

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

**COMPORTAMENTO DE GENÓTIPOS DE ALFACE COM O ALELO  
*mo1<sup>0</sup>* AO *Lettuce mosaic virus* E *Lettuce mottle virus***

**GERSON SHINYA SUZUKI**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da UNESP - Campus  
de Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

**BOTUCATU – SP  
SETEMBRO - 2014**

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

**COMPORTAMENTO DE GENÓTIPOS DE ALFACE COM O ALELO**  
*mo1<sup>0</sup>* AO *Lettuce mosaic virus* E *Lettuce mottle virus*

**GERSON SHINYA SUZUKI**

**Orientador: Profa. Dra. Renate Krause Sakate**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da UNESP - Campus  
de Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

**BOTUCATU – SP**  
**SETEMBRO - 2014**

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

Suzuki, Gerson Shinya, 1984-  
S968c Comportamento de genótipos de alface com o alelo *mo1<sup>0</sup>* ao *Lettuce mosaic virus* e *Lettuce mottle virus* / Gerson Shinya Suzuki. - Botucatu : [s.n.], 2014  
vi, 34 f. : fots. color., ils. color., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2014  
Orientador: Renate Krause Sakate  
Inclui bibliografia

1. Alface - Resistência a doenças e pragas - Aspectos genéticos. 2. Alface - Variedades. 3. Vírus de plantas. I. Sakate, Renate Krause. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. III. Título.

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “COMPORTAMENTO DE GENÓTIPOS DE ALFACE COM O ALELO  
*mol<sup>1</sup>* AO *Lettuce mosaic virus* E *Lettuce mottle virus*”

ALUNO: GERSON SHINYA SUZUKI

ORIENTADORA: PROFA. DRA. RENATE KRAUSE SAKATE

APROVADO PELA COMISSÃO EXAMINADORA:



PROFA. DRA. RENATE KRAUSE SAKATE



PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN



DR. JULIO MASSAHARU MARUBAYASHI

Data da Realização: 19 de setembro de 2014.

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP, Campus de Botucatu, pelo suporte e oportunidade para realizar esse trabalho.

À toda a minha família, por todo o amor, incentivo, compreensão e pela criação.

À minha orientadora Profa. Dra. Renate Krause Sakate pelo acolhimento, orientação e ensinamentos durante a condução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Agenor Pavan, pela ajuda e contribuições a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Norberto da Silva, por fornecer os genótipos utilizados neste estudo.

Ao Dr. Júlio Massaharu Marubayashi, pela amizade, ensinamentos e conselhos.

Aos professores Carlos Gilberto Raetano, Antonio Carlos Maringoni, Edson Luiz Furtado, Silvia Renata S. Wilcken, Romy Goto e Regiane Cristina de Oliveira F. Bueno, Adriana Z. Kronka que contribuíram para a minha formação ao longo do curso.

Aos colegas e companheiros do laboratório de Virologia Vegetal, Tatiana Mituti, Mônica Fecury, Kelly C. Rocha, Bruno De Marchi, Letícia Moraes, Milena Leite, Marcelo Soman, Leysimar Pitzr, David Spadotti, Leonardo Barbosa, Evelynne Urzêdo, Isabel Hoffmann, Denise Nozaki, Cristiane Melo, Daiana Bampi, Késsia Pantoja e Gabriel pelo companheirismo, conselhos e aprendizado ao longo dessa caminhada.

Aos amigos da Rep. Tent's, Lucas, Leo, João, Eduardo, Cláudio e Renato pelo acolhimento nos períodos em que estive em Botucatu.

Aos Funcionários do departamento de Proteção de Plantas, Sr. Norbeto, Fátima, Samuel, Adriana e em especial ao Sr. Paulinho pela ajuda prestada e simpatia.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1 RESUMO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 SUMMARY.....</b>	<b>3</b>
<b>3 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>5</b>
<b>4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>7</b>
4.1 Principais características do gênero <i>Potyvirus</i> .....	7
4.2 <i>Lettuce mosaic virus</i> – LMV .....	9
4.3 Transmissão de LMV por afídeos .....	10
4.4 A resistência da alface ao LMV e seu controle .....	11
4.5 Lettuce mottle virus (LeMoV).....	14
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
5.1 Localização dos experimentos.....	16
5.2 Escolha do isolado viral.....	16
5.3 Manutenção do isolado viral.....	17
5.4 Transmissão via extrato vegetal de isolados do LMV-SK e LeMoV.....	17
5.5 Transmissão via afídeos .....	18
5.6 Teste biológico com plantas diferenciadoras.....	19
5.7 Extração de RNA Total pelo método de Bertheau et al. (1998).....	19
5.8 Amplificação por RT-PCR .....	20
5.10 Teste sorológico.....	21
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>22</b>
6.1 Inoculação por extrato vegetal.....	22
6.2 Detecção do LMV-SK e LeMoV por RT-PCR .....	24
6.3 Detecção do LMV-SK por ELISA .....	25
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>29</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>30</b>

**LISTA DE TABELAS**

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Reação de cultivares de alface a isolados de LMV classificados em diferentes patótipos (de acordo com Pink <i>et al.</i> , 1992).....	13
<b>Tabela 2.</b> Cronograma de transmissões via extrato vegetal e via afídeos. DAT: dias após o transplântio. ....	18

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Representação do genoma dos potyvirus mostrando as proteínas diferentes geradas após clivagem da poliproteína. Os números apresentados indicam o primeiro e último nucleotídeo da ORF completa do <i>Turnip mosaic virus</i> (fonte: WEI et al., 2010).....	8
Figura 2. A) Alface cultivar ‘Trocadero’ (esquerda) e alface 169501(11-02) e B) alface cultivar ‘Trocadero’ (esquerda) e alface 169501C (11-03) aos 14 dias após inoculação com o <i>Lettuce mosaic virus</i> .....	23
Figura 3. Sintomas ocasionados pelo Lettuce mottle virus em alface cultivar ‘Trocadero’(A) e nos genótipos 169501C (11-03) (B) e 169501 (11-02) (C).....	24
Figura 4. Análise em gel de agarose a 0,8% da RT-PCR para LMV. M: Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder; 1 a 3: cultivar 169501C (11-03); 4 a 6: 169501 (11-02); 7: alface ‘Trocadero’ infectada com LMV-SK; 8 e 9: controles positivos para LMV; 10: planta sadia; e 11: água.....	25
Figura 5. Análise em gel de agarose a 0,8% da RT-PCR para LeMoV: 1 a 3: amostras da variedade 169501C (11-03); 4 a 6: amostras da variedade 169501 (11-02); 7: alface ‘Trocadero’ infectada com LeMoV; 8: controle positivo; 9: planta sadia e 10: água.	25
Figura 6. Árvore filogenética obtida pelo programa Mega 5.0 com os isolados de LMV. A árvore foi construída utilizando neighbor joining, com valor de Bootstrap de 2000..	27
Figura 7. Alface cultivar ‘Salinas 88’ (A) com sintoma de leve clareamento das nervuras e <i>C. quinoa</i> sintoma de lesão local (B) aos 14 dias após retroinoculação.....	28

## 1 RESUMO

**COMPORTAMENTO DE GENÓTIPOS DE ALFACE COM O ALELO *mol*<sup>0</sup> AO *Lettuce mosaic virus* E *Lettuce mottle virus*.** Botucatu, 2014. 34 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

A alface (*Lactuca sativa* L.), pertencente à família *Asteraceae*, é uma das hortaliças mais consumidas no Brasil. Um dos principais problemas fitossanitários para essa cultura são as fitoviroses, em especial o *Lettuce mosaic virus* (LMV), que causa elevados prejuízos aos produtores em diversas regiões do país, além do *Lettuce mottle virus* (LeMoV), que vem crescendo em importância nos últimos anos. Como forma de controle, o uso de variedades resistentes é maneira mais eficaz de contornar os danos causados por vírus. Na maioria das variedades resistentes de alface faz-se o uso de genes recessivos, em sua maioria envolvidos na interação planta-vírus, são os chamados codificadores de fatores de iniciação de tradução eucarióticos (eIFs). Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar dois genótipos de alface (169501 e 169501C), quanto a resistência ao LMV e ao LeMoV. Foram realizadas transmissões via extrato vegetal nos dois genótipos de alface com LMV e LeMoV em diferentes intervalos de tempo. Para LMV também foram realizadas transmissões por afídeos. As duas variedades testadas se mostraram resistentes ao LMV nas duas formas de transmissão, mas apresentaram sintomas quando inoculadas com LeMoV. Em reações de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos, foram comprovadas a ausência de LMV e a infecção por LeMoV nas plantas inoculadas. O isolado de LMV após análise do sequenciamento da porção N' terminal da

região codificadora para a proteína capsidial e análise biológica, não pertence aos subgrupos Most e Common. Dentre as variedades 'Ithaca', 'Malika', 'Vanguard 75' e 'Salinas 88' somente na variedade 'Salinas 88', que possui o gene *mo1<sup>2</sup>*, o isolado de LMV foi capaz de causar sintomas.

Palavras-chaves: alface, *Lettuce mosaic virus*, resistência.

## 2 SUMMARY

**BEHAVIOR LETTUCE GENOTYPES WITH THE ALLELE *mo1<sup>0</sup>* TO *Lettuce mosaic virus* AND *Lettuce mottle virus*.** Botucatu, 2014. 34 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: GERSON SHINYA SUZUKI

Adviser: RENATE KRAUSE SAKATE

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) belongs to the *Asteraceae* family and is one of the most consumed vegetables in Brazil. One of the major disease problems in this crop are plant viruses, especially the *Lettuce mosaic virus* (LMV) that cause losses to producers in various regions of the country, but also *Lettuce mottle virus* (LeMoV). As a form of control, the use of resistant varieties is the most effective way to overcome the damage caused by plant viruses. Most of the resistant varieties of lettuce makes the use of recessive genes, mostly involved in plant-virus interactions and characterized as eukaryotic translation initiation factor (eIFs). Thus, this study aimed to evaluate two lettuce genotypes (169501 and 169501C) for resistance to LMV and LeMoV. LMV and LeMoV were sap transmitted at different time of intervals. For LMV also transmissions with aphids were carried out. The two varieties tested were resistant to LMV in both forms of transmission, but showed symptoms when inoculated with LeMoV. In RT-PCR with specific primers, LMV was not detected but LeMoV yes, confirming the infection in the inoculated plants. The isolate of LMV used in the tests was not classified as belonging to subgroups Most

and Common. Varieties 'Ithaca', 'Malika', 'Vanguard 75' and 'Salinas 88' were sap inoculated and only symptoms could be observed in Salinas 88, that carries *moI<sup>2</sup>* gene.

Keywords: lettuce, *Lettuce mosaic virus*, resistance.

### 3 INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) tem como centro de origem regiões de clima temperado no sul da Europa e Ásia Ocidental. É uma planta herbácea, com caule diminuto, onde as folhas se prendem. As folhas são delicadas e crescem na forma de roseta em torno do caule. Existem vários tipos de cultivares de alface que foram desenvolvidos através de programas de melhoramento no Brasil e no exterior, entre eles podemos citar: repolhuda-crespa (americana), repolhuda-manteiga, solta-lisa, solta-crespa, romana e mimosa (FILGUEIRA, 2007).

Economicamente, a alface é uma das hortaliças mais importantes no mundo. No Brasil, a região sudeste concentra a maior produção, tendo o estado de São Paulo como um dos principais produtores, com uma área cultivada de 9.099,04 ha e produção de 110.035,11 toneladas no ano de 2013 e movimentou R\$ 160.321.172,72 (IEA, 2014).

A cultura da alface é acometida por diversos problemas fitossanitários, entre elas estão as doenças causadas por vírus que podem ser transmitidos por diferentes vetores ou por sementes contaminadas, e que depois de ocorrida a infecção não possuem formas de controle. Dependendo das condições edafoclimáticas e dos cuidados empregados à cultura, os vírus podem causar perdas de até 100% (RESENDE & CUPERTINO, 1995).

As principais doenças causadas por vírus na alface são o mosaico da alface causada pelo *Lettuce mosaic virus*, LMV e os vírus do gênero *Tospovirus*, que

causam a doença conhecida como vira-cabeça (SALAS, 2001). Há também o Lettuce mottle virus, LeMoV um provável vírus pertencente ao gênero *Sequivirus* (JADÃO, 2004).

O LMV pertence à família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*, possui partículas flexuosas e filamentosas e genoma composto por uma molécula de RNA fita simples, sentido positivo (SHUKLA, 1994).

A resistência genética como modo de controle de fitoviroses é a mais eficaz. Os genes recessivos *mol*<sup>1</sup> e *mol*<sup>2</sup> existentes em alface que conferem tolerância ao *Lettuce mosaic virus* (LMV), são um bom exemplo disso. O LMV pode ser dividido em dois grupos denominados LMV-Common e LMV-Most. O LMV-Most tem a capacidade de contornar a resistência conferida pelos genes *mol*<sup>1</sup> e *mol*<sup>2</sup> em alface e são transmitidos pela semente nestas cultivares (KRAUSE-SAKATE et al., 2002). Estes isolado já foram descritos em diversas regiões do mundo, inclusive no Brasil (KRAUSE-SAKATE et al., 2002) entretanto não há variedades resistentes ou tolerantes para os LMV-Most.

Os genótipos de alface 169501(11-02) e 169501C (11-03) fornecidos pelo Prof. Dr. Norberto da Silva, foram testados quanto à infecção pelo LMV AF199 e apresentaram sintomas leves de infecção viral (MOURA, 2013). Estes mesmos genótipos quando avaliados pela empresa Sakata Seed Sudamérica, não apresentaram sintomas de LMV, utilizando-se o isolado aqui denominado de LMV-SK. Deste modo, os objetivos deste trabalho foram de melhor caracterizar o isolado LMV-SK quanto a sua capacidade de infectar estes genótipos, bem como infectar a série diferencial de alface descrita por Pink et al. (1992). O sequenciamento parcial da região codificadora para as proteínas Nib e CP e posterior construção de uma árvore filogenética também possibilitaram avaliar o LMV-SK, nesta porção do genoma, comparativamente a outros isolados.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

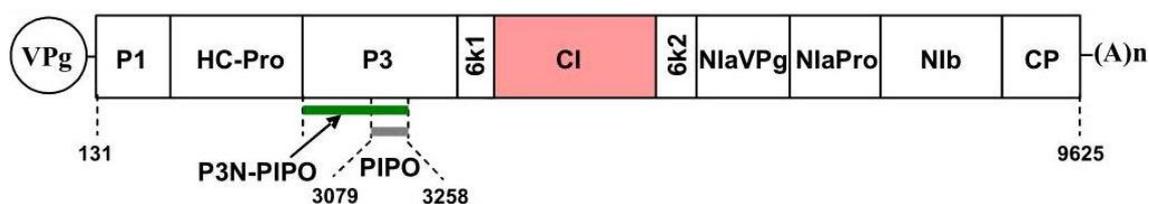
### 4.1 Principais características do gênero *Potyvirus*

Cerca de 30% dos vírus de plantas já descritos pertencem a família *Potyviridae*, sendo também uma das famílias mais estudadas entre os fitovírus. Os membros desta família podem ser classificadas em sete gêneros (*Potyvirus*, *Bymovirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*, *Macluravirus*, *Ipomovirus* e *Brambyvirus*) (KING et al., 2012). Os *Potyvirus* representam cerca 20% dos fitovírus já relatados, incluindo os vírus transmitidos por afídeos (HULL, 2002). As divisões de gênero são baseadas no inseto vetor que o transmite e o número de componentes do genoma viral, que é conservado dentro da família, com exceção do gênero *Bymovirus* que apresenta genoma bipartido (BERGER et al., 2005; KING et al., 2012).

Os *Potyvirus* possuem partículas alongadas e flexuosas que variam de 680 a 900 nm de comprimento, cerca de 11 a 15 nm de largura e espessura de 3,4 nm. Seu genoma é constituído por uma molécula de RNA de fita simples, contendo em torno de 10.080 nucleotídeos, senso positivo, apresentando uma única fase aberta de leitura (open reading frame, ORF) localizada entre duas regiões não codificadoras 5'NTR e 3'NTR. É composto por uma poliproteína precursora que dá origem a 10 proteínas e uma proteína incorporada na região codificadora para a proteína P3, chamada PIPO (CHUNG et al., 2008; KING et al., 2012) (Figura 1). Esta região é traduzida na fase +2 e sua expressão ocorre pela fusão da proteína P3 na região N-terminal (P3N-PIPO). Em geral os potyvirus possuem a proteína VPg no terminal 5' ligada de maneira covalente e uma cauda

poliadenilada (poli-A) no terminal 3'. (MURPHY et al., 1991; ADAMS et al., 2005; BERGER et al., 2005).

A proteína CI forma inclusões cilíndricas denominadas “cata-vento” no interior da células infectadas, que é uma característica taxonômica importante de espécies classificadas na família *Potyviridae* (MURPHY et al., 1991). A Nib (Nuclear inclusion b) forma inclusões nucleares, assim como a proteína NIa (Nuclear inclusion a - VPg-Pro) (URCUQUI-INCHIMA et al, 2001). Dessa forma a poliproteína dos potyvirus é processada através de três proteases codificadas pelos vírus que são denominadas de P1, HC-Pro e NIa. A P1 e a HC-Pro autoclivam-se em cis. A NIa atua de duas maneiras: na própria clivagem em cis e em seis clivagens em trans (DAROS & CARRINGTON, 1997; URCUQUI-INCHIMA et al., 2001).



**Figura 1.** Representação do genoma dos potyvirus mostrando as proteínas diferentes geradas após clivagem da poliproteína. Os números apresentados indicam o primeiro e último nucleotídeo da ORF completa do *Turnip mosaic virus* (fonte: WEI et al., 2010).

As proteínas oriundas destes processos possuem várias funções e são produzidas em quantidades estequiometricamente idênticas. No entanto, esta produção não depende da quantidade necessária requisitada pelo vírus, isto é, a produção de determinada proteína pode ser gerada em excesso podendo causar acúmulos nas células infectadas. Todas essas características são inerentes ao mecanismo de replicação dos potyvirus (SHUKLA et al., 1994; URCUQUI-INCHIMA et al., 2001).

#### 4.2 *Lettuce mosaic virus* – LMV

O LMV é considerado um dos vírus mais importante na cultura da alface (KRAUSE-SAKATE et al., 2002). Encontra-se disseminado por todo o mundo, provavelmente através do intercâmbio de sementes contaminadas (DINANT & LOT, 1992). Pertence ao gênero *Potyvirus* e possui partículas com cerca de 730 nm de comprimento por 13 nm de diâmetro (MURPHY et al., 1995).

Este vírus apresenta uma gama de hospedeiros bem ampla, podendo infectar 121 espécies vegetais pertencentes à 17 famílias botânicas (PAVAN et al., 2005). O seu primeiro relato ocorreu na Flórida, nos EUA, por Jagger, em 1921. No Brasil, KRAMER et al. (1945) fizeram o primeiro relato do vírus nos arredores da capital São Paulo. Os sintomas causados pelo LMV variam de acordo com o isolado presente, e incluem mosaico, distorção e redução das folhas, clareamento de nervuras, má formação de cabeça, nanismo, necrose e até mesmo a morte da planta (GROGAN, 1980; PAVAN & KUROZAWA, 1997).

A transmissão por semente pode ocorrer podendo ser infectada tanto pelo pólen como pelo óvulo (RYDER, 1964). Segundo Jadão et al. (2002), a taxa de transmissão pode alcançar 16,5% em genótipos suscetíveis. Em levantamentos realizados por Firmino et al. (2008) nas regiões produtoras de alface de Bauru, Campinas e Mogi das Cruzes no estado de São Paulo, verificaram com o uso de técnicas moleculares a infecção de LMV em 504 das 1362 amostras. Destas 504 amostras positivas, 440 eram de cultivares suscetíveis ao LMV e 64 com o gene de resistência *moI<sup>1</sup>*. Dentre as plantas suscetíveis, em 340 amostras (77,3%) tinham infecção por LMV-Common e em 100 por LMV-Most (22,7%). Isso aponta que o LMV-Most não predominou em cultivares sem genes de resistência na ocasião do levantamento. O LMV-Most foi identificado em 86,8% e o LMV-Common em 13,2% das 64 amostras positivas para o LMV em plantas contendo o gene de resistência *moI<sup>1</sup>*, evidenciando que o LMV-Most está normalmente associado à cultivares de alface que possuem genes de resistência, enquanto o LMV-Common se multiplica em cultivares tolerantes, nas quais geralmente não induz sintomas.

Assim, independentemente do subgrupo envolvido na infecção, o LMV está largamente distribuído devido ao aumento das áreas de plantio e do crescente mercado consumidor de alface que busca diferentes cultivares pertencentes aos segmentos 'Lisa' e 'Crespa' (SALA & COSTA, 2005).

### 4.3 Transmissão de LMV por afídeos

Do ponto de vista epidemiológico, as transmissões de vírus efetuadas por afídeos de forma não persistente é a que acarreta maiores prejuízos às culturas de importância econômica (COSTA, 1998). Somado a ausência de especificidade entre as espécies de vírus e afídeos e o fato da aquisição e inoculação dos vírus acontecerem durante picadas de prova, não havendo portanto necessidade de colonização da planta pelo afídeo, para que ocorra a transmissão, compõem as principais características a serem consideradas (SHUKLA et al., 1994; ZERBINI & MACIEL-ZAMBOLIM, 1999). Sendo assim, o controle químico de afídeos não é um meio eficiente para deter a disseminação do vírus no campo (ZERBINI & MACIEL-ZAMBOLIM, 2000).

Os *Potyvirus* são transmitidos de forma bastante eficiente por mais de 200 espécies de afídeos (COSTA, 1998). Como exemplo, podemos também citar o *Papaya ringspot virus* (PRSV) que pode ser transmitido por mais de trinta e duas espécies de afídeos, enquanto que *Myzus persicae* também transmite eficientemente, mais de 100 espécies de *Potyvirus* (RACCAH et al., 2001).

O componente auxiliar essencial na transmissão de vírus por afídeos tem sido amplamente estudado em diferentes espécies virais, principalmente ao *Potyvirus*, onde existem evidências de especificidade e seletividade (PIRONE & BLANC, 1996). A estratégia de transmissão, mediada por um componente auxiliar (correspondente à proteína HC-Pro de *Potyvirus*), bem esclarecida para diversos *Potyvirus*, sugere em uma interação molecular de motivos específicos de aminoácidos da capa protéica, da HC-Pro e de receptores da cutícula do estilete do afídeo. Pequenas mutações que provoquem alterações nesses motivos levam à perda da capacidade de transmissão dos vírus por afídeos (RACCAH et al., 2001).

A eficiência de transmissão de *Potyvirus* pode variar de uma espécie para outra de afídeo. A espécie *Myzus persicae* é a mais eficiente na transmissão do LMV (RACCAH et al., 2001; NEBREDA et al., 2004).

Segundo Yuki (2000), os principais afídeos já descritos na cultura da alface no estado de São Paulo, de acordo com o número de ocorrências registradas, são *Myzus persicae*, *Nasonovia ribisnigri*, *Rhopalosiphum rubiabdominalis*, *Uroleucom ambrosiae*, *Aphis gossypii*, *Aphis fabae*, *Aphis spiraecola*, *Aphis solani*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Pemphigus bursarius* e *Hyperomyzus lactucae*.

Plantas das espécies *Sonchus oleraceus* e *Emilia sonchifolia*, pertencentes à família *Asteraceae* são consideradas, em nossas condições, hospedeiras naturais de um grande número de espécies 96 de afídeos, principalmente *M. euphorbiae* e *M. persicae* que se estabelecem no campo formando grandes colônias nestas plantas invasoras (MICHELOTTO et al., 2004). Relatos de *S. oleraceus* como reservatório natural do LMV foram descritos em áreas produtoras de alface, situadas no município de Mogi das Cruzes (CHAVES et al., 2003), onde a pressão das variantes do LMV é extremamente elevada devido ao plantio durante todo o ano.

Yuki (2000), recomenda para a redução das populações de afídeos vetores e do LMV na cultura da alface, evitar que plantas de alface desprezadas para a comercialização e plantas invasoras permaneçam no campo de produção. Após a colheita, deve-se incorporar ao solo todos os restos culturais e plantas invasoras com o auxílio de uma enxada rotativa ou grade aradora, mantendo os canteiros limpos até o próximo plantio.

#### **4.4 A resistência da alface ao LMV e seu controle**

Na cultura da alface a resistência ao LMV é atribuída aos alelos recessivos *mol*<sup>1</sup> e *mol*<sup>2</sup> considerados alelos mutantes de um único gene chamado de *mol* e codificado pelo eIF4E (NICASE et al., 2003; GERMAN-RETANA et al., 2008). Inicialmente denominado de “gg”, o alelo *mol*<sup>1</sup> foi identificado na Argentina na cultivar ‘Gallega de Invierno’ por Von der Pahlen & Crnko (1965). Já o alelo *mol*<sup>2</sup> foi isolado de *Lactuca serriola* proveniente do Egito, PI-251245 Ryder (1970).

Segundo Nicaise et al. (2003), pelas mutações em certos pontos na seqüência de nucleotídeos do alelo eIF4E podemos diferenciar os alelos *mol* em alface. Conforme a agressividade do isolado de LMV, o alelo *mol* pode conferir resistência verdadeira ou também denominada imunidade (ausência de acumulação viral nas plantas inoculadas) ou tolerância, onde há acumulação viral, porém a planta não apresenta sintomas ocasionados pela infecção viral (GERMAN-RETANA et al., 2008).

Existe uma interação *in vitro* da região VPg do LMV com o eIF4E de alface (MICHON et al., 2006; ROUDET-TAVERT et al., 2007). No entanto, duas regiões do genoma independentes são responsáveis pela “quebra” de resistência de certos isolados de LMV em alfaces com o gene *mol*: a VPg possibilita suplantiar o alelo *mol*<sup>1</sup>, já

o terminal da CI (CI-Cter) permite suplantar *mo1<sup>1</sup>* e *mo1<sup>2</sup>* (ABDUL-RAZZAK et al., 2009).

Abdul-Razzak et al., (2009), fizeram demonstrações para os isolados LMV-0 e LMV-E, onde o primeiro isolado não é capaz de infectar de forma sistêmica genótipos de alface que possuem o alelo *mo1<sup>1</sup>*, enquanto que o segundo infecta sistemicamente e causa sintomas em alfaces portadoras dos alelos *mo1<sup>1</sup>* e *mo1<sup>2</sup>*. A VPg do LMV-0 foi substituída por LMV-E que conferiu ao vírus recombinante a habilidade de contornar a resistência mediada pelo alelo *mo1<sup>1</sup>* enquanto que a CI do LMV-E possibilita contornar ambos alelos *mo1<sup>1</sup>* e *mo1<sup>2</sup>*

Roudet-Tavert et al. (2012) observaram que o terminal da CI (CI-Cter) e a VPg do LMV, assim como o eIF4E de alface sofrem uma interação *in vitro* e *in vivo* e que a forma que interagem é mais forte no isolado LMV-E em comparação ao LMV-0. A proteína CI possui atividade de helicase e ATPase; é necessária para a replicação do RNA viral, e já foi demonstrada como fundamental ao movimento intra e inter celular (CARRINGTON et al., 1998; WEI et al., 2010). Assim, no caso do LMV possivelmente a resistência promovida pelo eIF4E esteja relacionada com a dificuldade do vírus em infectar sistemicamente a planta, ou de se mover célula a célula pela interação da CI, VPg, eIF4E e eIF4G (WANG & KRISHNASWAMY, 2012).

Segundo Pink et al. (1992), os isolados podem ser classificados em patótipos, de acordo com o fenótipo das cultivares de alface frente aos isolados do LMV (Tabela 1). O patótipo I não é capaz de infectar cultivares com genes de resistência (*Mo2*, *mo1<sup>1</sup>* e *mo1<sup>2</sup>*). Dessa forma o patótipo II causa sintomas nas cultivares que possuem o gene *Mo2*. Sendo assim o patótipo III é capaz de infectar e causar sintomas em plantas com os genes *Mo2* e *mo1<sup>1</sup>*. Portanto os isolados do patótipo IV são capazes de superar a resistência proporcionada pelos três genes (*Mo2*, *mo1<sup>1</sup>* e *mo1<sup>2</sup>*).

**Tabela 1.** Reação de cultivares de alface a isolados de LMV classificados em diferentes patótipos (de acordo com Pink *et al.*, 1992).

Cultivar	Gene(s) de resistência	Reação <sup>a</sup>			
		I	II	III	IV
Salinas	--	S	S	S	S
Ithaca	<i>Mo2</i>	R	S	S	S
Malika	<i>mo1<sup>1</sup></i>	R	R	S	S
Salinas 88	<i>mo1<sup>2</sup></i>	R	R	R	S
Vanguard 75	<i>mo1<sup>2</sup> Mo2</i>	R	R	R	S

<sup>a</sup> S: reação de suscetibilidade; R: reação de resistência

Existe uma segunda classificação de acordo com Krause-Sakate et al. (2002) onde os isolados do LMV podem ser agrupados em três grandes grupos: um grupo do Yemen, um de Balkans (Grécia e Croácia) denominado grupo Gr e o grupo RoW (Rest of the World). Os isolados dos grupos Yemen e Gr, não são transmitidos por sementes, infectando plantas portadoras dos alelos *mo1<sup>1</sup>* e *mo1<sup>2</sup>*. O grupo RoW é dividido em dois sub-grupos: o LMV-Common, onde os isolados são incapazes de infectar plantas com os alelos *mo1<sup>1</sup>* ou *mo1<sup>2</sup>* e o LMV-Most (mo1-breaking seed transmitted) que superam a tolerância conferida por ambos os alelos e são transmitidos via sementes. O isolado LMV-AF199 classificado como LMV-Most induz sintomas de necrose sistêmica nos cultivares de alface ‘Ithaca’ (gene dominante *Mo2*) e ‘Vanguard 75’ (*Mo2* e *mo1<sup>2</sup>*), levando a morte da planta. (PAVAN et al., 2005).

O LMV pode infectar outras plantas além da alface como: escarola, espinafre, endívia, chicória e várias espécies selvagens da família *Asteraceae* (DINANT e LOT, 1992). Experimentalmente, o vírus pode infectar algumas espécies das famílias *Chenopodiaceae* e *Solanaceae*, incluindo *Chenopodium quinoa* e *Nicotiana benthamiana* (KRAUSE-SAKATE et al., 2001).

Em países como EUA e Holanda, a estratégia de controle mais utilizada para o LMV é através da certificação de sementes. Nos EUA a tolerância é de zero sementes contaminadas em um lote de 30.000 sementes testadas através de DAS-ELISA; já na Holanda se adota um rigor maior, zero em um lote de 2.000 sementes (BOS

et al., 1994; ZERBINI et al., 2002). No Brasil a estratégia de certificação de sementes tem eficiência muito baixa, pois o cultivo de alface ocorre durante o ano todo com condições propícias para o desenvolvimento dos afídeos (SALA & COSTA, 2005), e das plantas hospedeiras que servem de fonte de inoculo de LMV; além de plantios muito próximos uns aos outros.

O uso de inseticidas como único método de controle não é satisfatória (PAVAN et al., 2005) uma vez que os inseticidas registrados não são rápidos o suficiente para eliminar os vetores antes da inoculação dos vírus. Em alguns casos, como o uso de inseticidas do grupo dos piretróides, podem até elevar a incidência dos vírus por eles transmitidos, devido a excitação causada por esses produtos antes da morte do inseto, aumentando as picadas de prova (SLEUTJES, 2003). Para o controle do LMV devemos adotar um conjunto de medidas como eliminação de plantas daninhas e restos culturais e adoção de um período livre de alface na área (PAVAN et al., 2005).

Atualmente as principais variedades de alface plantadas no Brasil apresentam tolerância ao LMV-II tais como Elisa, Lídia, Gamboa e Regiane (tipo lisa); Vanda, Gizele e Malice (tipo crespa), Maisah (tipo americana) e Mimosa Bolinha (tipo mimosa). Não há variedades resistentes ao LMV-IV sendo comercializados no Brasil, de forma que é imprescindível a busca por fontes de resistência a este grupo de isolados de LMV.

Aliada à ausência de genes que confirmam tolerância ou resistência ampla para os dois subgrupos do LMV e a sua transmissão por sementes, à diversidade de afídeos presentes em nossas condições é de extrema importância para a disseminação do LMV. Somado a isso, o grande número de espécies de afídeos envolvidos na transmissão deste vírus, e à modalidade não persistente com que são transmitidos os tornam agentes poderosos na disseminação do vírus nas áreas cultivadas (RACCAH et al., 2001).

#### **4.5 Lettuce mottle virus (LeMoV)**

O LeMoV é um possível membro do gênero *Sequivirus* (JADÃO, 2004). Foi inicialmente descrito por Marinho et al. (1982) no Distrito Federal, infetando tanto cultivares imunes como resistentes ao LMV. Apresenta partículas isométricas com aproximadamente 30 nm de diâmetro, ocorre em baixas concentrações no extrato foliar e é

transmitido via extrato vegetal tamponado (MARINHO et al., 1982). Oligonucleotídeos específicos para LeMoV são disponíveis para a detecção em RT-PCR (JADÃO, 2004). Estudos de incidência do LeMoV em diferentes regiões produtoras de alface do Estado de São Paulo foram realizados, mostrando que aproximadamente 10% das amostras coletadas com sintomas de mosaico e mosqueado no campo estavam infectadas por este vírus, tanto em infecção isolada como em infecção mista com o LMV (KRAUSE-SAKATE et al., 2008).

Os sintomas do LeMoV quando isolados podem se confundir com os causados pelo LMV, sendo porém mais fracos, sob a forma de um mosqueado salpicado e sem necrose (PAVAN et al., 2005). Dados preliminares indicam que o LeMoV é transmitido pelo afídeo *Hyperomyzus lactucae* e não é transmitido por semente.

A principal medida de controle é a produção de mudas em condições protegidas de pulgões e evitar a presença de plantas daninhas hospedeiras (PAVAN et al., 2005).

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Localização dos experimentos**

As cultivares de alface, 169501 (11-02) e 169501C (11-03), utilizadas nos ensaios são oriundas da coleção pertencente à Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA) da UNESP em Botucatu e foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Norberto da Silva.

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação do Departamento de Proteção Vegetal da FCA/UNESP em Botucatu, e também onde se realizaram as análises laboratoriais.

### **5.2 Escolha do isolado viral**

No presente trabalho não foi utilizado o isolado de LMV AF-199, sabidamente pertencente ao subgrupo Most, pois Moura (2013) já havia testado o comportamento destas mesmas variedades a este isolado viral. Os resultados obtidos com o isolado AF-199, mostraram que os dois genótipos foram suscetíveis ao LMV, porém sintomas leves e tardios foram verificados. O isolado de LMV oriundo da empresa Sakata Seed Sudamerica, chamado de LMV-SK, foi estudado neste trabalho, pois dados prévios indicavam ausência de infecção viral por este isolado nos genótipos 169501 (11-02) e 169501C (11-03) de alface. O isolado de LeMoV, foi obtido em lavoura comercial de

alface na região de Piedade/SP. A espécie viral foi confirmada com o uso de primers específicos em reação de RT-PCR descritos por Jadão et al. (2004).

### **5.3 Manutenção do isolado viral**

Os isolados de LMV-SK e LeMoV foram mantidos por meio de inoculações via extrato vegetal, utilizando-se tampão fosfato de potássio 0,05M pH 7,0 em plantas de alface cultivar ‘Trocadero’, altamente suscetível a infecções por vírus. Como abrasivo, foi utilizado o Carborundum (600 mesh) misturado ao inóculo após o seu preparo.

As amostras foram preservadas pelo método de dessecação, cortando as folhas com sintomas em tiras finas e colocando-as em pequenos frascos preparados com uma camada de cloreto de cálcio anidro no fundo, sobreposta com algodão e papel de filtro. Os frascos foram vedados, etiquetados e armazenados em geladeira a 4°C na tentativa de se preservar a infectividade original; além da coleta de sementes das plantas mais velhas.

### **5.4 Transmissão via extrato vegetal de isolados do LMV-SK e LeMoV**

Foi utilizado como inóculo folhas de alface ‘Trocadero’ infectadas com o isolado viral, sendo maceradas (1:3 p/v) em almofariz com tampão de inoculação tampão fosfato de potássio 0,05M pH 7,0. A inoculação nas duas variedades foi realizada através da fricção das folhas previamente polvilhadas com abrasivo carborundum 600 mesh.

Foram inoculadas três plantas por semana de cada variedade, além de uma planta de alface da cultivar ‘Trocadero’ como controle da efetividade da inoculação. No total foram realizadas quatro inoculações semanais, como mostra a Tabela 2.

**Tabela 2.** Cronograma de transmissões via extrato vegetal e via afídeos. DAT: dias após o transplântio.

<b>Cronograma do ensaio</b>	<b>Data</b>
Semeadura	18/05/2014
Transplântio	06/06/2014
1 <sup>a</sup> . Inoculação e transmissão	07 DAT
2 <sup>a</sup> . Inoculação e transmissão	14 DAT
3 <sup>a</sup> . Inoculação e transmissão	21 DAT
4 <sup>a</sup> . Inoculação e transmissão	28 DAT

### 5.5 Transmissão via afídeos

As colônias de pulgão *Myzus persicae*, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Valdir Atsushi Yuki (IAC/Campinas), previamente identificadas como pertencentes a tal espécie. Estas foram mantidas em plantas de nabo forrageiro sadias (*Raphanus sativus*) em casa de vegetação no Departamento de Proteção Vegetal da FCA/UNESP.

Indivíduos ápteros de *M. persicae* foram retirados das folhas com auxílio de pincel fino e macio e acondicionados em placas de Petri de vidro, onde permaneceram em jejum por 30 minutos. Em seguida, foram submetidos a um período de acesso à aquisição de 40 a 50 minutos em uma folha de alface ‘Trocadero’ infectada com LMV e transferidos para um período de acesso à transmissão de uma hora, sobre três plantas de alface da variedade 169501 (11-02) e mais três da variedade 169501C (11-03) sadias.

Como controle da transmissão foi utilizado uma planta de alface da variedade ‘Trocadero’. Cada planta recebeu 15 pulgões. Posteriormente as plantas foram pulverizadas com inseticida piretróide (Decis 25EC<sup>®</sup>, na dosagem 1 mL do produto comercial em 3 L de água) para a eliminação dos afídeos. As plantas foram mantidas em casa de vegetação para posteriores avaliações de sintomas e análise por ELISA.

## 5.6 Teste biológico com plantas diferenciadoras

O teste biológico foi realizado de acordo com Pink et al. (1992), onde foram inoculadas as seguintes variedades de alface: ‘Salinas’, ‘Ithaca’, ‘Malika’, ‘Salinas 88’ e ‘Vanguard 75’ com o LMV-SK. Estas variedades são capazes de diferenciar os isolados de LMV em patótipos.

Como inóculo foram utilizadas folhas de alface ‘Trocadero’ infectadas com LMV-SK, que foram maceradas (1:3 p/v) em almofariz com tampão de inoculação tampão fosfato de potássio 0,05M pH 7,0 com adição de abrasivo carborundum 600 mesh. A inoculação foi realizada através da fricção da solução contendo o inóculo. Plantas de alface da cultivar ‘Trocadero’ foram utilizadas como controle da efetividade da inoculação.

## 5.7 Extração de RNA Total pelo método de Bertheau et al. (1998)

As amostras foram trituradas (1:5 p/v) em tampão PBS – Tween contendo PVP K25 a 2% (p/v) e Na-DIECA 20 mM. Posteriormente centrifugadas por 10 minutos a 13000 rpm em tubos de microcentrífuga a 4°C (Centrífuga Eppendorf 5804 R). Duzentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, acrescentando-se 20 µl de SDS 10%. Incubou-se a 55°C por 15 minutos em banho-maria e adicionou-se 100 µl de solução de acetato de potássio a 3 M, agitando-se bem. Seguiu-se incubação no gelo por 5 minutos e centrifugação por 5 minutos a 13000 rpm (4°C), transferindo-se o sobrenadante para um novo tubo. Adicionou-se 700 µl de NaI 6 M e 5 µl de uma solução contendo silício, previamente agitada para que o silício fosse ressuspenso. Agitou-se bem e manteve-se a solução por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida a solução foi centrifugada por 1 minuto a 5000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o “pellet” duas vezes com 500 µl de solução de lavagem (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 1mM, NaCl 100mM e igual volume de etanol absoluto), seguida de centrifugação por 1 minuto a 5000 rpm para cada lavagem. Posteriormente secou-se o “pellet” a vácuo (Speed Vacuum Eppendorf Concentrator 5301) e ressuspenso-se o RNA em 400 µl de água Milli-Q tratada com DEPC, seguido de

incubação por 5 minutos a 55°C em banho-maria. Seguiu-se centrifugação por 5 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante (300 µl) foi transferido para um novo tubo e armazenado a – 20°C.

### 5.8 Amplificação por RT-PCR

Plantas de duas variedades de alface 169501(11-02) e 169501C (11-03) foram testadas para a presença de LMV. A reação foi realizada através dos oligonucleotídeos LMV 9171 (5' GCGTTGATGTCGTCATCYTT 3') e LMV 8894 (5'CCGTACATAGCIGARTGTGCT 3'), que amplificam um fragmento de 278 bp, descritos por Revers et al. (1997).

A reação de RT-PCR foi realizada em uma só etapa utilizando-se o Kit de PCR Master Mix (Ampliçon). Para um volume final de 25 µL foram adicionados: 5 µL de produto de extração de RNA, 12,5 µL de tampão Master Mix, 1 mM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1 unidade da transcriptase reversa AMV (Avian myeloblastosis virus, Promega, 15 u/µl) e água DEPC para completar o volume. A condição da reação de RT-PCR foi de 42 °C por 15 minutos para transcrição reversa; desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 20 segundos; 40 ciclos de anelamento a 54 °C por 20 segundos; 40 ciclos de polimerização a 72 °C por 40 segundos e polimerização final por 10 minutos a 72 °C.

Para as plantas dos ensaios de inoculação por LeMoV foram utilizados os oligonucleotídeos Lmo3 (5' ACATGAGCACTAGTGAGG 3') e Lmo4 (5' AGATAGAGCCGTCTGGCG 3'), que amplificaram um fragmento de 300 bp, descritos por Jadão (2004). Para a reação de RT-PCR foram utilizados 5 µL de produto de extração de RNA, 12,5 µL de tampão Master Mix, 1 mM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1 unidade da transcriptase reversa AMV (Avian myeloblastosis virus, Promega, 15 u/µl) e quantidade suficiente de água DEPC para completar 25 µL. O ciclo utilizado consistiu em 30 minutos a 42 °C, seguido de 2 minutos a 95 °C e 40 ciclos de 95 °C/30 segundos, 54 °C/1 minuto e 72 °C/1 minuto e finalizando com 72 °C/10 minutos.

### 5.9 Análise da RT-PCR em gel de agarose

O produto da RT-PCR (5 µL) foi corado com 1 µl de corante, e juntamente com o marcador molecular 1kb Ladder (Invitrogen) foi visualizado em gel de

agarose a 0,8%, em tampão TBE (0,1 M de ácido bórico; 0,02 mM EDTA pH 8,3) corado com intercalante GelRed™ (Biotium).

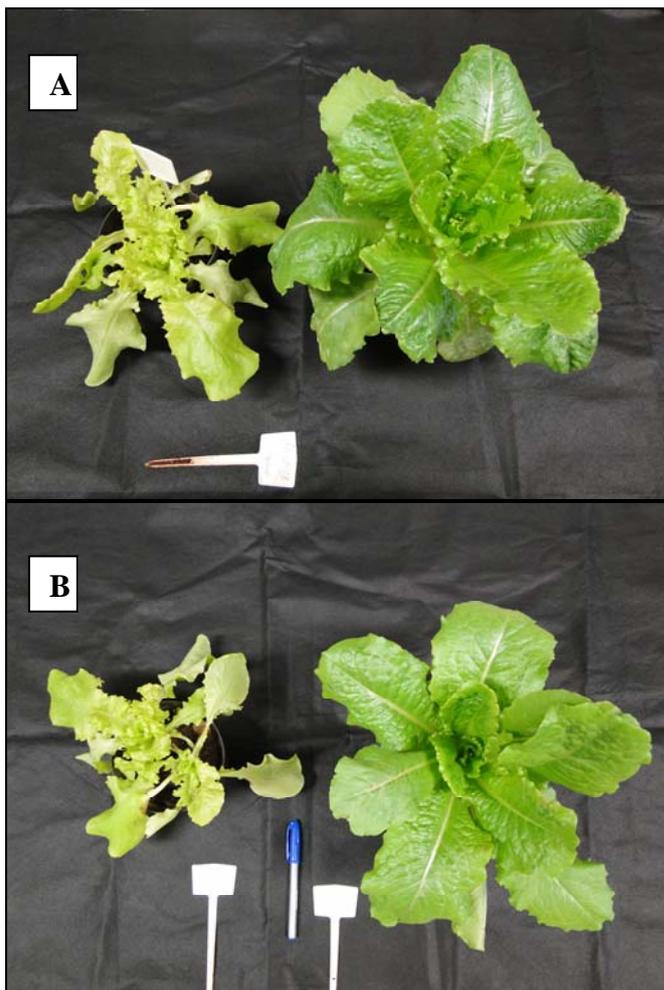
### 5.10 Teste sorológico

Na detecção de LMV também foi utilizado o teste de ELISA-indireto utilizando anti-soro Anti-Poty (Agdia), onde inicialmente as amostras foram maceradas em tampão de extração Indirect Sample Extraction (1,59 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2,93 g de NaHCO<sub>3</sub>, 0,2 g de NaNO<sub>3</sub>, 20 g de Polyvinylpyrrolidona (PVP) dissolvidos em 1000 mL de água destilada), 100 µL do macerado foi adicionado às cavidades das placas e incubado por 2 horas em temperatura ambiente. A placa foi lavada por 7 vezes em tampão PBS-Tween (NaCl (8,0g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,5 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,2 g), KCl (0,2 g), Tween 20 (500 µL) dissolvidos em 1000 mL de água destilada obtendo uma solução final com pH 7.4), seguido da adição do anticorpo, diluído (1:400) em ECI Buffer (20 g de Polyvinylpyrrolidona (PVP), 2,0 g de albumina bovina, 0,2 g de NaNO<sub>3</sub>) e incubado por 16 horas a 4°C, seguido de lavagem por 7 vezes em tampão PBS-Tween. Em seguida adicionou-se o conjugado, diluído em ECI Buffer (1:400), e incubado por 2 horas, seguido de lavagem por 7 vezes em tampão PBS-Tween. A revelação foi feita utilizando a enzima p-nitrofenilfosfato (1,0 mg/mL) diluído em 5 mL de tampão Tris 0,2 M (Sigma). Após 60 minutos, a leitura da placa foi efetuada em leitor automático de microplaca, em absorvância de 405 nm. Foram consideradas amostras positivas os que apresentaram valores três vezes maiores que o controle negativo.

## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

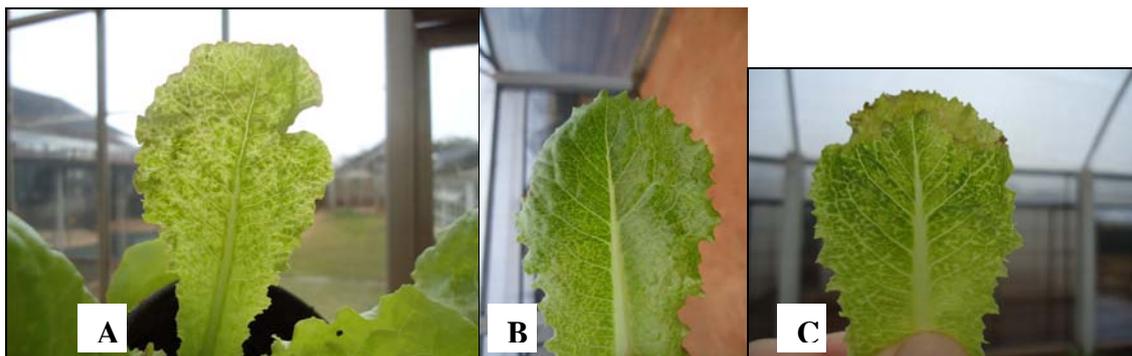
### **6.1 Inoculação por extrato vegetal**

As plantas de alface das variedades 169501(11-02) e 169501C (11-03) inoculadas com o isolado de LMV-SK, não apresentaram sintomas de infecção viral em nenhuma das quatro inoculações. Todas as alfaces da variedade 'Trocadero', utilizadas como controles da efetividade da inoculação, apresentaram sintomas de infecção por vírus em média 10 dias após a inoculação (Figura 2).



**Figura 2.** A) Alface cultivar ‘Trocadero’ (esquerda) e alface 169501(11-02) e B) alface cultivar ‘Trocadero’ (esquerda) e alface 169501C (11-03) aos 14 dias após inoculação com o *Lettuce mosaic virus*.

Quanto a inoculação destes mesmos genótipos com o *Sequivirus* LeMoV, verificou-se que ambos possibilitaram o aparecimento de sintomas ocasionados pelo vírus, equivalentes aos verificados na alface ‘Trocadero’ utilizada como padrão de suscetibilidade (Figura 3).



**Figura 3.** Sintomas ocasionados pelo Lettuce mottle virus em alface cultivar ‘Trocadero’(A) e nos genótipos 169501C (11-03) (B) e 169501 (11-02) (C).

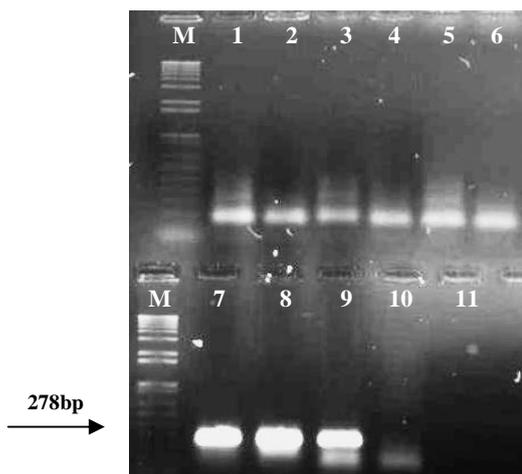
Os mesmos resultados foram observados utilizando-se o afídeo *Myzus persicae* para transmissão do LMV-SK. Não foi observado sintoma de infecção viral por LMV-SK em nenhuma das duas variedades de alface 169501(11-02) e 169501C (11-03). Em contrapartida, as plantas de alface ‘Trocadero’ apresentaram sintomas de infecção viral em todos os intervalos de transmissão.

Testes de transmissão com LeMoV não foram realizados, pois ainda não está bem definida a espécie de afídeo responsável pela sua transmissão.

## 6.2 Detecção do LMV-SK e LeMoV por RT-PCR

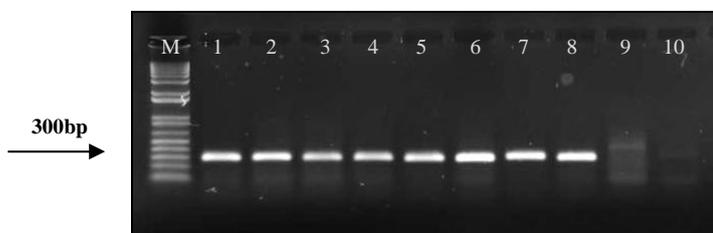
Todas as plantas pertencentes aos genótipos 169501(11-02) e 169501C (11-03) inoculadas com LMV-SK e LeMoV foram submetidas a extração de RNA pelo método de Bertheau et al., (1998) seguida de reação de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para cada espécie viral.

Folhas dos genótipos 169501(11-02) e 169501C (11-03) inoculadas com LMV-SK foram negativas para a presença do vírus (Figura 4), indicando imunidade ao vírus. Já as plantas de alface ‘Trocadero’ utilizadas como controle foram positivas para este vírus.



**Figura 4.** Análise em gel de agarose a 0,8% da RT-PCR para LMV. M: Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder; 1 a 3: cultivar 169501C (11-03); 4 a 6: 169501 (11-02); 7: alface ‘Trocadero’ infectada com LMV-SK; 8 e 9: controles positivos para LMV; 10: planta sadia; e 11: água.

Quanto ao LeMoV, todas as plantas inoculadas foram positivas para o teste de RT-PCR, confirmando-se a presença do vírus nas plantas sintomáticas (Figura 5).



**Figura 5.** Análise em gel de agarose a 0,8% da RT-PCR para LeMoV: 1 a 3: amostras da variedade 169501C (11-03); 4 a 6: amostras da variedade 169501 (11-02); 7: alface ‘Trocadero’ infectada com LeMoV; 8: controle positivo; 9: planta sadia e 10: água.

### 6.3 Detecção do LMV-SK por ELISA

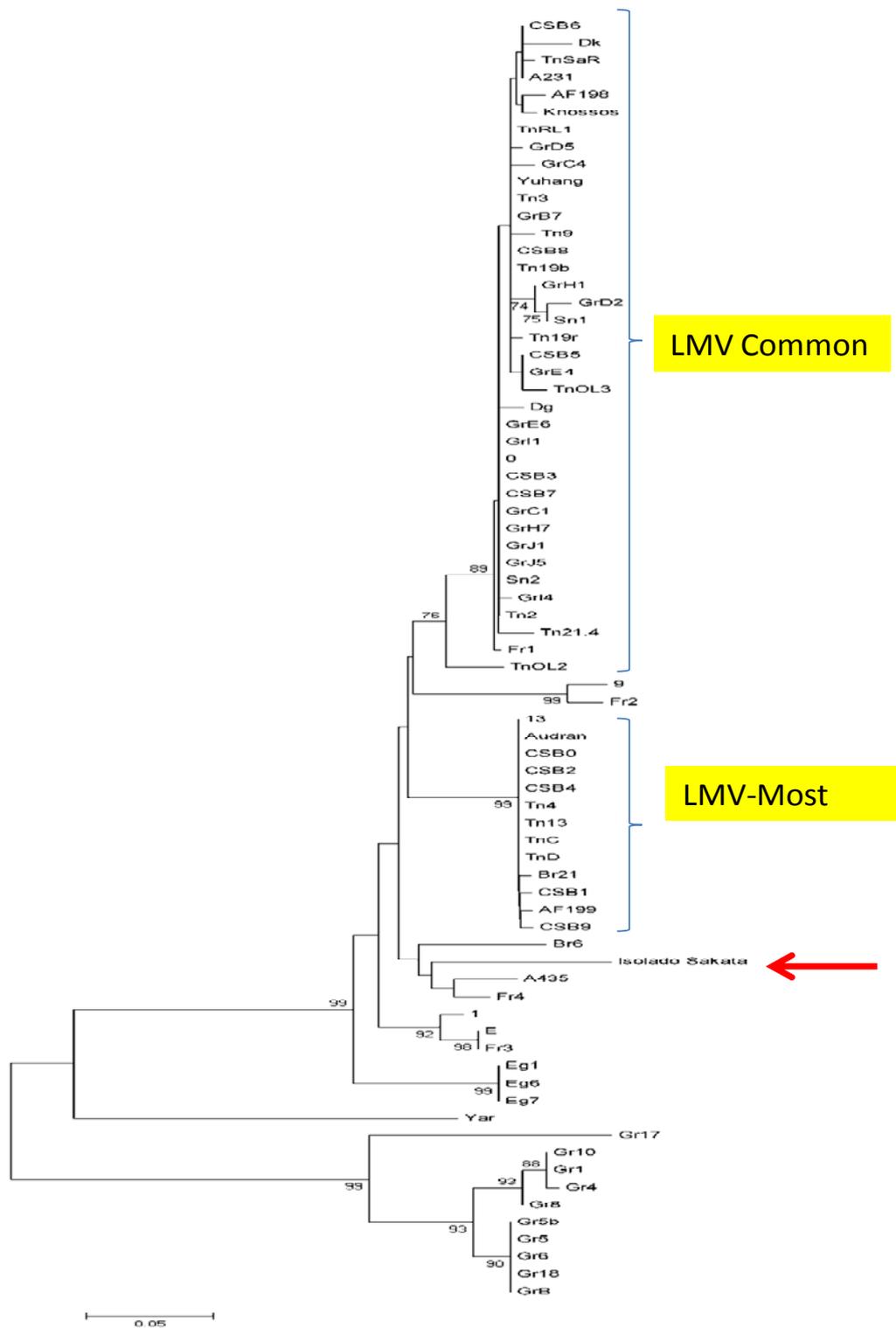
Além da detecção molecular para o LMV-SK também foi realizado o teste de detecção por meio de ELISA indireto utilizando anti-soro Anti-Poty (Agdia). Os resultados confirmaram a ausência do LMV-SK em todas as plantas pertencentes aos genótipos 169501C (11-03) e 169501(11-02), enquanto que foram positivas as plantas de ‘Trocadero’ inoculadas com o mesmo vírus.

Moura (2013) avaliou estes mesmos genótipos quanto à inoculação com o isolado de LMV-AF199, caracterizado como patótipo IV, e observou o aparecimento de um sintoma de mosaico leve, porém tardio. Estes genótipos foram avaliados também pelo mesmo autor quanto ao alelo *mol*<sup>0</sup>. Foi observada a presença de um alelo de suscetibilidade, indicando que o retardo no aparecimento dos sintomas não está ligada a este alelo.

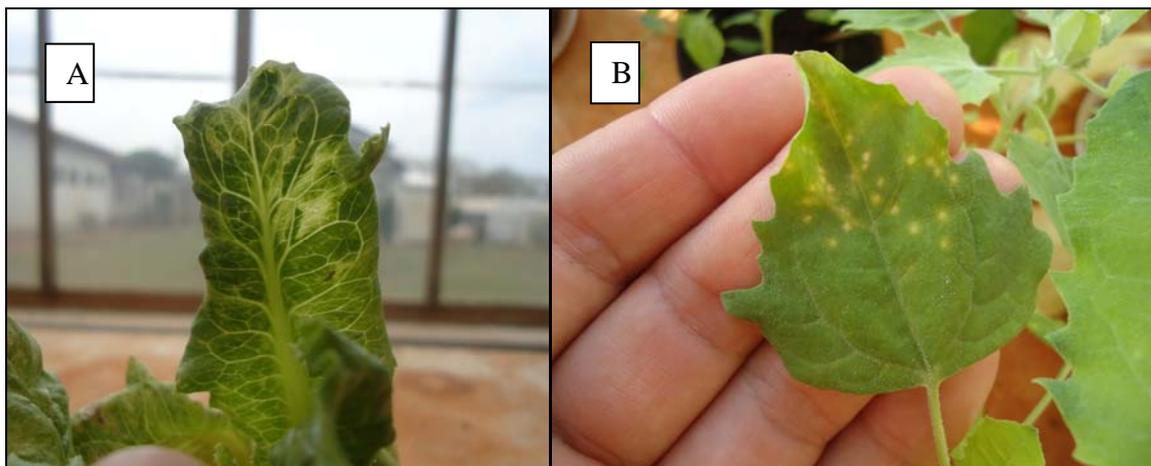
Diferentemente do trabalho conduzido por Moura (2013), no presente trabalho foi utilizado um isolado proveniente da empresa Sakata Seed Sudamerica. Para confirmar o subgrupo a que este isolado pertence foi realizada a extração pelo método de Bertheau et al., (1998) e feita a reação de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para LMV. O produto de RT-PCR foi enviado a empresa Macrogen, na Coréia do Sul, onde foi purificado e submetido a sequenciamento.

Após as análises nos programas Blast n (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e Mega 5.0 (TAMURA et al., 2011), observou-se que o isolado LMV-SK não pertence aos subgrupos Most e Common. Trata-se de um isolado com identidade de 93% ao isolado Fr4 (acesso no GenBank n. AF369010), 92% ao A435 (acesso n. AF368954) e 90% ao isolado Br6 (acesso n. AF368958) (Figura 6).

Um teste biológico foi realizado utilizando-se o isolado, que foi inoculado em plantas de alface das cultivares ‘Ithaca’ (*Mo2*), ‘Malika’ (*mol*<sup>1</sup>), ‘Vanguard 75’ (*mol*<sup>2</sup> e *Mo2*) e ‘Salinas 88’ (*mol*<sup>2</sup>). A cultivar ‘Salinas 88’ apresentou um leve clareamento da nervura e a infecção viral foi confirmada por RT-PCR. As folhas desta cultivar foram retroinoculadas em *Chenopodium quinoa* e foi possível observar sintomas de infecção viral na forma de lesão local e posteriormente mosaico sistêmico típicos aos causados pelo LMV nesta hospedeira (Figura 7). Já nas cultivares ‘Ithaca’, ‘Malika’ e ‘Vanguard 75’ não foi verificado sintomas nas plantas inoculadas com o LMV-SK. A partir da retroinoculação não foi possível detectar o LMV nestas plantas. Este resultado mostra um comportamento diferente ao observado para o isolado AF199, um típico LMV-IV e LMV-Most, que infecta estes cultivares (KRAUSE-SAKATE et al., 2001).



**Figura 6.** Árvore filogenética obtida pelo programa Mega 5.0 com os isolados de LMV. A árvore foi construída utilizando neighbor joining, com valor de Bootstrap de 2000.



**Figura 7.** Alfaca cultivar ‘Salinas 88’ (A) com sintoma de leve clareamento das nervuras e *C. quinoa* sintoma de lesão local (B) aos 14 dias após retroinoculação.

Pôde-se concluir pelas análises biológicas que a resistência verificada nos genótipos 169501C (11-03) e 169501(11-02) ao LMV-SK não é conferida pelo alelo *moI*<sup>2</sup>, uma vez que em ‘Salinas 88’ que possui este gene o isolado LMV-SK foi capaz de induzir sintomas de mosaico. Pôde-se concluir pelas análises biológicas que a resistência verificada nos genótipos 169501C (11-03) e 169501(11-02) ao LMV-SK não é conferida pelo alelo *moI*<sup>2</sup>, uma vez que em ‘Salinas 88’ que possui este gene o isolado LMV-SK foi capaz de induzir sintomas de mosaico.

Os dados aqui obtidos reforçam a necessidade de se conhecer muito bem o isolado viral para o qual se realiza avaliação de resistência ou tolerância de plantas, visando melhoramento genético. Apesar dos genótipos 169501C (11-03) e 169501(11-02) serem imunes ao LMV-SK, este não é um isolado de LMV típico e não é representativo dos isolados de LMV encontrados no campo.

## 7 CONCLUSÕES

- Os genótipos de alface 169501C (11-03) e 169501(11-02) são imunes ao isolado LMV-SK, mas suscetíveis ao LeMoV;
- O isolado LMV-SK não pôde ser classificado em patótipos segundo a classificação de Pink et al. (1992);
- O isolado LMV-SK não pertence ao subgrupo Most, nem ao subgrupo Common.

## 8 REFERÊNCIAS

ABDUL-RAZZAK, A. et al. Involvement of the cylindrical inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against lettuce mosaic potyvirus. **Molecular Plant Pathology**, Chichester, v. 10, p. 109–113, 2009.

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

BERGER, P. H. et al. Potyviridae In: FAUQUET, C. M. et al. **Virus Taxonomy**, Eight Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses, San Diego, 1259 p, 2005.

BERTHEAU, Y. et al. **DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR)**. IN: PEROMBOLON, M. C. M. & van der WOLFF, J. M. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potatoes. Scottish Crop Research Institute Occasional Publication, 1998.

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

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

CHAVES, A. L. R. et al. *Erigeron bonariensis*: hospedeira alternativa do *Lettuce mosaic virus* no Brasil. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 307-311, 2003.

CHUNG, B. Y. W. et al. **An overlapping essential gene in the Potyviridae**. PNAS, v. 105, n. 15, p. 5897–5902, 2008.

COSTA, C. L. Vetores de vírus de plantas – I. Insetos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP)**. Passo Fundo – RS, p.103-171, 1998.

- DAROS, J. A., CARRINGTON, J. C. RNA binding activity of Nia proteinase of Tobacco etch potyvirus. **Virology**, Waltham, v. 237, p. 327-336, 1997.
- DINANT, S.; LOT. H. Lettuce Mosaic Virus. **Plant Pathology**, Chichester, v. 41, p. 528-542, 1992.
- EDWARDSON, J. R.; CHRISTIE, S. R. **Lettuce mosaic virus**. In: The potyvirus group. Gainesville: University of Florida. v. 2, p. 572-588, 1991.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2007. 421 p.
- FIRMINO, A. C. et al. Prevalência da estirpe comum de *Lettuce mosaic virus* em três regiões produtoras de alface do estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 34, n. 2, p. 161-163, 2008.
- GERMAN-RETANA, S.; WALTER, J.; LEGALL, O. *Lettuce mosaic virus*: from pathogen diversity to host interactors. **Molecular Plant Pathology**, Chichester, v. 9, p. 127-136, 2008.
- GROGAN, R. G. Control of lettuce mosaic with virus-free seed. **Plant Disease**, St. Paul, v. 64, p. 446-449, 1980.
- HULL, R. Matthews **Plant Virology**. 4 ed. San Diego: Academic Press, 1001p. 2002.
- INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA**. Disponível em: [www.iea.sp.gov.br](http://www.iea.sp.gov.br). Acesso em: 25 de julho de 2014.
- JADÃO, A. S. et al. Transmissão via semente do *Lettuce mosaic virus* (LMV) patótipos II e IV em diferentes genótipos de alface. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 28, p. 58-61, 2002.
- JADÃO, A. S. et al. **Caracterização parcial e desenvolvimento de oligonucleotídeos específicos para detecção de Sequivirus infectando alface**. 2004. 126 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.
- JAGGER, I. C. A transmissible mosaic disease of lettuce. **Journal of Agricultural Research**, v. 20, p. 737-741, 1921.
- KING, A. M. Q. et al. **Virus Taxonomy**, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2012, p.1327.
- KRAMER, M.; ORLANDO, A.; SILBERSCHMID, T. Estudos sobre uma grave doença de vírus, responsável pelo desaparecimento de nossas culturas de alface. **O Biológico**, São Paulo. v. 11, p. 121-134, 1945.

KRAUSE-SAKATE, R. et al. Systemic necrosis caused by two isolates of *Lettuce mosaic virus* (LMV) in lettuce (*Lactuca sativa*) cultivars possessing the *Mo2* gene. **Virus Reviews and Research**, (Supplement), v. 4, p.153. 1999.

KRAUSE-SAKATE, R. et al. Molecular characterization of *Lettuce mosaic virus* field isolates reveals the emergence and spread of a resistance-breaking strain, LMV-Most. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, p. 563-571, 2002.

KRAUSE-SAKATE, R. et al. T. Ocorrência generalizada do Lettuce mottle virus em três regiões produtoras de alface do Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 34, n. 1, p. 88-89, 2008.

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

MARINHO, V. L.; KITAJIMA, E. W.; LIN, M. T. & COSTA, C. L. Caracterização do vírus do mosqueado da alface. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 7:543. 1982. (Resumo)

MICHELOTTO, M. D. et al. Diversidade de afídeos em plantas invasoras de inverno em Jaboticabal, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71 (suplemento), p. 242-244, 2004.

MICHON, T. et al. The potyviral virus genome-linked protein VPg forms a ternary complex with the eukaryotic initiation factors eIF4E and eIF4G and reduces eIF4E affinity for a mRNA cap analogue. **The FEBS Journal**, Chichester, v. 273, p. 1312–1322, 2006.

MOURA, M. F. **Potyvirus: caracterização parcial de espécies em plantas daninhas associadas à cultura do pimentão, avaliação de genótipos de alface e análise subcelular do eIF4E e de proteínas do *Lettuce mosaic virus***. 2013. 71 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

MURPHY, S. F. et al. A tyrosine residue in the small nuclear inclusion protein of tobacco vein mottling virus links the VPg to the viral RNA. **Journal of Virology**, Washington, v. 65, p. 511-513, 1991.

MURPHY, F. A. et al. Virus Taxonomy. Sixty Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, Wien, n. 10, 1995. (Suplemento) 586 p.

NEBREDA, M. et al. Activity of aphids associated with lettuce and bróccoli in Spain and their efficiency as vector of *Lettuce mosaic virus*. **Virus Research**, Amsterdam, v. 100, n. 1, p. 83-88, 2004.

NICAISE, V. et al. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus *Lettuce mosaic virus*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, p. 1272-1282, 2003.

- PAHLEN Von Der A.; CRNKO J. El virus de la mosaico de la lechuga (Marmor lactucae Holmes) en Mendoza y Buenos Aires. **Revista de Investigaciones Agropecuarias**, Buenos Aires, p. 25-31, 1965.
- PAVAN, M. A.; KUROZAWA, C. Doenças de alface (*Lactuca sativa* L.). In: KIMATI, H. et al. (Ed). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**, 3 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, v. 2, cap. 4, p. 18-25, 1997.
- PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R.; KUROZAWA, C. Doenças da alface. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**, 4 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, v. 2, p. 27-33, 2005.
- PINK, D. A. C.; KOSTAOVA, D.; WALKEY, D. G. A. Differentiation of strains of lettuce mosaic virus. **Plant Pathology**, Chichester, v. 41, p. 5-12, 1992.
- PIRONE, T. P.; BLANC, S. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. **Annual Review Phytopathology**, v. 34, p. 227-247, 1996.
- RACCAH, S.; HUET, H.; BLANC, S. **Potyvirus**. In: HARRIS, K.F.; SMITH, O.P.; DUFFUS, J.E. (eds). *Virus-Insect-Plant Interactions*, p. 181-206, 2001.
- RESENDE, J. A. M. & CUPERTINO, E. P. Doenças em hortaliças. **Informe Agropecuário**, 18:18-27. 1995.
- REVERS, F. et al. Biological and molecular variability of lettuce mosaic virus isolates. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, p. 397-403, 1997.
- ROUDET-TAVERT, G. et al. Central domain of a potyvirus VPg is involved in the interaction with the host translation initiation factor eIF4E and the viral protein HC-Pro. **Journal of General Virology**, Reading, v. 88, p. 1029-1033, 2007.
- ROUDET-TAVERT, G. et al. The C terminus of lettuce mosaic potyvirus cylindrical inclusion helicase interacts with the viral VPg and with lettuce translation eukaryotic initiation factor 4E. Reading: Society for General Microbiology, **Journal of General Virology**, v. 93, p. 184-193, 2012.
- RYDER, E. J. Inheritance of resistance to common lettuce mosaic. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 95, p. 378-379, 1970.
- RYDER, E. J. Transmission of common lettuce mosaic virus through the gametes of lettuce plants. **Plant Disease**, St. Paul, v. 48, p. 522-523, 1964.
- SALA, F. C.; COSTA C. P. 'Piraroxa': Cultivar de alface crespa de cor vermelha intensa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 158-159, 2005.
- SALAS, F. S. **Controle de insetos-vetores causadores de viroses em hortaliças**. In: REUNIÃO INTINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO, IV. Anais... Ribeirão Preto, 2001.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. A. **The Potyviridae**. CAB International, Wallingford, 1994. 516p.

SLEUTJES, P. S. **Manejo integrado de viroses na cultura do pepineiro (*Cucumis sativus* L.) em ambiente protegido**. 2003. 69 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

SYLVESTER, E. S. *Lettuce mosaic virus* transmission by the green peach aphid. St. Paul: American Phytopathological Society, **Phytopathology**, St. Paul, v. 45, p. 357-369, 1955.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011. Disponível em: <<http://www.megasoftware.net/>>. Acesso em: 25 Jul..2014. doi:10.1093/molbev/msr121.

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

WANG, A.; KRISHNASWAMY, S. Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. **Molecular Plant Pathology**, Chichester, v. 13, n. 7, p. 795-803, 2012.

WEI, T. et al. Formation of Complexes at Plasmodesmata for Potyvirus Intercellular Movement Is Mediated by the Viral Protein P3N-PIPO. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 6, n. 6, 2010.

YUKI, V. A. Pulgões da alface. **Anais da 3ª Reunião Itinerante de Fitopatologia do Instituto Biológico (RIFIB)**, p. 79-86, 2000.

ZERBINI, F. M.; CARVALHO, M. G.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. **Introdução à Virologia Vegetal**, Viçosa, 2002. 145 p.

ZERBINI, F. M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. A família *Potyviridae* – Parte I. COSTA, C. L. In: LUZ, W. C. (Eds). **Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP)**. Passo Fundo – RS, p. 1-66, 1999.

ZERBINI, F. M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. A família *Potyviridae* – Parte II. COSTA, C. L. In: LUZ, W. C. (Eds). **Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP)**. Passo Fundo – RS, p. 225-265, 2000.