCS	Tomlinson (1970); Marinho (1982); Stangarlin (1995a)
<i>Cucurbita pepo</i>	+	Horváth (1980b)
<i>Datura stramonium</i>	-	Costa & Duffus (1958); Edwardson & Christie (1991)
<i>Gomphrena globosa</i>	LL	Tomlinson (1970); Marinho (1982)
<i>Helianthus annuus</i>	-	Edwardson & Christie (1991)
<i>Lactuca sativa</i>	M	Kramer et al. (1945); Tomlinson (1970)
<i>Nicotiana benthamiana</i>	M	Zerbini et al (1993)
<i>Nicotiana clevelandii</i>	LL	Costa & Duffus (1958); Marinho (1982)
<i>Nicotiana glutinosa</i>	-	Costa & Duffus (1958); Edwardson & Christie (1991)
<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; MCS: mancha clorótica sistêmica; -: não hospedeira; +: hospedeira.

3.4. Sintomatologia em alface

Os sintomas causados por LMV em cultivares de alfaces suscetíveis foram relatados por: Ainsworth & Ogilvie (1939); Grogan et al. (1952); Marrou (1960); Tomlinson (1962, 1970). Os sintomas em alface do grupo Manteiga, na fase adulta podem ser: mosqueado, distorções, amarelecimento foliar, e em alguns casos de necrose das nervuras na dependência da cultivar, resultando em má formação ou distorção das cabeças. Clareamento das nervuras 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 inclinam-se para o centro.

Em cultivares de alface de folhas crespas, o mosaico e o clareamento das nervuras 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 Yellow”, que ocorre em cultivares de alface do grupo americano e que consiste no amarelecimento das folhas da saia e redução do crescimento das plantas é atribuído por Grogan (1980) ao LMV. Entretanto, alguns autores, discordam que este vírus seja o único responsável por esta síndrome e sugerem que o vírus do amarelo da beterraba “Beet western yellow virus” pode estar

envolvido (Duffus, 1960). Na cultivar Clímax, o LMV induz 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 infectadas no período juvenil, que 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 e as plantas produzem menor quantidade de sementes (Zink et al., 1973).

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

3.5. Tolerância ao LMV em alface

A tolerância ao LMV em alface foi primeiramente identificada na cultivar argentina Gallega de Invierno por von der Pahlen & Crnko (1965). Marrou (1969) demonstrou que esta tolerância é caracterizada pela multiplicação do vírus e

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”.

Uma segunda fonte de tolerância ao LMV, foi descrita por Ryder (1968) em três introduções de *Lactuca serriola* provenientes do Egito. Ryder (1970), estudando a herança da tolerância de uma das introduções (PI-251245) concluiu ser esta devida a um par de genes recessivos denominado “momo” alelos do par “gg”, descrito anteriormente. O gene “mo” também não previne infecção viral sistêmica, mas impede o aparecimento de sintomas nas plantas infectadas cujo crescimento não é afetado, havendo grande proporção de plantas que escapam da infecção.

Na Europa a maioria das cultivares de alface tolerantes ao LMV possuem o par de alelos “gg”, provenientes da cultivar Gallega de Invierno, enquanto que, o PI-251245 foi utilizado nos Estados Unidos para a obtenção de cultivares do grupo americano com genes de tolerância, tais como Vanguard-75 e Salinas-88 (Dinant & Lot, 1992).

Estudos sobre os efeitos do LMV em cultivares comerciais de alface tolerantes foram feitos por Walkey et al. (1985), verificando a resposta de 16 cultivares de alface, conhecidas por possuírem o gene “mo” de tolerância ao vírus. Os sintomas e a quantidade de vírus presentes variaram em função da época de

inoculação e da constituição genética da cultivar, já que todas eram homozigotas para os alelos condicionadores da tolerância.

Lot & Deogratias (1991) mostraram que os genes “g” e “mo” são de fato alelos diferentes, mas genes estreitamente unidos. Um estudo da situação entre cultivares contendo as duas fontes de tolerância indicou que o gene “mo” pode conferir imunidade para certos isolados, enquanto o gene “g” não.

No Brasil, o Instituto Agronômico de Campinas introduziu em 1968 sementes da cultivar Gallega de Invierno e do PI- 251245, iniciando um programa de melhoramento visando incorporar tolerância ao LMV em cultivares de alface do grupo Manteiga adaptadas ao mercado brasileiro. Em 1973, foi liberada a primeira cultivar comercial denominada de Brasil-48. Em 1977, foram lançadas novas cultivares do mesmo grupo denominadas de Brasil-202 e Brasil-221, todas originárias de gerações avançadas do cruzamento entre Gallega de Invierno e White Boston, com um retrocruzamento para White Boston (Nagai, 1993).

Após o surgimento de uma nova cultivar francesa denominada de Aurélia, suscetível ao LMV, mas de cabeça grande e maior valor comercial, novos cruzamentos foram feitos envolvendo Brasil-202 e Aurélia. Duas progênes avançadas foram liberadas pelo IAC e denominadas Brasil-303 e Brasil-311 (Nagai, 1980).

Nesta mesma linha de pesquisa o Instituto de Genética da ESALQ-USP, desenvolveu a cultivar Vivi, originária do cruzamento da geração F₇ entre as cultivares Sem Rival e Monstreuse Ronde d'été com Brasil-48, visando a associação entre resistência ao calor e tolerância ao LMV (Costa & Silva, 1976). A partir do mesmo cruzamento foi obtida a cultivar Regina.

Novos programas de melhoramento visando tolerância ao mosaico, características comerciais e adaptação às condições climáticas do Brasil, incluindo resistência ao calor, foram desenvolvidos por companhias privadas de sementes, resultando em várias cultivares tais como: Aurea, Aurora, Vanessa, Karina, Glória, Elisa e Floresta.

3.6. Variabilidade do LMV

Além do isolado típico do LMV, Mclean & Kinsey (1962, 1963) diferenciaram quatro outros isolados do vírus, com base nos sintomas causados nas cultivares de alface Great Lakes e Parris Island e em ervilha. Como os autores utilizaram cultivares sem genes de tolerância ao mosaico, a classificação dos isolados foi feita com base na agressividade dos mesmos.

Zink et al. (1973) foram os primeiros autores a relatar a ocorrência de um isolado do LMV obtido de *Helminthia echiioides*, letal a algumas cultivares de

alface sem genes de tolerância ao mosaico, bem como virulento para a cultivar Gallega de Invierno portadora do gene “g” de tolerância. Os autores denominaram este isolado de LMV-L. Isolados desse tipo, de início, parecem não terem sido muito comuns, já que isolados semelhantes ao LMV-L foram relatados na Grécia (Kyriakopoulou, 1985), na França (Lot & Maury-Chovelon, 1985), nos Estados Unidos e no Yemen (Pink et al., 1992a) tornando duradoura a tolerância das cultivares comerciais de alface utilizadas até então.

Pink et al. (1992a), foram os primeiros autores a observarem a reação das cultivares de alface com genes de tolerância provenientes de Gallega de Invierno (Malika e Calona) ou do PI-251245 (Salinas-88 e Vanguard-75), juntamente com as cultivares suscetíveis Saladin e Ithaca, quando inoculadas com isolados do LMV coletados em diferentes países.

Ao lado de isolados que não causaram sintomas em cultivares com genes de tolerância, provenientes das fontes originais (considerados “tipo comum”), foram encontrados outros que induziram mosaico em todas as cultivares testadas. Surpreendentemente, a cultivar Ithaca, considerada como suscetível ao LMV, não apresentou sintomas de mosaico quando inoculada com um isolado que infectou Saladin, outra cultivar suscetível, demonstrando que Ithaca é portadora de um segundo gene de tolerância efetivo para alguns isolados, e não descrito anteriormente.

Com base nestes resultados, os autores propuseram a existência de 3 grupos de isolados do LMV, que podem ser distinguidos com base nas cultivares diferenciais utilizadas. Paralelamente a este trabalho, Dinant & Lot (1992) relataram a ocorrência de um novo variante do LMV isolado de chicória (*Cichorium intybus*) virulento à cultivares de alface possuidoras de genes de tolerância provenientes de Gallega de Invierno, mas avirulento para as portadoras do gene proveniente do PI-251245, evidenciando pela primeira vez que os genes “g” e “mo” não são idênticos.

A descoberta de variabilidade em LMV, levou Pink et al. (1992b) a reorganizarem a identificação dos isolados com base em cinco cultivares diferenciais de alface (Quadro 03). Utilizando essas cultivares, quatro variantes do LMV para virulência, incluindo o relatado por Dinant & Lot (1992), e que os autores denominaram de patótipos, puderam ser identificados.

Bos et al. (1994) após identificarem 5 isolados do LMV procedentes da Holanda e de outros países, por meio de sorologia e hospedeiros diferenciais, inocularam os mesmos em diferentes cultivares de alface, incluindo as diferenciadoras utilizadas por Pink et al. (1992b). Concluíram que, apesar de todos os isolados apresentarem identidade sorológica sem grandes variações, o mesmo não aconteceu quando outras propriedades biológicas foram comparadas. Grandes variações nos sintomas causados e na concentração do vírus, testado por meio de

QUADRO 03 - Reações de cultivares de alface em função dos patótipos do LMV (Pink et al., 1992b)

Cultivar	Genótipos	Patótipos do LMV			
		I	II	III	IV
Saladin	mo ⁺ ₁ mo ⁺ ₁ Mo ⁺ ₂ Mo ⁺ ₂	S	S	S	S
Ithaca	mo ⁺ ₁ mo ⁺ ₁ Mo ₂ Mo ₂	R	S	S	S
Malika	mo ¹ ₁ mo ¹ ₁ Mo ⁺ ₂ Mo ⁺ ₂	R	R	S	S
Salinas-88	mo ² ₁ mo ² ₁ Mo ⁺ ₂ Mo ⁺ ₂	R	R	R	S
Vanguard-75	mo ² ₁ mo ² ₁ Mo ₂ Mo ₂	R	R	R	S

S: suscetível R: resistente.

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), foram observados em *Chenopodium amaranticolor*, *Nicotiana benthamiana*, *Cichorium intybus*, *Pisum sativum* e *Lactuca sativa*.

Após definirem patótipo como variações na patogenicidade de diferentes isolados quando testados em uma série de cultivares diferenciais, e à semelhança de Pink et al. (1992b), considerarem plantas assintomáticas como resistentes e com sintomas suscetíveis, os autores identificaram quatro grupos de patótipos com a série diferencial de alface utilizada. Um isolado foi identificado como patótipo I, dois como patótipo II e um isolado como patótipo IV. Um dos isolados obtidos de *Cichorium intibys*, originário da Grécia, não pode ser incluído entre os quatro patótipos anteriormente descritos, já que não causou sintomas de

mosaico nas cultivares Ithaca e Vanguard-75, mas causou mosaico severo em Salinas-88 e Gallega de Invierno. Tal isolado, portanto, pode ser classificado como um novo patótipo, não anteriormante descrito, já que a reação das cultivares de alface foi diferente com os demais patótipos (Quadro 03).

Bos et al. (1994) observaram que a classificação de patótipos só pode ser feita quando a reação do hospedeiro à inoculação com LMV é feita com base na presença ou ausência de sintomas de mosaico. Após estudarem a presença e multiplicação do vírus em plantas assintomáticas, por meio de ELISA, os autores encontraram grande variação na reação das cultivares de alface, variando desde a ausência até a alta concentração de partículas virais comparável, à de plantas com sintomas de mosaico. Diante deste fato, propuseram um sistema de avaliação que considera as relações entre patógenos e hospedeiros de forma mais complexa. Sob este aspecto, definiram patogenicidade como resultado da somatória entre a agressividade e a virulência do vírus, sendo a agressividade relacionada com a capacidade do vírus de multiplicar-se nas plantas, avaliado por meio de ELISA, e virulência a capacidade do vírus de provocar sintomas da doença.

Por outro lado as reações do hospedeiro podem ser consideradas como combinações da presença do vírus com a presença de sintomas; sob o argumento de que plantas assintomáticas, mas que permitem alta multiplicação viral

podem ter o desenvolvimento tão prejudicado como plantas com fortes sintomas de mosaico, normalmente consideradas como suscetíveis.

Quando se considera o sistema proposto, logicamente a variabilidade de isolados do LMV varia grandemente, e o sistema de Pink et al. (1992b) perde o significado.

Stangarlin et al. (1995), visitando as regiões produtoras de alface do Estado de São Paulo em 1992, constataram que em torno de 70% de plantas de alface de cultivares tolerantes ao LMV apresentaram-se com sintomas de mosaico. Foram coletadas amostras provenientes de cultivares tolerantes e suscetíveis, que quando inoculadas nas cultivares Babá de verão 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 “ISEM”) e sorologia (ELISA). Quando inoculadas em diferentes hospedeiros, causaram sintomas em *Chenopodium quinoa*, *Gomphrena globosa*, *Pisum sativum* e *Zinnia elegans*. Os hospedeiros *Cucurbita pepo* cv. Caserta, *Petunia hybrida*, *Datura stramonium* L., e *Nicotiana glutinosa* não apresentaram sintomas após a inoculação. A microscopia eletrônica diagnosticou a presença de partículas filamentosas flexuosas ou isométricas ou ambas. No teste sorológico a maioria dos isolados provenientes de variedades tolerantes reagiu positivamente com anti-soro do LMV. Sendo assim, os resultados permitiram

concluir a presença do LMV na maioria das amostras e alguns casos de vírus do mosqueado com infecção mista ou isolada. Como a maioria das amostras foram provenientes de cultivares tolerantes, admitiu-se a presença de patótipos do LMV para as quais os genes de tolerância presentes não foram efetivos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Localização experimental

Os trabalhos experimentais foram conduzidos no Departamento de Defesa Fitossanitária e na Fazenda Experimental São Manuel, da Faculdade de Ciências Agrônomicas - Campus de Botucatu - Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Os testes de microscopia eletrônica foram feitos na seção de Virologia Fitotécnica do Instituto Agronômico de Campinas, e no Instituto de Biociências, Seção de Microscopia Eletrônica, UNESP - Botucatu.

4.2. Obtenção de isolados do LMV utilizados

4.2.1. Obtenção do LMV e determinação da taxa de transmissão via sementes

No presente trabalho utilizaram-se 32 isolados virais (Quadro 04), de plantas de alface com sintomas de mosaico, coletados em 1992 de diferentes regiões do Estado de São Paulo, que foram devidamente identificados através de: microscopia eletrônica (LEAF- DIP e ISEM), sorologia (ELISA), utilizando anti-soro policlonal da AGDIA e gama de hospedeiro, de ser o vírus do mosaico da alface (Stangarlin, 1995). Mesmo assim, considerando a possibilidade de que muitas das amostras originais apresentavam o vírus do mosqueado do alface associado ao LMV, procedeu-se à recuperação exclusiva do LMV pela passagem das mesmas através de sementes e recuperação de plântulas com sintomas. Para tal, plântulas da cultivar de alface Babá de verão, suscetíveis ao LMV, foram individualmente inoculadas com cada uma das 32 amostras originais coletadas, após 20 dias da semeadura. As plantas com sintomas de mosaico foram mantidas em casa de vegetação até o estado de produção de semente. Após a coleta das sementes, as mesmas foram semeadas em bandejas de poliestireno com 128 células. Todas as

QUADRO 04 - Isolados virais coletados de plântulas de alface cultivar Babá de verão com sintoma de mosaico e respectiva identificação: nº do isolado, cultivar original, procedência e região.

Nº do Isolado	Cultivar de Alface Original	Procedência	Região
3	Regina	Asgrow do Brasil	Campinas
4	Elisa	Asgrow do Brasil	Campinas
7	Floresta	Kazume	Campinas
9	Salinas	Kazume	Campinas
10	Floresta	Maheda	Campinas
11	Floresta	Maheda	Campinas
12	Verônica	Maheda	Campinas
13	Brisa	Wanderley Cavassan	Campinas
14	Floresta	Wanderley Cavassan	Campinas
15	Verônica	Wanderley Cavassan	Campinas
16	Floresta	Wanderley Cavassan	Campinas
17	Floresta	Ariovaldo Takano	Campinas
19	Verônica	Seishin Nakazone	Campinas
20	Regina	UNESP - São Manoel	Botucatu
21	Aurora	Jorge Horita	Mogi das Cruzes
22	Aurora	Jorge Horita	Mogi das Cruzes
26	Floresta	Nilo Umeda	Mogi das Cruzes
27	Mimosa	Nilo Umeda	Mogi das Cruzes
33	Aurea	Fernando Kussagima	Sorocaba
35	Aurea	Fernando Kussagima	Sorocaba
36	Verônica	Fernando Kussagima	Sorocaba
37	Floresta	Jorge Takeuti	Sorocaba
39	Floresta	Jorge Takeuti	Sorocaba
40	Regina	Jorge Takeuti	Sorocaba
41	Regina	Jorge Takeuti	Sorocaba
42	Regina	Jorge Takeuti	Sorocaba
44	Brisa	Jorge Takeuti	Sorocaba
46	Floresta	Cesar Yohoi	Sorocaba
47	Contaminante	Cesar Yohoi	Sorocaba
52	Elisa	Otávio Tikamori	Sorocaba
53	Verônica	Seishin Nakazone	Sorocaba
54	Brasil-303	Seishin Nakazone	Sorocaba

plântulas, obtidas com sintomas de mosaico, dentro de cada amostra original coletada, foram misturadas e designadas com o número original da amostra, seguido da letra “S” para indicar a passagem via semente.

4.2.2. Obtenção de isolados monolesionais do LMV

Para a obtenção de isolados monolesionais do LMV, uma mistura de folhas de plântulas de alface com sintomas de mosaico das 32 amostras originais passadas via semente, foi inoculada em *Chenopodium amaranticolor*. Vinte e uma lesões locais foram individualmente retiradas das folhas com auxílio de um furador flambado, maceradas em 1 ml de tampão fosfato e inoculadas separadamente em 21 plantas de *C. quinoa* para multiplicação do inóculo. Após o aparecimento dos sintomas, cada isolado por meio de inoculação mecânica foi novamente inoculado separadamente em *C. amaranticolor*. Este procedimento, repetido mais duas vezes, mantendo-se a identidade da lesão original, permitiu após a terceira passagem em *C. amaranticolor* e *C. quinoa*, a obtenção de vinte e um isolados monolesionais do LMV, cuja identidade foi posteriormente confirmada.

4.2.3. Técnicas de inoculação e manutenção do LMV

Para a inoculação de plântulas nas diferentes fases experimentais, o inóculo foi preparado pela maceração de folhas de hospedeiro infectado em almofariz na presença de tampão de fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0, contendo 0,01 M de sulfito de sódio, utilizando-se 1g de folha fresca infectada para 10 ml de solução, com os almofarizes e o tampão submetidos a baixa temperatura. A inoculação dos diferentes hospedeiros, foi efetuada por fricção das folhas previamente polvilhadas com abrasivo carborundum (600 mesh). A manutenção tanto dos isolados do LMV obtidos via sementes, como dos monolesionais foi feita em tecido desidratado e “in vivo”.

Para a manutenção em tecido desidratado, plântulas de alface cultivar Babá de verão com sintomas de mosaico foram cortadas em tiras finas, colocadas em placas de Petri contendo papel de filtro no fundo, colocadas em dissecadores com sílica gel e armazenadas em refrigerador à temperatura de 4°C para desidratação das folhas. O armazenamento das folhas desidratadas contendo o vírus foi efetuado sobre o papel e algodão, em pequenos frascos esterilizados, previamente preparados com uma camada fina de sílica gel no fundo. Os frascos foram vedados, etiquetados e armazenados em freezer a - 20°C, de maneira que as amostras ficassem disponíveis para diagnose mantendo a infectividade viral.

A manutenção “in vivo” dos isolados foi feita em plantas de alface da cultivar White Boston, inoculadas vinte dias após a semeadura e mantidas em condições de casa de vegetação. O cultivo das plântulas foi feito em vasos de 250 ml, cheios de substrato constituído de uma mistura de esterco, areia e terra na proporção de 1:1:1, acrescido de 2 kg por m³ da formulação 04-14-08.

4.3. Caracterização dos isolados do LMV

A caracterização dos isolados do LMV, obtidos tanto via sementes como os monolesionais foi feita por meio da reação de hospedeiros diferenciais, propriedades físicas e microscopia eletrônica de acordo com os seguintes procedimentos:

4.3.1. Reações de hospedeiros diferenciais

Foram utilizados os hospedeiros diferenciais *Zinnia elegans*, *Pisum sativum* cv. Trioфин, *Nicotiana glutinosa*, *N. clevelandii*, *N. tabacum* “TNN”, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Gomphrena globosa*, *Datura stramonium* e *Helianthus annuus* e a cultivar de alface White Boston, suscetível ao LMV. A

técnica de inoculação utilizada foi a mesma descrita no item 4.2.3 e os resultados obtidos foram comparados com os encontrados na literatura.

Devido ao grande número de isolados procedentes de sementes infectadas, sete foram escolhidos com base nos fortes sintomas que causaram em alface, e testados juntamente com um isolado padrão do LMV obtido na Seção de Virologia do IAC e gentilmente cedido pelo Dr. Álvaro Santos Costa.

No caso do teste de monolesionais, um isolado L₇ representante do patótipo IV, foi utilizado e comparado com o isolado denominado Romaine-R, identificado por Zerbini et al. (1995) como pertencente ao grupo II de Pink et al. (1992b) e cedido pelo autor.

4.3.2. Determinação de propriedades físicas

A identidade dos isolados do LMV, obtidos via sementes com o LMV, foi estudada por meio das seguintes propriedades físicas: ponto final de diluição (P.F.D.), ponto de inativação térmica (P.I.T.) e longevidade “in vitro” (L.I.V.).

Da mesma forma que na reação de hospedeiros diferenciais, somente alguns isolados foram previamente escolhidos para a determinação das propriedades físicas.

Para a determinação do P.F.D., os isolados multiplicados em alface da cultivar White Boston, foram macerados em tampão fosfato pH 7,0, na proporção 1:1 (g de folha fresca / ml de tampão fosfato). O extrato foi diluído nas proporções de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} e inoculados mecanicamente em plantas de *C. quinoa*, com aproximadamente 30 dias de idade.

Na determinação do 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 uma 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 resfriadas, as alíquotas foram individualmente inoculadas em plantas de *C. quinoa*, com aproximadamente 30 dias de idade.

Para a determinação do L.I.V., macerou-se 1 g de folha de alface da cultivar White Boston infectada, em 10 ml de tampão fosfato. A seguir, foram retiradas cinco alíquotas de 2 ml cada uma 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 mecanicamente em plantas de *C. quinoa*.

As plantas utilizadas nos testes de determinação das propriedades físicas, foram avaliadas durante os 30 dias após a inoculação para observar a ocorrência de sintomas.

4.3.3. Microscopia eletrônica

Para visualização da morfologia das partículas de vírus presentes, foram feitos testes de microscopia eletrônica utilizando-se plantas de alface cultivar Brasil-303, usando a técnica de Imersão Foliar Rápida (“Leaf dip”), descrito por Kitajima (1965).

A grade de cobre para microscopia eletrônica, utilizada na visualização das partículas, foi recoberta com uma película de Parlodium-carbono.

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

Os testes de microscopia eletrônica, executadas neste trabalho, foram desenvolvidas na Seção de Virologia Fitotécnica do Instituto Agronômico de Campinas - IAC e no Instituto de Biociências - UNESP- Botucatu.

4.4. Determinação da variabilidade de isolados do LMV

4.4.1. Isolados obtidos através de sementes de alface

Para determinar a variabilidade quanto a patogenicidade, no conceito de Pink et al. (1992b), de 21 isolados do LMV obtidos via sementes de alface, os mesmos foram inoculados em cultivares portadores do genótipo “g” (Brasil-303 e Elisa) e “mo” (Vanguard-75), juntamente com as fontes originais de tolerância, Gallega de Invierno e PI-251245 e a cultivar suscetível White Boston. *C. quinoa* foi utilizado como indicador da eficiência da inoculação.

As plantas obtidas por semeadura em bandejas de poliestireno com 128 células, foram inoculadas 20 dias após a germinação, e reinoculadas por duas vezes consecutivas com intervalo de 3 dias. Em seguida foram transplantadas para vasos plásticos e mantidas sob condições de túnel plástico. A metodologia de inoculação está descrita no item 4.2.3 e a avaliação dos sintomas foi feita periodicamente em intervalos semanais, durante 30 dias.

Os resultados foram expressos pelo número de plantas com sintomas de mosaico, independente da intensidade, em relação ao número total de plantas inoculadas.

4.4.2. Isolados monolesionais

Nesta etapa, os 21 isolados monolesionais do LMV foram inoculados nas cultivares de alface utilizadas como diferenciadoras de patótipos por Pink et al. (1992b) e Bos et al. (1994), quais sejam: Malika, Calona e Gallega de Invierno, (genótipo $mo_1^1 mo_1^1$); Salinas-88 e Vanguard-75 (genótipo $mo_1^2 mo_1^2$), Ithaca (portadora de um gen dominante “ Mo_2 ” que confere tolerância ao patótipo I). As cultivares Salinas e White Boston, suscetíveis aos patótipos até então descritos, bem como *C. quinoa* foram utilizadas como controle.

A metodologia de obtenção das plantas, inoculação e avaliação dos sintomas foram os mesmos descritos no item 4.4.1.

O isolado do LMV denominado Romaine-R e identificado como patótipo II ou “comum” também foi utilizado como testemunha.

4.5. Tolerância ao LMV em cultivares de alface

Com o objetivo de confirmar a tolerância de cultivares de alface nacionais e introduzidas, tidas como tolerantes, ao patótipo II do LMV, bem como identificar possíveis fontes de tolerância ao patótipo IV, trinta e nove cultivares de alface foram inoculadas com ambos os patótipos. As cultivares utilizadas, suas

procedências, bem como a reação esperada ao patótipo II, podem ser observadas no Quadro 05.

O patótipo II foi representado pelo isolado RR e o patótipo IV pelo isolado monolesional L₇, previamente identificados.

A metodologia de inoculação e avaliação foi a mesma utilizada nos itens 4.4.1 e 4.4.2 e os resultados foram expressos em porcentagem de plantas com sintomas de mosaico.

QUADRO 05 - Cultivares de alface testadas para a reação aos patótipos II e IV do LMV, (sensu Pink et al., 1992b), procedência e reação esperada ao patótipo II.

População	Procedência ^{1/}	Reação esperada LMV - patótipo II
Divina	Vilmorin	Tolerante
Elvira	Rijk zwan	Tolerante
Arizona	Rijk zwan	Tolerante
Mephisto	Rijk zwan	Tolerante
Krizet	Rijk zwan	Tolerante
Sorava	Rijk zwan	Tolerante
Prima	Slius E'Groot	Tolerante
Meridian	Slius E'Groot	Tolerante
Mondian	Slius E'Groot	Tolerante
Campan	Slius E'Groot	Tolerante
Petra	Slius E'Groot	Tolerante
Mirna	Nuhens	Tolerante
Vanguard-75	Asgrow	Tolerante
Salinas-88	Asgrow	Tolerante
Malika	Univ. Califórnia	Tolerante
Calona	Univ. Califórnia	Tolerante
Gallega-01	F.C.A.B/UNESP	Tolerante
Gallega-02	F.C.A.B/UNESP	Tolerante
Brasil-48	Agroflora	Tolerante
Brasil-202	Agroflora	Tolerante
Brasil-303	Agroflora	Tolerante
Aurea	Agroflora	Tolerante
Aurora	Agroflora	Tolerante
Floresta	Asgrow	Tolerante
Karina	Agroflora	Tolerante
Gloria	Agroflora	Tolerante
Elisa	Agroflora	Tolerante
Vanessa	Agroflora	Tolerante
Regina-440	Agroflora	Tolerante
Carolina	Agrocere	Desconhecido
Marisa	Agrocere	Desconhecido
Monalisa	Agrocere	Desconhecido
Ag-605	Agrocere	Desconhecido
Mesa-659	Agrocere	Suscetível
Lucy Brown	Asgrow	Suscetível
Brisa	Asgrow	Suscetível
Veronica	Agroflora	Suscetível
Salinas	Univ. Califórnia	Suscetível
White Boston	F.C.A.B/UNESP	Suscetível

^{1/} Indica a fonte fornecedora das sementes utilizadas, podendo ser ou não coincidente com a Instituição que obteve a população.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Variabilidade de isolados do LMV e transmissão por sementes

Das 32 amostras, coletadas em plantas de alface com sintomas de mosaico em condições de campo (Stangarlin, 1995), 27 induziram sintomas de mosaico na cultivar suscetível Babá, após a inoculação mecânica das mesmas. Após a colheita das sementes produzidas nestas plantas e germinação, obtiveram-se porcentagens variáveis de plântulas com sintomas de mosaico, Quadro 06.

De 10.535 plântulas examinadas, 496 apresentaram sintomas de mosaico representando uma taxa média de transmissão de 4,71%, com variação de 1,81 a 17,72%, encontrando-se próxima a variação de 1 a 12% relatada na literatura por diferentes autores para genótipos suscetíveis (Marrou, 1969; Ryder, 1973).

QUADRO 06 - Porcentagem de transmissão do LMV através de sementes de alface cultivar Babá de verão, inoculadas mecanicamente e com sintomas de mosaico. Botucatu, 1993.

Amostra	Sementes germinadas	Plântulas com vírus	Porcentagem de transmissão
03 S	299	53	17,72
04 S	395	42	10,63
09 S	380	07	1,84
10 S	127	10	7,87
12 S	510	26	5,09
13 S	520	35	6,70
14 S	150	04	2,26
15 S	280	05	1,78
17 S	441	08	1,81
19 S	470	14	2,97
21 S	380	07	1,84
26 S	486	29	5,96
27 S	360	07	1,94
33 S	270	05	1,85
35 S	505	26	5,14
36 S	510	15	2,94
37 S	310	06	1,93
39 S	510	18	3,52
40 S	367	08	2,17
41 S	440	08	1,81
42 S	420	08	1,90
44 S	510	42	8,23
46 S	520	38	7,30
47 S	530	58	10,94
52 S	470	10	2,12
53 S	165	03	1,81
54 S	210	04	1,90

A confirmação de que os vírus recuperados das plântulas com sintomas são causadores de mosaico em alface, foi feita inoculando-se uma mistura de plântulas provenientes de cada uma das 27 amostras na cultivar suscetível de alface White Boston e utilizando-se como controle *C. quinoa*. Todas as plantas de White Boston inoculadas, apresentaram sintomas de mosaico e as de *C. quinoa* manchas cloróticas sistêmicas.

Apesar do LMV ser relatado como a única virose de alface transmitida pelas sementes (Dinant & Lot, 1992), a identidade definitiva dos isolados virais obtidos, com o LMV, foi estudada por meio de testes biológicos, propriedades físicas e microscopia eletrônica de isolados previamente selecionados com base na virulência em alface, segundo o conceito de Bos et al. (1994). Como controle foi utilizado um isolado do LMV-IAC. Os resultados podem ser observados nos Quadros 07 e 08.

A reação dos hospedeiros utilizados indica a presença do LMV em todos os isolados testados, já que *C. amaranticolor* e *Gromphrena globosa* apresentaram lesões locais, *Zinnia elegans* e *Pisum sativum* cv. Trioфин, sintomas de mosaico e *C. quinoa*, manchas cloróticas sistêmicas. *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* TNN, *Datura stramonium* e *Helianthus annuus* como descrito na literatura (Quadro 02), não apresentaram sintomas.

QUADRO 07 - Reação de hospedeiros diferenciais a isolados de vírus causadores de mosaico em alface, obtidos de plântulas sintomáticas provenientes de sementes de plantas de alface cultivar Babá de verão previamente inoculadas.

Isolado	<i>Zinnia elegans</i>	<i>Pisum sativum</i>	<i>Nicotiana glutinosa</i>	<i>Nicotiana clevelandii</i>	NT TNN	<i>Chenopodium quinoa</i>	<i>Gomphrena globosa</i>	<i>Datura stramonium</i>	<i>Helianthus annuus</i>	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	<i>Lactuca sativa</i>
LMV-IAC	M	M	-	-	-	MCS	LL	-	-	LL	M
19 S	M	M	-	-	-	MCS	LL	-	-	LL	M
44 S	M	M	-	-	-	MCS	LL	-	-	LL	M
26 S	M	-	-	-	-	MCS	-	-	-	LL	M
14 S	M	M	-	-	-	MCS	LL	-	-	LL	M
52 S	M	M	nt	nt	nt	MCS	nt	nt	nt	LL	M
12 S	M	M	nt	nt	nt	MCS	nt	nt	nt	LL	M
13 S	M	M	nt	-	nt	MCS	LL	-	-	LL	M

M: Mosaico; MCS: Mancha Clorótica Sistêmica; LL: Lesão Local nt: não testada; -: ausência de sintomas

QUADRO 08 - Propriedades físicas dos isolados causadores de mosaico em alface, obtidos de plântulas sintomáticas provenientes de sementes de plantas de alface cultivar Babá de verão previamente inoculadas.

PONTO FINAL DE DILUIÇÃO					
Isolado	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
13 S	+	+	+	-	-
14 S	+	+	-	-	-
19 S	+	+	-	-	-
26 S	+	+	+	-	-
44 S	+	+	-	-	-
LMV-IAC	+	+	+	-	-

PONTO DE INATIVAÇÃO TÉRMICA					
Isolado	50°C	55°C	60°C	65°C	70°C
13 S	+	-	-	-	-
14 S	+	+	-	-	-
19 S	+	+	-	-	-
26 S	+	-	-	-	-
44 S	+	-	-	-	-
LMV-IAC	+	-	-	-	-

TESTE DE LONGEVIDADE “ <i>in vitro</i> ”					
Isolado	Dias após a inoculação				
	0	1	2	3	4
13 S	+	+	+	-	-
14 S	+	+	+	+	-
19 S	+	+	+	+	+
26 S	+	+	+	+	+
44 S	+	+	+	+	+
LMV-IAC	+	+	+	+	-

+: presença de sintoma; - : ausência de sintoma

Nicotiana clevelandii, relatada como suscetível ao LMV por Costa & Duffus (1958) e Marinho (1982), não mostrou lesões locais. Tal fato concorda com o observado por Stangarlin (1995) e pode ser devido a população particular utilizada, já que o próprio isolado do LMV proveniente do IAC, também não induziu sintomas neste hospedeiro.

Quanto às propriedades físicas, o ponto final de diluição variou entre 10^{-2} a 10^{-3} ; o ponto de inativação térmica variou de 50°C a 55°C e o teste de longevidade “*in vitro*” à temperatura ambiente variou de 2 a 4 dias de infectibilidade. Apesar de haver certa variação em função dos isolados, todos foram semelhantes ao LMV padrão utilizado.

Os oito isolados, quando examinados ao microscópio eletrônico, demonstraram possuir partículas filamentosas flexuosas características dos potyvirus, gênero ao qual o LMV pertence segundo Couch & Gold (1954).

Considerando-se simultaneamente todas as características avaliadas, pode-se concluir que os isolados coletados em campo e passados através de sementes de alface cultivar Babá de verão são do LMV.

Um fato que deve ser observado no Quadro 07, é a suscetibilidade da cultivar Brasil-303 aos oito isolados do LMV testados, incluindo o isolado proveniente do IAC. Em princípio esta cultivar deveria ser assintomática, já que possui o par de genes recessivos “gg” originário de Gallega de Invierno (Nagai,

1993), que confere tolerância ao LMV típico, também denominado de patótipo II, na nomenclatura de Pink et al. (1992b). Sua suscetibilidade constitui-se em um indicativo da presença de patótipos diferentes do “típico” nas condições do Estado de São Paulo, ausência de tolerância ao mosaico nesta cultivar, ou ambos os fatores.

Com o objetivo de verificar as hipóteses acima, 19 isolados, incluindo os oito utilizados anteriormente foram inoculados em outras cultivares de alface tolerantes ao LMV. Os resultados obtidos estão apresentados no Quadro 09. A eficiência da inoculação pode ser demonstrada pela presença de sintomas em todas as plantas de *C. quinoa* e na cultivar de alface, White Boston, suscetível ao LMV. Todas as demais cultivares de alface testadas também foram suscetíveis aos 19 isolados.

Vanguard-75 é uma cultivar do grupo americano desenvolvida por Ryder (1979), utilizando o PI-251245 como fonte do gene “mo” para tolerância ao LMV, enquanto que Brasil-303 e Elisa foram desenvolvidas respectivamente, no IAC e Agroflora e são portadoras do gene “g” proveniente da cultivar Gallega de Invierno (Nagai, 1980; Della Vecchia et al., 1992).

A suscetibilidade das fontes originais de tolerância ao LMV e de seus derivativos, é uma comprovação da existência de patótipos diferentes do patótipo II nas plantações comerciais de alface do Estado de São Paulo.

QUADRO 09 - Reação de cultivares de alface e *Chenopodium quinoa* a isolados do LMV obtidos de plântulas sintomáticas provenientes de sementes de plantas de alface cultivar Babá de verão previamente inoculadas.

Isolado	<i>Chenopodium quinoa</i>	<i>Lactuca sativa</i> ¹					
		White Boston	PI-251245	Vanguard -75	Gallega	Brasil-303	Elisa
3S	MCS	3/3	4/6	3/3	4/5	5/5	6/6
4S	MCS	3/3	5/5	6/6	5/5	3/3	2/2
9S	MCS	2/2	5/5	5/5	6/6	6/6	6/6
12S	MCS	3/3	6/6	4/4	5/5	5/5	6/6
13S	MCS	2/2	2/5	4/4	5/5	3/4	3/4
14S	MCS	3/3	5/5	3/4	5/5	4/4	4/4
15S	MCS	3/3	3/5	3/6	5/5	6/6	4/4
17S	MCS	3/3	4/4	4/4	3/3	4/5	5/5
19S	MCS	4/4	4/4	6/6	4/4	4/4	5/5
26S	MCS	3/3	3/4	5/5	5/5	3/3	6/6
27S	MCS	3/3	3/4	5/5	5/5	4/5	5/6
36S	MCS	3/3	2/3	4/4	4/4	4/5	6/6
37S	MCS	6/6	1/5	2/2	4/6	3/6	3/5
39S	MCS	3/3	3/4	5/5	5/5	5/5	6/6
44S	MCS	3/3	4/4	4/4	5/5	6/6	4/4
46S	MCS	6/6	5/5	3/3	4/5	6/6	4/6
47S	MCS	2/2	2/4	5/5	6/6	4/4	6/6
52S	MCS	6/6	5/5	2/2	5/5	4/4	6/6
54S	MCS	4/5	4/4	3/6	4/4	2/5	4/6

1\ Resultados expressos em número de plantas com sintoma de mosaico / número de plantas inoculadas

MCS: Mancha clorótica sistêmica

Considerando-se que tanto os genes “mo” como “g” não foram efetivos para prevenir o aparecimento de sintomas de mosaico, pode-se postular a ocorrência do patótipo IV no conceito de Pink et al. (1992b), como apresentado no

Quadro 03. Tal hipótese já havia sido formulada por Stangarlin et al. (1995), entretanto, o teste de fontes de tolerância com amostras obtidas diretamente do campo, não permite tal conclusão, pela ocorrência de mistura de outros vírus, entre os quais o vírus do mosqueado da alface. A passagem das amostras originais através de sementes e a obtenção de isolados constituídos exclusivamente do LMV é necessária e foi o procedimento adotado no presente trabalho.

É interessante observar que dos 19 isolados do LMV testados, 10 foram coletados em cultivares de alface tidas como tolerantes ao LMV (Floresta, Regina, Elisa e Brasil-303), e oito em cultivares suscetíveis (Salinas, Verônica e Brisa) (Quadro 04), demonstrando que o novo patótipo está disseminado nas diferentes regiões produtoras, independente da presença de genes de tolerância ao patótipo II. Por outro lado a existência do patótipo IV, nas amostras coletadas e passadas via sementes da cultivar de alface suscetível Babá de verão, não exclui a possibilidade da ocorrência de outros patótipos, incluindo o patótipo II, em mistura com o IV. A tolerância conferida pelos genes “mo” ou “g” permite na maioria dos casos a multiplicação do LMV, e em outros não, na dependência do “background” genético da cultivar onde os genes de tolerância foram incorporados.

Visando verificar se diferentes patótipos ocorrem simultaneamente, 21 isolados monolesionais obtidos como descrito no item 4.2.2, foram inoculados nas cultivares diferenciais de alface de Pink et al. (1992b).

Os resultados estão apresentados no Quadro 10, em número de plantas com sintomas de mosaico em relação ao número de plantas inoculadas.

Apesar da eficiência da inoculação ter sido boa, como demonstrado pela presença de manchas cloróticas sistêmicas em todas as plantas de *C. quinoa*, utilizadas como indicadoras, nem todas as plantas das testemunhas suscetíveis (White Boston e Salinas) foram infectadas. Fatores ambientais, possivelmente temperaturas elevadas durante o teste podem ser responsáveis. Para facilitar a interpretação dos resultados, no Quadro 11 estão apresentadas as porcentagens de plantas com mosaico, não em cultivares diferenciadoras isoladamente, mas agrupadas por genótipo. Uma das vantagens deste sistema é que pode-se avaliar o efeito ao genótipo “g” e ou “mo”, representadas respectivamente por mo_1^1 e mo_1^2 Mo_2^+ , na terminologia de Pink et al. (1992b), em diferentes “backgrounds” genéticos. Diversos autores entre os quais Pink et al. (1992b) e Bos et al. (1994), ressaltaram a importância de possíveis fatores modificadores na expressão dos genes principais condicionadores da tolerância ao LMV em alface. Segundo o critério utilizado a interpretação da suscetibilidade ou da tolerância das cultivares diferenciadoras, que determina o patótipo presente, foi feito com base na porcentagem de plantas infectadas das testemunhas suscetíveis (White Boston e Salinas). Cultivares com genes de tolerância e porcentagem de plantas infectadas

QUADRO 10 - Reação de cultivares de alface e *Chenopodium quinoa* a isolados monolesionais do LMV comparativamente ao patótipo II. Resultados expressos em número de plantas com sintomas / número de plantas inoculadas. Botucatu (1994).

Cultivares	^{1/} RR	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	L ₅	L ₆	L ₇	L ₈	L ₉	L ₁₀
<i>Chenopodium quinoa</i>	^{2/} MCS	MCS	MCS	MCS	MCS	MCS	MCS	MCS	MCS	MCS	MCS
White Boston	4/4	6/6	9/11	6/11	8/10	6/7	8/11	13/13	8/8	5/6	4/4
Salinas	3/4	nt	3/4	2/5	2/4	1/2	2/4	4/4	3/5	nt	nt
Gallega de Invierno	1/5	2/6	4/11	5/11	8/9	7/7	8/12	14/14	8/8	0/6	2/4
Malika	2/4	nt	5/5	2/5	2/5	5/5	3/6	6/6	3/5	nt	nt
Calona	0/4	nt	6/6	0/4	5/6	5/5	3/6	5/5	6/6	nt	nt
Salinas-88	0/8	nt	3/5	0/6	2/6	2/5	2/5	3/6	5/5	nt	nt
Vanguard-75	0/10	0/6	2/6	0/6	4/4	2/2	0/6	7/8	2/2	0/6	1/4
Ithaca	3/7	nt	4/6	3/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	nt	nt

Cultivares	L ₁₁	L ₁₂	L ₁₃	L ₁₄	L ₁₅	L ₁₆	L ₁₇	L ₁₈	L ₁₉	L ₂₀	L ₂₁
<i>Chenopodium quinoa</i>	MCS	MCS	MCS	MCS	MCS	MCS	MCS	MCS	MCS	MCS	MCS
White Boston	8/12	10/11	6/6	2/2	7/7	3/6	2/2	5/6	2/2	6/6	1/2
Salinas	2/4	5/5	nt	nt	1/4	nt	nt	0/5	nt	0/4	nt
Gallega de Invierno	7/11	11/11	3/6	2/2	8/8	3/6	2/2	2/8	2/2	4/7	0/2
Malika	0/5	5/5	nt	nt	2/6	nt	nt	3/5	nt	1/5	nt
Calona	3/5	6/6	nt	nt	4/4	nt	nt	3/5	nt	3/5	nt
Salinas-88	1/5	6/6	nt	nt	0/4	nt	nt	2/5	nt	1/5	nt
Vanguard-75	4/6	2/6	0/6	0/2	2/2	2/6	1/2	0/2	2/2	2/2	0/2
Ithaca	4/6	4/4	nt	nt	6/6	nt	nt	5/5	nt	6/6	nt

^{1/}RR - representa o patótipo II, previamente caracterizado

^{2/}MCS - manchas cloróticas sistêmicas

nt - não testado

QUADRO 11 - Reação de genótipos de alface a isolados monolesionais do LMV comparativamente ao patótipo II. Resultados expressos em porcentagem de plantas com sintomas de mosaico.

Genótipo	Tolerante aos patótipos	¹⁷ RR	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	L ₅	L ₆	L ₇	L ₈	L ₉	L ₁₀
mo ₁ ⁺ Mo ₂ ⁺	-	87	100	80	50	71	78	67	100	85	83	100
mo ₁ ⁺ Mo ₂	I	43	nt	67	50	100	100	100	100	100	nt	nt
mo ₁ ¹ _	I, II	23	33	68	35	75	100	58	100	89	00	50
mo ₁ ² _	I, II, III	00	00	45	00	60	57	18	75	100	00	25

Genótipo	Tolerante aos patótipos	L ₁₁	L ₁₂	L ₁₃	L ₁₄	L ₁₅	L ₁₆	L ₁₇	L ₁₈	L ₁₉	L ₂₀	L ₂₁
mo ₁ ⁺ Mo ₂ ⁺	-	62	94	100	100	73	50	100	45	100	60	50
mo ₁ ⁺ Mo ₂	I	67	100	nt	nt	nt	nt	100	100	100	nt	nt
mo ₁ ¹ _	I, II	48	100	50	100	78	50	100	44	100	47	00
mo ₁ ² _	I, II, III	45	67	00	00	33	33	50	29	100	43	00

¹⁷RR: Isolado típico; L: Lesão monolesional; nt: Não testada

semelhantes aos genótipos suscetíveis, inoculados com o mesmo isolado monolesional, foram consideradas suscetíveis.

Os resultados obtidos com a classificação de patótipos podem ser observados no Quadro 12. O isolado RR, anteriormente classificado como patótipo II, teve a sua identificação confirmada. Pertence também a esse grupo o isolado L₃.

Os isolados L₁, L₉ e L₂₁ apesar de não causarem sintomas em

QUADRO 12 - Patótipos identificados em isolados monolesionais do LMV, com base em cultivares diferenciais de alface, segundo critério de Pink et al. (1992b).

Patótipo	Isolados monolesionais
II	RR, L ₃
III	L ₆
IV	L ₂ , L ₄ , L ₅ , L ₇ , L ₈ , L ₁₁ , L ₁₂ , L ₁₉
I ou II	L ₁ , L ₉ , L ₂₁
III ou Novo	L ₁₃ , L ₁₄ , L ₁₅ , L ₁₆
IV ou Novo	L ₂₀
Duvidosos	L ₁₀ , L ₁₇ , L ₁₈

cultivares com genes de tolerância mo_1^1 ou mo_1^2 Mo_2^+ , que os classifica como pertencentes ao grupo II não podem ser definitivamente classificados neste grupo, já que não foram testados na cultivar Ithaca que distingue o grupo I de II. Fato semelhante ocorreu com os isolados L₁₃, L₁₄, L₁₅ e L₁₆ para os quais o gene mo_1^2 foi efetivo e o genótipo mo_1^1 foi suscetível. Como a reação da cultivar Ithaca não foi testada para esses isolados, os mesmos não podem ser definitivamente classificados como grupo III, pois havendo reação de tolerância desta cultivar um novo patótipo seria descrito. O isolado 20, também por não ter sido testado na cultivar Ithaca, pode pertencer ao grupo IV ou a um novo grupo. As reações das populações para L₁₀, L₁₇ e L₁₈ não permite concluir sobre o patótipo presente neste isolado.

Deve-se observar que para nove dos vinte e um isolados monolesionais, os genes de tolerância ao LMV descritos não foram efetivos (patótipos IV ou novos). Cinco isolados (patótipos III ou novos) causaram sintomas de mosaico nas cultivares portadoras do gene mo_1^1 proveniente de Gallega de Invierno. Portanto, quatorze dos vinte e um isolados monolesionais (66,7%) são capazes de infectar e causar mosaico em cultivares nacionais de alface, já que todas elas apresentam o gene proveniente de Gallega de Invierno.

A possível existência de patótipos novos, é esperada e já foi relatada por Bos et al. (1994) utilizando as mesmas cultivares diferenciais do presente trabalho. Para o novo patótipo relatado pelos autores a cultivar Salinas-88 é suscetível enquanto Vanguard-75 é tolerante.

Pelos resultados do Quadro 11, pode-se observar que existe uma grande variação na porcentagem de plantas infectadas pelos diferentes isolados monolesionais nas cultivares suscetíveis Salinas e White Boston. Estas diferenças, originalmente atribuídas a fatores ambientais, podem ser devido à variação na virulência dos patótipos. Por exemplo, nos isolados classificados no grupo IV ocorreram variações nas porcentagens de planta com sintomas de 62% (L_{11}) a 100% (L_7 , L_{19}).

A identidade de um dos patótipos do grupo IV do LMV foi demonstrada utilizando-se o isolado monolesional L₇, devido a sua virulência em comparação com o isolado RR pertencente ao grupo II.

As propriedades físicas e a gama de hospedeiros dos dois isolados podem ser observados respectivamente nos Quadros 13 e 14, nos quais constata-se a identidade dos mesmos com o LMV.

A microscopia eletrônica do isolado monolesional L₇, bem como de outros representativos do patótipo IV (L₂, L₄, L₆, L₈, L₁₁, L₁₂ e L₂₀) e do isolado típico RR a partir de alface, revelou partículas filamentosas flexuosas características do grupo potyvirus ao qual o LMV pertence.

5.2. Tolerância ao LMV em cultivares de alface

A reação de trinta e nove populações de alface introduzidas e nacionais, foi testada separadamente com o isolado RR (patótipo II) e o isolado L₇ (patótipo IV), juntamente com a cultivar White Boston considerada como padrão de suscetibilidade. Os resultados podem ser observados nos Quadros 15 e 16.

QUADRO 13 - Propriedades físicas comparativas ao patótipo II (típico) e o isolado L₇ representante do patótipo IV.

Patótipo	PONTO FINAL DE DILUIÇÃO				
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
L ₇	+	+	+	+	+
Típico RR	+	+	+	+	-

Isolado	PONTO DE INATIVAÇÃO TÉRMICA				
	50 ⁰ C	55 ⁰ C	60 ⁰ C	65 ⁰ C	70 ⁰ C
L ₇	+	+	-	-	-
Típico RR	+	+	+	+	+

Isolado	TESTE DE LONGEVIDADE “ <i>in vitro</i> ”				
	Dias após a inoculação				
	0	1	2	3	4
L ₇	+	+	+	+	+
Típico RR	+	+	+	+	+

+ : presença de sintomas - : ausência de sintomas

QUADRO 14 - Reação comparativa de hospedeiros diferenciais ao patótipo II (RR) e ao isolado representante do patótipo IV (L₇).

Hospedeiro	Patótipo IV (L ₇)	Patótipo II (RR)
<i>Chenopodium quinoa</i>	MCS	MCS
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LL	LL
<i>Nicotiana tabacum</i> TNN	—	—
<i>Nicotiana rustica</i>	—	—
<i>Nicotiana glutinosa</i>	—	—
<i>N. tabacum</i> “ <i>Sansum</i> ”	—	—
<i>Nicotiana clevelandii</i>	—	—
<i>Nicotiana benthamiana</i>	M	M
<i>Nicotiana silvestris</i>	—	—
<i>N. tabacum</i> “ <i>Turkish</i> ”	—	—
<i>Zinnia elegans</i>	M	M
<i>Datura stramonium</i>	—	—
<i>Gomphrena globosa</i>	LL	LL
<i>Cucurbita pepo</i> c. Caserta	—	—

LL: lesão local; M: mosaico; MCS: mancha clorótica sistêmica — : ausência de sintomas

QUADRO 15 - Reações das cultivares introduzidas de alface ao patótipo II e IV do LMV, expressa em porcentagem de plantas com sintomas de mosaico.

Cultivares	Patótipo II			Patótipo IV		
	Plantas inoculadas	Nº de plantas com mosaico	% de plantas com mosaico	Plantas inoculadas	Nº de plantas com mosaico	% de plantas com mosaico
Divina	10	0	0,0	7	6	85,7
Elvira	10	1	10,0	7	4	57,1
Arizona	10	0	0,0	10	8	80,0
Mephisto	10	1	10,0	10	9	90,0
Krizet	10	3	30,0	10	10	100,0
Soraya	10	0	0,0	10	9	90,0
Prima	10	2	20,0	10	9	90,0
Meridian	9	0	0,0	10	6	60,0
Mondian	10	1	10,0	10	9	90,0
Campan	8	2	25,0	9	8	88,8
Petra	8	0	0,0	10	9	90,0
Mirna	4	1	25,0	10	8	80,0
Gallega-pl 02	8	0	0,0	10	10	80,0
Gallega-pl 01	9	0	0,0	10	8	80,0
Lucy Brown	9	8	88,8	10	9	90,0
Brisa	6	4	66,6	7	7	100,0
Malika	4	0	0,0	8	7	87,5
Calona	4	0	0,0	4	4	100,0
Salinas-88	4	0	0,0	4	3	75,0
Salinas	4	4	100,0	4	4	100,0
Vanguard	10	0	0,0	10	9	90,00
White Boston	10	10	100,0	10	10	100,0

QUADRO 16 - Reações das cultivares nacionais de alface ao patótipo II e IV do LMV, expressa em porcentagem de plantas com sintomas de mosaico.

Cultivares ^{1/}	Patótipo II			Patótipo IV		
	Plantas inoculadas	Nº de plantas com mosaico	% de plantas com mosaico	Plantas inoculadas	Nº de plantas com mosaico	% de plantas com mosaico
Áurea	7	0	0,0	7	3	42,8
Aurora	10	0	0,0	10	8	80,0
Elisa	10	1	10,0	9	9	100,0
Regina-440	8	8	100,0	9	9	100,0
Brasil-202	9	1	10,0	9	6	66,6
Brasil-303	10	9	90,0	10	10	100,0
Gloria	10	0	0,0	10	7	70,0
Karina	10	1	10,0	10	8	80,0
Mesa-659	9	8	88,8	8	7	87,5
Elisa	10	1	10,0	10	8	80,0
Floresta	10	0	0,0	10	7	70,0
Aurora	10	0	0,0	10	8	80,0
Vanessa	10	0	0,0	9	8	88,8
Verônica	10	10	100,0	10	10	100,0
Brasil-48	8	1	10,0	10	10	100,0
Carolina	9	9	100,0	8	7	87,5
AG-605	8	8	100,0	10	9	90,0
Marisa AG-216	10	9	90,0	9	8	88,8
Monalisa AG-819	8	8	100,0	10	9	90,0
White Boston	10	10	100,0	10	10	100,0

^{1/} Cultivares repetidas significam procedências diferentes de sementes.

Todas as cultivares do grupo manteiga, introduzidas da Europa, foram tolerantes ao patótipo II, com porcentagem de plantas infectadas variando de 10 a 30%. As cultivares Lucy Brown, Brisa e Salinas apresentaram alta porcentagem de plantas com sintomas por não possuírem genes de tolerância.

Um certo número de plantas infectadas nas cultivares tolerantes é esperado, considerando-se diferenças no “background” genético das mesmas, ou baixa pressão de seleção para tolerância durante o seu desenvolvimento. A necessidade de seleção para ausência de sintomas durante os programas de melhoramento pode ser demonstrado pela reação das duas diferentes progênes da cultivar Gallega de Invierno, selecionadas para ausência absoluta de sintomas a partir da população original, que apresentou variabilidade com a presença de plantas com mosaico leve após a inoculação.

Quanto à reação das cultivares nacionais ao patótipo II do LMV (Quadro 16), como esperado, foram suscetíveis Verônica e White Boston. Carolina, AG-605, Marisa e Monalisa que não são descritas como tolerantes ao LMV, demonstraram ser suscetíveis ao vírus. Entre as cultivares consideradas como tolerantes, Regina-440 e Brasil-303 foram suscetíveis. O comportamento da cultivar Brasil-303 foi semelhante ao observado em outras inoculações com o patótipo II, apresentando uma alta porcentagem de plantas com sintoma de mosaico, comparáveis aos apresentados pela inoculação com o patótipo IV (Figura 1).

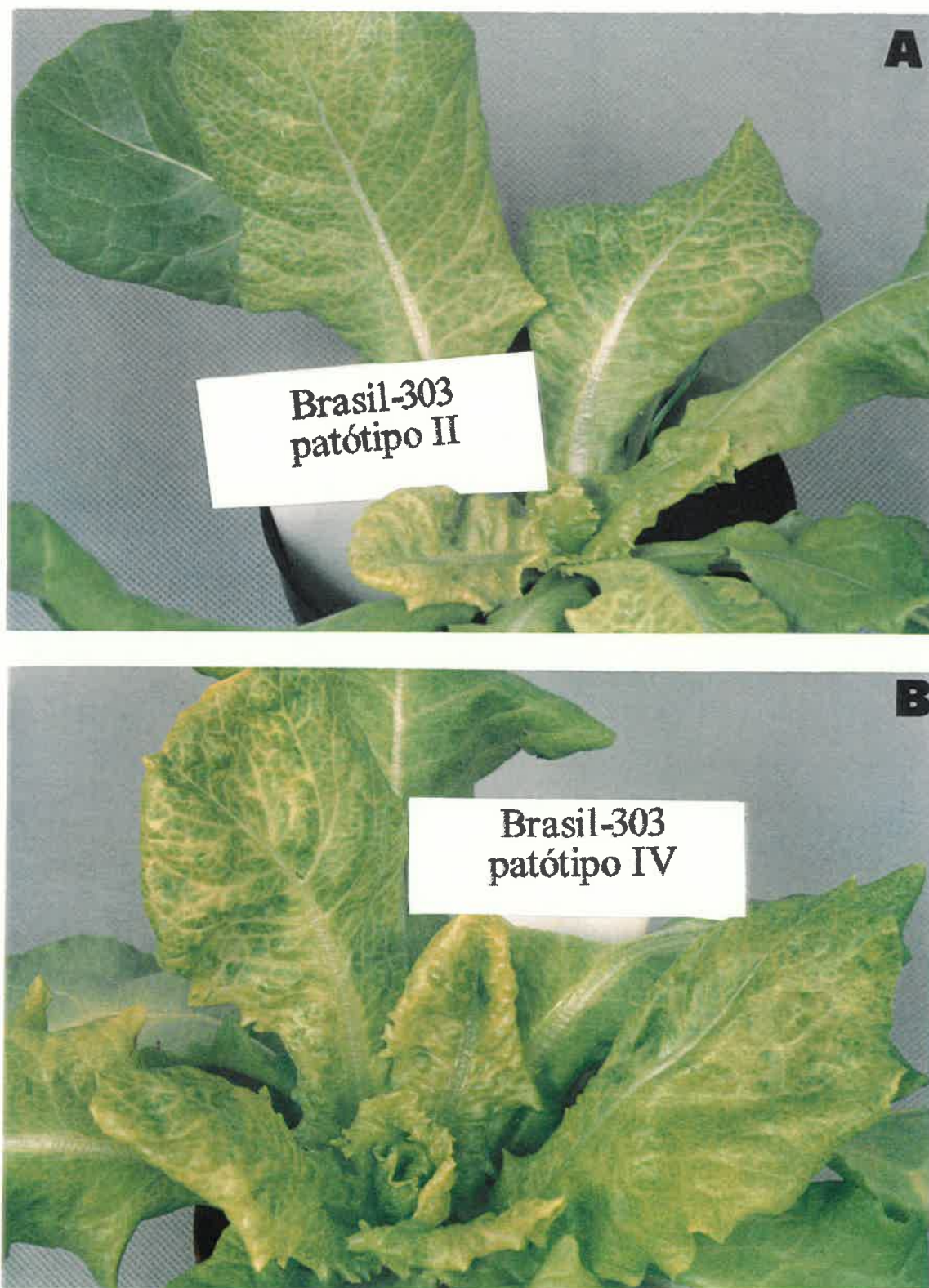


FIGURA 1 - Reação da cultivar Brasil-303 ao patótipo II (a) e IV (b) do LMV.

Considerando-se que a origem do material testado nestas inoculações poderia não representar de fato a cultivar Brasil-303, uma nova amostra de plantas da mesma cultivar, obtida de sementes comerciais, foi testada.

Das 20 plantas inoculadas, 100% apresentaram sintomas de mosaico, demonstrando que Brasil-303 não apresenta tolerância ao LMV típico. As demais cultivares nacionais de alface, que direta ou indiretamente possuem a série Brasil na sua genealogia, mas não necessariamente Brasil-303, comportaram-se como tolerantes ao patótipo II do LMV. Uma pequena porcentagem de plantas com mosaico é esperada e reforça a necessidade de seleção para ausência de sintomas durante o processo de obtenção de novas cultivares com tolerância ao LMV, mesmo quando são cruzados genótipos homozigotos para o gene de tolerância. Este procedimento foi adotado por Nagai (1979), quando utilizou a cultivar Gallega de Invierno como fonte de tolerância ao LMV. O autor relata a utilização em cruzamentos de algumas plantas selecionadas da cultivar original, que não apresentavam sintoma de mosaico e não transmitiam o vírus através das sementes.

A reação de todas as cultivares de alface introduzidas ou nacionais para o patótipo IV foram de suscetibilidade. O critério para a escolha das cultivares testadas foi a tolerância ao patótipo II e representam uma amostra pequena da variabilidade da espécie. Uma triagem também restrita de cultivares de *Lactuca sativa* e de outras espécies relacionadas foi feita por Bos et al. (1994). A maioria das

cultivares testadas foram suscetíveis ao patótipo IV, excluindo-se alguma introdução de *Lactuca tartarica* e *L. perennis*, que são incompatíveis em cruzamentos com *L. sativa*. Uma triagem sistemática de novas introduções deve ser feita para identificar possíveis genes de tolerância a novos patótipos do LMV.

Sintomas de mosaico das cultivares Gallega de Invierno e Vanguard-75 causadas pelo patótipo IV podem ser observadas na Figura 2.



FIGURA 2 - Reação das cultivares Gallega (a) e Vanguard-75 (b) ao patótipo IV do LMV.

6. CONCLUSÕES

O vírus do mosaico da alface “Lettuce mosaic virus” - LMV, que ocorre no Estado de São Paulo, apresenta uma mistura de patótipos diferentes com predominância do patótipo IV, para o qual os genes de tolerância descritos não são efetivos. A ocorrência de patótipos novos é um dos fatores responsáveis pela ocorrência de mosaico em cultivares tolerantes sob condições de campo.

Todas as cultivares introduzidas de alface, descritas como tolerantes ao patótipo II do LMV, foram de fato tolerantes. Cultivares nacionais consideradas como tolerantes a este mesmo patótipo foram suscetíveis (Brasil-303, Regina-440), variáveis (Brasil-48, Brasil-202, Karina, Elisa) ou uniformemente tolerantes (Aurea, Aurora, Glória, Floresta e Vanessa).

Todas as cultivares testadas, independente da origem, foram suscetíveis ao patótipo IV.

7. SUMMARY

The purpose of the present research was to study the variability of Lettuce mosaic virus (LMV) occurring in commercial lettuce fields in the state of São Paulo, Brazil, as well as to study the behavior of introduced and Brazilian lettuce cultivar with reported tolerance to LMV, pathotype II.

Isolates of LMV free of other viruses occurring under field conditions, were obtained by passing collected viruses samples through lettuce seeds and recovering seedlings with mosaic symptoms.

To study the occurrence of different pathotypes, monolesional isolates were obtained through repeated inoculation on *Chenopodium amaranticolor* and *C. quinoa*.

Pathotype were characterized by the reaction of differential lettuce cultivar utilized by Pink et al. (1992), and identified as LMV by differential host range, physical proprieties and electron microscopy.

Thirty nine Brazilian and introduced cultivars with reported tolerance to LMV were subsequently tested against pathotype II and IV.

It is concluded that LMV is a variable virus and pathotypes II and III (sensu Pink et al., 1992) are frequent. Pathotype IV represented more than 50% of monolesional isolates.

All introduced and most of Brazilian lettuce cultivars with reported LMV tolerance behavior as such. None of tested cultivars were tolerant to pathotype IV.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ^(1, 2)

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

BANNEROT, H. et al. Etude de heredité de la tolerance 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.

(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.

- BOS, D., HUIJBERTS, N., CUPERUS, C. Further observations on variation of lettuce mosaic virus in relation to lettuce (*Lactuca sativa*), and a discussion of resistance terminology. *Eur. J. Plant Pathol.*, v.100, p.293-314, 1994.
- 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., DUFFUS, J.E. Observations on Lettuce Mosaic in California. *Plant Dis. Rep.*, v.42, p.583-6, 1958.
- COSTA, P.C., SILVA, N. Melhoramento de alface (*Lactuca sativa* L.) para resistência múltipla ao calor e mosaico. *Rev. de Oleric.*, v.16, p.26-7, 1976.
- 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.

DELLA VECCHIA, P.T., TAKAZAKI, P.E., KIKUCHI, M., SOBRINHO, P.T.

“Elisa nova cultivar de alface para o cultivo de verão. *Hort. Bras.*, v.10, p.44, 1992.

DINANT, S., LOT, H. Lettuce Mosaic Vírus. *Plant Pathol.*, v.41, p.528-42, 1992.

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

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

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.

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.

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.

KRAMER, M., ORLANDO, A., SILBERSCHMIDT. Estudos sobre uma grave doença de vírus, responsável pelo deperecimento de nossas culturas de alface. *Biológico*, São Paulo, v.11, p.121-34, 1945.

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.

LOT, H., DEOGRATIAS, J.M. Le virus de la mosaïque de la laitue: variabilité et sources de résistance. In: *IIIe Rencontres de Virologie Végétale*. Aussois. p. 74, 1991.

- MARINHO, V.L.A. *Vírus do mosqueado da alface*. Brasília, 1982. 84p.
Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília.
- 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. *Plant. Dis. Rep.*, v.47, p.473-6, 1963.
- MURPHY, F.A. et al. *Virus Taxonomy*. Sixty Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.*, suppl. 10, 1995. 586p.

- NAGAI, H. Obtenção de novos cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) resistente ao mosaico e ao calor. I - Brasil 48, 202 e 221. *Revista de Olericultura*, v.17, p.129-37, 1979.
- NAGAI, H. Obtenção de novos cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) resistente ao mosaico e ao calor. II - Brasil 303 e 311. *Revista de Olericultura*, v.18, p.14-21, 1980.
- NAGAI, H. Alface tipo manteiga. In: FURLANI A.M.C., VIEGAS J.P. *O melhoramento de plantas no Instituto Agrônômico*. Campinas: IAC, 1993. p.204-21.
- NEWBALL, A.G. Seed transmission of lettuce mosaic. *Phytopathology*, v.13, p.104-6, 1923.
- PAHLEN, A., CRNKO, J. El virus del mosaico de la lechuga (*Marmor lactucae* Holmes) en Mendoza y Buenos Aires. *Rev. Invest. Agropecu. Ser.*, v. 2, p.25-31, 1965.
- 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 resistance. *Euphytica*, v.63, p.169-74, 1992b.
- 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. Am. Soc. Hortic. Sci.*, v.95, p.378-9, 1970.
- RYDER, E.J. Seed transmission of lettuce mosaic virus in mosaic resistant lettuce. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, v.98, p.610-4, 1973.
- RYDER, E.J. "Vanguard 75" Lettuce. *HortScience*, v.14, p.284-86, 1979.
- SMITH, K.M. *A Textbook of Plant Virus Diseases*. London: J. & A. Churchill, 1937. p.615.

STANGARLIN, O.S., PAVAN, M.A., SILVA, N. da. *Identificação dos vírus causadores de mosaico em cultivares de alface (Lactuca sativa L.) resistente ao vírus do mosaico da alface nas regiões produtoras do Estado de São Paulo*. In: XVIII CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 1995, Piracicaba. *Programa e Resumos*. Piracicaba: ESALQ / USP, 1995. p.88.

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

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, 1970.

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, 1985.

ZERBINI, F.M., KOIKE, S.T., GILBERTSON, R.L. *Gazania* spp: An alternate of lettuce mosaic potyvirus (LMV) in the Salinas Valley. *Phytopathology*, v. 83, p.1420, 1993.

ZERBINI, F.M., KOIKE, S.T., GILBERTSON, R.L. Biological and molecular characterization of lettuce mosaic potyvirus isolates from the Salinas valley of California. *Phytopathology*, v.87, p.746-752, 1995.

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.