ROSA MARIA CHUNG

REAÇÃO DE LINHAGENS E CULTIVARES DE ALFACE AO *LETTUCE MOSAIC VIRUS* (PATOTIPO IV)

Dissertação de Mestrado apresentada à Comissão de pós-graduação do Instituto Agronômico de Campinas como parte dos requisitos para realização da Defesa de Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical na área de Concentração em Melhoramento Genético Vegetal.

Orientador: Dr. Joaquim Adelino de Azevedo Filho.
Co-orientadora: Dra. Addolorata Colariccio.

Campinas

2005

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária do Instituto Agronômico de Campinas

C472r Chung, Rosa Maria

Reação de linhagens e cultivares de alface ao *Lettuce Mosaic* Vírus (pototipo IV)./Rosa Maria Chung. Campinas: Instituto Agronômico, 2005.

43 fls. : il.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Adelino de Azevedo
Co-orientadora: Profa. Dra. Addolorata Colariccio
Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético) – Instituto Agronômico de Campinas

1. *Lactuca sativa*. 2. LMV patotipo IV. 3. Alface. I. Azevedo, Joaquim Adelino de. II. Colariccio, Addolorata. III. Instituto Agronômico de Campinas. IV. Título.

CDD – 635.52

DEDICO O TRABALHO
AOS MEUS PAIS E IRMÃS,
PELO INCENTIVO E CONFIANÇA.

AGRADECIMENTOS

Neste momento importante da minha escolha profissional, não poderia de deixar de lembrar e agradecer a todos os que me auxiliaram nessa etapa da vida.

Ao pesquisador cientifico Dr. Joaquim Adelino de Azevedo Filho do Pólo Regional de Pesquisa e Desenvolvimento dos Agronegócios do Leste Paulista /DDD/***apta*** pela orientação, confiança, paciência e amizade.

À pesquisadora cientifica Dra. Addolorata Colariccio do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia do Instituto Biológico pela iniciação na pesquisa de virologia e ensinamentos transmitidos, confiança na execução do trabalho e amizade.

Ao profissional Deusdedit Alves Pereira pelo incentivo na realização da pesquisa, e auxílio na coleta das amostras virais.

A Hortec Tecnologia de Sementes LTDA, pelo apoio financeiro para execução da pesquisa e ao engenheiro agrônomo Gilberto Pozzan, pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação.

Ao pesquisador científico Piero Roggero (*in memorian*) do "Instituto di Virologia Vegeral di Torino", Itália, pelos antissoros utilizados na execução do trabalho.

Ao Instituto Biológico pela oportunidade na execução dos experimentos.

Aos pesquisadores do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia do Instituto Biológico que de alguma forma contribuíram na execução deste trabalho.

Aos docentes e o Instituto Agronômico pela contribuição à minha formação e a oportunidade de realização do curso de pós-graduação.

As estagiárias do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia do Instituto Biológico, em especial Silvia Regina Luz Palazzo e Silvia Rocha Moreira pela amizade e apoio na realização dos trabalhos.

Aos funcionários do IAC e Instituto Biológico que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização do presente trabalho.

Aos colegas da pós-graduação que participaram desta etapa da minha carreira.

Aos amigos, pelo incentivo, paciência e apoio na realização deste trabalho.

CHUNG, R. M. REAÇÃO DE LINHAGENS E CULTIVARES DE ALFACE AO *LETTUCE MOSAIC VIRUS* (PATOTIPO IV). 2005. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal) – Instituto Agronômico de Campinas.

RESUMO

Este trabalho teve como metas avaliar a reação de 18 linhagens superiores do programa de melhoramento de alface (*Lactuca sativa*) do Centro de Pesquisa Desenvolvimento e Análises de Horticultura IAC-*apta* (CPDAH IAC-*apta*) e de seis cultivares comerciais, ao *Lettuce mosaic virus* (LMV), isolado de alfaces do tipo americana 'Raider', lisa 'Karla' e crespa 'Hortência', em 2003, na região de Atibaia, SP. O vírus presente nestes isolados foi identificado no Laboratório de Fitovirologia, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal do Instituto Biológico, por meio de inoculação mecânica em plantas indicadoras e diferenciadores e de testes sorológicos de *Plate Trapped Antigen*-Enzyme linked-immunosorbent assay (PTA-ELISA). Foram inoculados 18 linhagens e 6 cultivares, e como controle positivo foi utilizada a cultivar 'White Boston' por sua suscetibilidade ao LMV. Em todas as amostras de alface 'Raider', 'Karla H25' e 'Hortência' avaliadas, foi identificada a presença do LMV patotipo IV. Nos experimentos de avaliação da reação dos genótipos de alface ao LMV, as plantas foram inoculadas com o isolado 'Karla H25'. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso e analisado pelo teste do qui-quadrado. Foram detectados genótipos com comportamento de susceptibilidade e tolerância. As linhagens 602-3 e 602-4 foram classificadas como tolerantes ao LMV patotipo IV isolado de alface 'Karla' H25 podendo, portanto, ser recomendado o seu plantio, para reduzir os prejuízos causados pelos sintomas do LMV. Os cultivares comerciais, que possuem tolerância para o patotipo II, manifestaram sintomas de mosaico mais brandos, quando inoculadas com este isolado do LMV.

Palavras-chave: *Lactuca sativa*; LMV patotipo IV; Tolerância; Alface.

CHUNG, R. M. REACTION OF *LACTUCA SATIVA* LINES TO AGAINST OF *LETTUCE MOSAIC VIRUS* (PATHOTYPE IV). 2005. Dissertation (Master Program in Genetic and Breeding Plants) – Instituto Agronômico de Campinas.

ABSTRACT

This research aimed to investigate the reaction of 18 best lines and 6 varieties of lettuce (*Lactuca sativa*) to an isolate of *Lettuce mosaic virus* (LMV), collected from plants of lettuce around Atibaia in March of 2003. The symptoms observed in the field conditions on the lettuce varieties 'Raider', 'Karla' H25 and 'Hortência' were stunted plants, mosaic and necrotic leaves. The symptoms etiology was identified by mechanical inoculation in host plants and differential lettuce varieties, containing genes of resistance for LMV pathotypes and by serology ELISA-PTA. The results of virus identification were positive for LMV pathotype IV in all cultivated varieties. For the screening of the best lines of *apta* lettuce program and commercial variety, the choose strain was 'Karla' H25. The 18 best lines and 6 varieties were inoculated with the LMV pathotype IV isolate 'Karla' H25 and the reaction evaluation was made by the presence of the symptoms. The plants apparently symptomless were submitted to PTA-ELISA and retro-inoculation biological test in *Chenopodium amaranticolor*. The reactions of the 24 lines were classified by the reaction proposed by Matthews. The results indicated the presence of lines with susceptibility and tolerance degree. The lines 602-3 and 602-4 were classified how tolerant and this results suggests they can provide an alternative to reduce the damage of the disease. The commercial varieties with tolerant reaction to LMV pathotype II, showed mild mosaic were fewer symptoms in comparison with susceptible control.

Key words: *Lactuca sativa;* LMVpathotype IV; Tolerance; Lettuce.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alface ‘Karla’ com sintomas de mosaico, Atibaia-SP 18

Figura 2. Alface ‘Karla’com sintomas de necrose, Atibaia-SP 18

Figura 3. Alface ‘Raider’ com sintomas de mosaico e nanismo, Atibaia-SP 19

Figura 4. Alface ‘Hortência’ com sintomas de mosaico e nanismo, Atibaia-SP..... 19

Figura 5. Genealogia da série Brasil do IAC/***apta*** 23

Figura 6. Genealogia do cultivar 'Regina'..... 24

Figura 7. Alface ‘White Boston’, planta com sintomas de nanismo x planta sadia ... 34

Figura 8. Alface ‘Salinas 88’, folha sadia x folha com distorção do limbo foliar..... 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Comportamento de cultivares de alface diferenciadores para os quatro patotipos do LMV, proposto por PINK *et al*.(1992) 21

Tabela 2. Relação dos genótipos empregados na avaliação da reação ao LMV isolado 'Karla H25' 22

Tabela 3. Classificação do comportamento das plantas a infecção por vírus, conforme critérios estabelecidos por MATTHEWS (2002) 26

Tabela 4. Dados climáticos de temperatura e luminosidade, médias obtidas nos meses da avaliação dos experimentos, no ano de 2004 27

T**abela 5.** Círculo de hospedeiras e sintomatologia das plantas indicadoras induzidos pelos vírus isolados de alface 30

Tabela 6. Comportamento das hospedeiras diferenciadoras utilizadas para identificação dos patotipos do LMV presente nos isolados de alface 'Raider', 'Karla H25' e 'Hortência' 31

Tabela 7. Principais sintomas induzidos pelo LMV nos genótipos avaliados para a resistência 32

Tabela 8. Comportamento dos genótipos de alface ao LMV patotipo IV isolado 'Karla H25' 33

SUMÁRIO

RESUMO iv

ABSTRACT v

LISTA DE FIGURAS vi

LISTA DE TABELAS vii

1 INTRODUÇÃO 1

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4

2.1 *Lactuca sativa* 4
2.2 Alface no Brasil 5
2.3 Gênero *Potyvirus* 6
2.4 Vírus do Mosaico da Alface - *Lettuce mosaic virus* (LMV) 7
2.5 Transmissão e Círculo de Plantas Hospedeiras 9
2.6 Resistência Genética e Expressão dos Sintomas 10
2.7 O Programa de Melhoramento de Alface do IAC 12

3 MATERIAL E MÉTODOS 14

3.1 Local de realização dos experimentos 14
3.2 Procedimentos experimentais 14
3.3 Transmissão Mecânica 16
3.4 Coleta, Identificação e Manutenção dos Isolados 17
3.5 Identificação dos Patotipos do LMV em alface 'Raider', 'Karla' e 'Hortência' 20
3.6 Genealogia dos Genótipos de Alface pertencentes ao IAC / ***apta*** 21
3.7 Avaliação da Reação dos Genótipos de Alface ao isolado 'Karla H25' 24
3.8 Teste sorológico PTA-ELISA ("*Plate Trapped Antigen* - Enzyme Linked-Immunosorbent Assay") 27

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 29

4.1 Identificação dos vírus nos Isolados de Alface 29
4.2 Reação dos Genótipos de Alface ao LMV patotipo IV isolado 'Karla H25' 31

5 CONCLUSÃO 38

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 39

1 INTRODUÇÃO

A alface *(Lactuca sativa* L.) pertence à família Asteraceae, gênero *Lactuca*, no qual estão identificadas mais de 100 espécies. É a hortaliça folhosa mais consumida no Brasil e apresenta em sua constituição nutricional, cálcio e vitaminas A e C.

No estado de São Paulo, no ano de 2003, a aquisição domiciliar "per capita" anual de alface foi de 0,672 Kg (IBGE, 2004). No mesmo ano, foram cultivados 6580,15 hectares, com uma produção de 4.792.486,00 engradados, com capacidade para 9 dúzias (IEA, 2004). No Brasil foram comercializadas, durante o ano de 2000, 25 toneladas de sementes nuas e 72 toneladas de sementes peletizadas (ABCSEM, 2001).

Um dos principais problemas fitopatológico que atinge diretamente a produção da alface é a ocorrência de viroses, ocasionando queda na qualidade e na produção. Dentre os diversos vírus que ocorrem na cultura da alface o mais importante é o *Lettuce mosaic virus* (LMV), com ocorrência generalizada em todas as regiões produtoras de alface do Brasil (ZERBINI, 1995).

A epidemiologia do LMV está associada à transmissão por sementes, podendo variar de 3 a 10% dependendo do cultivar e do patotipo; à rápida disseminação pelos afídeos vetores; à ocorrência de espécies da vegetação espontânea, como reservatórios naturais do vírus e às condições ambientais.

As perdas causadas pelo LMV podem atingir até 100 % , quando o vírus está presente em lavouras em estádio de desenvolvimento avançado e condições climáticas favoráveis à presença de afídeos (ZERBINI, 1995; DINANT E LOT, 1992). No Brasil as perdas ocorrem, principalmente, devido ao sistema de plantio escalonado e consecutivo empregado na cultura da alface, ao grande número de hospedeiras do LMV, entre as espécies da vegetação espontânea, as quais contribuem para a manutenção da fonte de inoculo no campo, o modo de transmissão não persistente e a ocorrência de diferentes patotipos do LMV nessa cultura.

Na Europa, uma das principais medidas de controle adotada é o uso de cultivares resistentes ao LMV. Já nos Estado Unidos , como medida de controle é adotado o uso de sementes indexadas, associado ao manejo de plantas daninhas e períodos sem cultivo (ZERBINI *et al*., 1995). Em regiões primárias de plantio, onde ainda não há ocorrência do vírus, a utilização de sementes sadias pode retardar o estabelecimento da doença.

No Brasil os sintomas do LMV foram diminuídos pela utilização de cultivares resistentes da série Brasil, sendo o primeiro a ser lançado o 'Brasil 48' do IAC, cuja fonte dos genes de resistência utilizados foi da 'Gallega de Invierno' (NAGAI, 1979).

A identificação e a caracterização dos patotipos do LMV, que ocorrem no Brasil é de fundamental importância para a recomendação de cultivares e direcionamento dos programas de melhoramento, visando o uso e a obtenção de cultivares de alface com resistência ao LMV. Entretanto convém lembrar que, o uso de cultivares resistentes pode levar ao aparecimento de novas estirpes, capazes de quebrar a resistência estabelecida. Assim, são necessários, sempre, novos estudos, para a identificação de genes de resistência e sua incorporação em linhagens promissoras dessa olerícola.

Por mais de 20 anos a resistência genética condicionada pelos genes *g e mo*, foi classificada como durável, sendo responsável pela baixa incidência de mosaico (LMV) no Brasil. Em 1994, STANGARLIN (1995) identificou uma nova variante do LMV que quebrou a resistência conferida por estes genes.

A capacidade de diferentes estirpes do LMV de suplantar a resistência conferida pelos genes mo^1_1 (g) e mo^2_1 (mo) é empregada como base para a classificação do LMV em patotipos, sendo reconhecidos os patotipos I, II, III e IV nas principais regiões produtoras de alface do mundo (PINK, 1992a, REVERS *et al*., 1997a). No Brasil, foram identificados os patotipos II, IV (STANGARLIN *et al*., 2000) e o patotipo III em cultivo de alface hidropônico no cinturão verde de São Paulo (COSSA *et al*., 2000). Em 2003, foi observada uma epidemia de mosaico em cultivos comerciais de alface 'Hortência' na região de Atibaia, SP, cujo agente causal foi identificado como LMV patotipo IV (CHUNG *et al*., 2004).

O presente trabalho teve como objetivos identificar os patotipos do LMV isolado de alface, provenientes de cultivos comerciais da região de Atibaia, SP e avaliar a reação de linhagens superiores, do Programa de Melhoramento de Alface do Centro de Horticultura do Instituto Agronômico (IAC), da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (***apta*),** e de cultivares de alface a esse isolado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Lactuca sativa*

A alface *(Lactuca sativa* L.) pertence à família Asteraceae, tribo Cichoraceae e gênero *Lactuca* (FERAKOVA, CITADO POR RYDER, 1986). Os primeiros relatos da cultura da alface ocorreram no Egito onde supõe - se que a utilizavam como forrageiras e para extrair óleo das suas sementes. Em pinturas encontradas nas tumbas dos túmulos egípcios em 4500 aC, a alface assemelhavam-se ao tipo romana, que eram plantas de folhas lanceoladas e pontudas. Do Egito, o cultivo difundiu-se para Grécia e Roma. Com a descoberta do Novo Mundo, a alface espalhou-se rapidamente neste Continente e em 1647 já era cultivada no Brasil. A forma ancestral da alface, *L.serriola*, é ainda encontrada do Mediterrâneo e Ásia central até o Norte da China e Nepal (LINDQUIST, 1960 a).

A alface cultivada, *L. sativa* pertence ao grupo Serriola, juntamente com as espécies *L. serriola, L. saligna, L. virosa* em ordem decrescente de compatibilidade sexual com *L. sativa* (LINDQUIST, 1960 b; RYDER E WHITAKER, 1976). *L. serriola* é provavelmente o progenitor de *L sativa* (KESSELI *et al.,* 1991) e, por esta razão, apresenta boa especificidade combinatória. O genoma de *L. sativa* tem tamanho de aproximadamente 2.3 pg (KOOPMAN E DE JONG, 1996) e número diplóide de cromossomo igual a dezoito (RYDER, 1986).

2.2 Alface no Brasil

A alface é uma das hortaliças folhosa mais consumida no Brasil e apresenta em sua constituição nutricional, cálcio e vitaminas A e C. No estado de São Paulo, em 2003, a aquisição domiciliar "per capita" anual de alface foi de 0,672 Kg (IBGE, 2004), sendo cultivado 6580,15 hectares com uma produção de 4.792.486,00 engradados, com capacidade para 9 dúzias (IEA, 2004). No Brasil foram comercializadas, durante o ano de 2000, 25 toneladas de sementes nuas e 72 toneladas de sementes peletizadas (ABCSEM, 2001).

Nos anos 80, o padrão da alface consumida no Brasil era do tipo lisa 'White Boston'. Nessa época, as principais contribuições no lançamento de cultivares de alface tipo lisa foram feitas pelo setor público IAC com o lançamento dos cultivares da série 'Brasil' (NAGAI, 1993) e Instituto de Genética (USP/ESALQ) com a cultivar 'Regina'.

Atualmente, a alface lisa vem sendo gradativamente substituída por outras e atualmente, o seu espaço corresponde a menos de 20 % do mercado. A alface tipo crespa tem maior adaptabilidade para o cultivo de verão, em contraste com o tipo lisa, devido principalmente ao pendomento lento (COSTA E SALA, 2005). O segmento de alface predominante no Brasil é do tipo crespa, com 60 % do mercado (ABCSEM, 2003).

Outro grupo de alface que tem participação no mercado brasileiro é a alface americana, que ocupa 15 % do mercado (ABCSEM, 2003) sendo que a maioria dos cultivares comercializados é adaptado para o cultivo em áreas de temperaturas amenas (COSTA E SALA, 2005).

2.3 O Gênero *Potyvirus*

O LMV pertence ao gênero *Potyvirus,* família *Potyviridae*. Este gênero possui 75 espécies e infecta, aproximadamente, trinta diferentes famílias de plantas (SHUKLA *et al*., 2000).

Os potyvírus apresentam como características comuns, a morfologia alongada e flexuosa das partículas, a formação de inclusões cilíndricas no citoplasma das células infectadas, a transmissão por afídeos de modo não persistente e a transmissão por sementes de algumas espécies deste genêro (MATTHEWS, 2002).

Quanto às propriedades biológicas, a maioria dos vírus pertencentes a esse gênero é transmitida experimentalmente, por inoculação mecânica e tem um círculo de hospedeiras restrito a família na qual foram identificados; poucas espécies de *Potyvirus* possuem hospedeiras em famílias botânicas diferentes. Para a identificação das estirpes de diferentes espécies de *Potyvirus,* a inoculação mecânica em plantas hospedeiras diferenciadoras é um método biológico bastante sensível, que possibilita essa diferenciação (MATTHEWS, 2002).

A transmissão de espécies de *Potyvirus* por afídeos ocorre de maneira não persistente, em poucos minutos ou alguns segundos. Existem mais de 200 espécies de afídeos conhecidas como vetores de *Potyvirus* (SHUKLA *et al*., 2000). Para a transmissão do LMV os vetores mais eficientes foram *Nasonovia ribisnigri* (BRASE E RAGOZZINO, 1977); *Aphis gossypii*; *Macrosiphum euphorbia*; *M. gei e Myzus persicae* (BRUNT *et al.,* 1990). No Brasil, o LMV é

transmitido pelos afídeos *Macrosiphum euphorbiae; Myzus persicae; M. solanifolli e Uroleucon sonchi* (COSTA, 1998; KRAMER *et al*., 1945).

2.4 Vírus do mosaico da alface *Lettuce mosaic virus* (LMV)

A morfologia das partículas do LMV é flexuosa e alongada, medindo aproximadamente 750 nm de comprimento e 13nm de diâmetro. O genoma é composto de um único RNA de fita simples, com aproximadamente 10.000 nucleotídeos, de sentido positivo (REVERS *et al*., 1997 b).

O ponto de inativação térmica está entre 55 e 60 ^{o}C, o ponto final de diluição é de 10^{-1} a 10^{-2} e a longevidade *in vitro* ,a 20 ^{o}C, é de 1 a 2 dias (TOMLINSON, 1970).

Os sintomas de LMV em alface caracterizam-se por mosaico esbranquiçado, mosqueado, distorções foliares, amarelecimento e, principalmente, pela redução do crescimento. Isolados mais agressivos do vírus podem ocasionar manchas necróticas nas folhas e morte da planta (TOMLINSON, 1970; STANGARLIN, 1995; CHUNG *et al.,* 2004).

Cultivares do grupo lisa apresentam sintomas de mosaico distorções e amarelecimento foliares, podendo ainda desenvolver necrose de nervuras e má formação ou distorções da cabeça. Em cultivares de alface crespa, os sintomas manifestam-se por mosaico e clareamento das nervuras e são menos visíveis, porém a redução do crescimento e as distorções foliares são comumente observadas. Cultivares de alface americana apresentam amarelecimento da

saia e redução de crescimento, este sintoma é descrito nos EUA como “June Yellows” (GROGAN, 1980; DAVIS *et al.*, 1997).

A capacidade das estirpes de LMV de quebrar a resistência conferida pelos genes mo^1_1 e mo^2_1 possibilitou a classificação do LMV em patotipos (PINK *et al.,* 1992b). Os isolados de LMV podem ser classificados nos patotipos I, II, III e IV de acordo com a capacidade do isolado do vírus de infectar uma série de cultivares de alface que possuem genes de resistência para os patotipos (PINK *et al*., 1992 b, REVERS *et al.,* 1997a).

O patotipo I infecta somente cultivares suscetíveis, o patotipo II infecta a cultivar ‘Ithaca’, que tem um gene de resistência (Mo^2); o patotipo III provoca sintomas severos em todos as cultivares, incluindo aquelas que têm o gene *mo* e *g;* e o patotipo IV causa sintomas de necrose e mosaico em cultivares com genes que conferem tolerância (mo^1_1 e mo^2_1) (PINK *et al*., 1992 b). A agressividade do LMV patotipo IV é maior que o LMV patotipo II (JADÃO *et al.*, 2004).

O aumento da pressão de inóculo do LMV e a capacidade de multiplicar-se em cultivares, com os genes de resistência *mo* e *g* podem ter contribuído, para o aparecimento de novos patotipos, nas regiões onde a produção de alface é intensiva e contínua. A cultivar ‘Salinas 88’ resistente aos patotipos I, II e III, foi suscetível ao isolado da Grécia (GR5), sugerindo a existência de outro patotipo (BOS *et al*., 1994), que não se enquadrava na classificação proposta por PINK *et al.* (1992b). Os primeiros relatos da ocorrência do patotipo IV foram feitos na Europa e nos Estados Unidos (PINK *et al*., 1992b).

No Brasil, o primeiro relato da ocorrência do LMV foi feito por KRAMER *et al*. (1945), no estado de São Paulo. Em levantamentos realizados, posteriormente, no estado de São Paulo em 1994, foi relatada a primeira ocorrência do patotipo IV no Brasil (STANGARLIN *et al*., 2000). Análises moleculares dos isolados de LMV AF198 e AF 199 provenientes do Brasil indicaram similaridade filogenética, com os isolados procedentes dos EUA, Europa e Chile (SAKATE *et al*., 2001). Essas informações sugerem que a entrada do LMV patotipo IV no Brasil, possivelmente ocorreu através de sementes infectadas provenientes desses países.

2.5 Transmissão e círculo de plantas hospedeiras

O LMV é transmitido, na natureza, de plantas infectadas para outras plantas , através de diferentes afídeos vetores. A transmissão por afídeos ocorre após um breve período de aquisição e a infecção se dá durante o período da alimentação, que pode durar de poucos segundos até poucos minutos, transmissão não persistente. Os vírus são geralmente retidos pelos afídeos virulíferos durante o período alimentar, por um intervalo inferior à uma hora, embora, fora do período alimentar, tais insetos possam reter determinados isolados de vírus por um período de 30 a 40 horas (FERRERES *et al*., 1992).

O vírus também pode ser transmitido de maneira eficiente através das sementes contaminadas da alface. A infecção em sementes ocorre através do pólen e do óvulo das plantas infectadas (RYDER, 1964), porém os mecanismos de infecção de sementes ainda não estão bem estabelecidos, apesar dos efeitos histopatológicos e citológicos terem sido relatados

(HUNTER E BOWYER, 1993; HUNTER E BOWYER, 1994). Plantas de alface infectadas quando cultivadas em temperaturas baixas, apresentam uma maior taxa de transmissão por semente (RYDER, 1973).

Plantas com os genes *g* (mo^1_1) e *mo* (mo^2_1) não são imunes ao vírus, mas este se multiplica nelas mais lentamente do que em cultivares susceptíveis e a manifestação dos sintomas é mais branda (PINK *et al*., 1992a).

O LMV apresenta um grande número de hospedeiras, entre elas, plantas da vegetação espontânea que são consideradas reservatórios naturais do vírus. As principais famílias de hospedeiras são: Aizoaceae, Amaranthaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Boraginaceae, Caryyophyllaceae, Chenopodiaceae, Curcubitáceae, Geraniaceae, Lamiaceae, Leguminosae, Malvaceae, Martyniaceae, Papilionaceae, Polygonaceae, Primulaceae e Solanaceae (DINANT E LOT, 1992).

2.6 Resistência genética e expressão dos sintomas

As primeiras fontes de resistência ao LMV em alface, foram identificadas no final dos anos 60 e possuíam o gene recessivo mo^1_1 (anteriormente denominado g) (BANNEROT *et al*. 1969). Este gene foi obtido a partir da cultivar argentina 'Gallega de Invierno' (VAN DER PAHLEN E CRNKO, 1965) e o gene recessivo mo^2_1 (anteriormente denominado mo) de *L. sativa* (PINK *et al*., 1992 a), proveniente do Egito (RYDER, 1968). Os genes recessivos *g e mo* são considerados muito próximos e altamente ligados ou alelos do mesmo locus (PINK *et al*., 1992

b). Dois genes dominantes foram identificados, um em *L. sativa* (Mo^2) (PINK *et al.,* 1992 a) e outro em *L. virosa* (Mo^3) (MAISONNEUVE *et al*., 1997).

No Brasil, por mais de 20 anos a resistência genética condicionada pelos genes *g e mo*, foi classificada como durável, sendo responsável pela baixa incidência de mosaico. Em levantamentos realizados no estado de São Paulo em 1994, foram observados sintomas do LMV nos cultivares comerciais de alface 'Brasil-303'e 'Elisa', ambos com genes de resistência ao LMV (STANGARLIN, 1995). Estudo realizado com esses cultivares possibilitou a identificação da ocorrência de uma nova variante do LMV, denominado patotipo IV, capaz de quebrar a resistência conferida pelos genes presentes nesses materiais (STANGARLIN *et al*., 2000).

O primeiro cultivar a ser lançado no Brasil com resistência ao LMV foi 'Brasil 48' do IAC, cuja fonte de resistência foi proveniente da 'Gallega de Invierno' (NAGAI, 1979). Outro material com resistência foi a P.I. 251245-9 proveniente de *L. serriola* altamente resistente, mas por apresentar fortes características de planta selvagem, não foi comercialmente viável (NAGAI, E COSTA, 1971). Posteriormente, foram lançados outros cultivares da série Brasil: 202, 221, 303, 304, 311 (NAGAI, 1993). Os genes recessivos gg (mo^1_1) e momo (mo^2_1), identificado respectivamente em 'Gallega de Invierno' e PI 251245-9, expressam tolerância permitindo a multiplicação do vírus com supressão de sintomas nas plantas infectadas e não interferem no crescimento das mesmas. (RYDER, 1970).

Estudos realizados por RYDER (2002) demonstraram que os sintomas necróticos causados pelo LMV são condicionados por dois alelos, o Necrotic-1m e Necrotic-1p. Foi constatado, também, que na PI 226514 existem dois genes nucleares recessivos, um alélico

para mo-1 e outro interagindo com o mo-1 que confere alta resistência ao vírus. Plantas provenientes do cruzamento da PI 226514 e 'Salinas 88', combinando os genes Mi e mo-1e foram classificadas como altamente resistentes, pela redução da quantidade do vírus acumulado, em comparação com os cultivares resistentes atualmente cultivados (HAYES E RYDER, 2004).

Os sintomas do vírus no campo podem variar de acordo com a cultivar, o isolado viral, o estádio de desenvolvimento das plantas e as condições do ambiente, tais como temperatura e luminosidade, tendo sido verificado que em condições de temperaturas elevadas, o número de planta assintomáticas é maior. (RYDER, 1979).

2.7 Programa de melhoramento de alface do IAC

O programa de melhoramento de alface do Instituto Agronômico de Campinas iniciou-se em 1968, e após cinco anos de trabalhos, lançou o cultivar ‘Brasil 48’, primeiro cultivar nacional com resistência ao LMV. Esse programa continuou nos anos posteriores, com outros objetivos tais como aumentar o tamanho de planta, melhorar a resistência ao ‘Tip Burn’, diminuir as brotações, aumentar a largura da base, melhorar a formação de cabeça, e selecionar plantas precoces com maior tolerância ao pendoamento, resultando desses estudos o lançamento das séries Brasil 202, 221, 303, 304 e 311 (NAGAI, 1993).

No ano de 1988, houve a ocorrência do tospovírus do tomateiro em alface, causando grandes prejuízos aos produtores. Por essa razão iniciou-se um trabalho para incorporação de genes de resistência também a esse vírus, utilizando-se a *Lactuca sativa* PI 342517-'Ancora', como fonte de resistência (HARTMAN, 1986 citado por NAGAI, 1993), resultando nas séries Brasil 602 e 603 (NAGAI, 1993).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia (LFF) do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal (CPDSV), do Instituto Biológico, São Paulo, e na Estação Experimental Hortec Tecnologia de Sementes LTDA (EEH) em Jarinú, São Paulo.

Os testes biológicos para a identificação das amostras coletadas em Atibaia, SP, e o estudo da reação das linhagens de alface, pertencentes ao IAC-*apta*, e dos cultivares ao isolado de alface 'Karla H25', foram realizados na casa de vegetação do LFF, protegidas com telas anti-afídeos; os testes sorológicos foram realizados no LFF. Os experimentos foram conduzidos durante os anos de 2003 e 2004.

3.2 Procedimentos experimentais

Os procedimentos experimentais foram compostos das seguintes etapas:

1 - O substrato utilizado foi terra vegetal esterilizada (TVE) com vapor quente por um período de 48 horas;

2- Foram realizadas sementeiras para obtenção das plantas utilizadas na determinação parcial do círculo de hospedeiras e na identificação do isolado de LMV presente nas amostras coletadas. As sementeiras foram feitas em caixas plásticas, utilizando substrato (TVE) com semeadura a lanço coberta com substrato TVE peneirado;

3 – As sementeiras dos genótipos de alface e das plantas indicadoras utilizadas como controle (*Chenopodium quinoa e C. amaranticolor*) foram feitas em bandejas de 'isopor' de 200 células, em substrato comercial Eucatex e mantidas em estufa na EEHORTEC, até atingirem o estádio de quatro folhas verdadeiras. Então, as plântulas foram transplantadas para vasos com volume de 150 ml, contendo o substrato TVE e mantidas em casa de vegetação no LFF.

4 - Como fonte de inóculo de LMV foi empregado um isolado de alface 'Karla H25' coletado em Atibaia, SP. Para avaliar a reação dos genótipos de alface a este isolado foram inoculadas vinte plantas por genótipo, divididas em três experimentos. As plantas foram inoculadas no estádio de 5-6 folhas verdadeiras, sendo reinoculadas, sete dias após a primeira inoculação.

5 - Em cada experimento utilizou-se: como controle negativo, uma planta sem inocular de cada um dos genótipos de alface avaliados; e como controle positivo foi inoculadas seis plantas de cada cultivar de alface diferenciador, e para cada genótipo avaliado foi inoculadas duas plantas indicadoras (*Chenopodium quinoa e C. amaranticolor*).

6- A avaliação das plantas inoculadas foi realizada pela leitura dos sintomas. As plantas assintomáticas foram submetidas a testes de recuperação biológica em *C. quinoa* e sorológico por PTA-ELISA, contra o antissoro de LMV;

7 – Para a obtenção de plântulas dos cultivares de alface diferenciadores, empregados para a identificação dos patotipos do LMV, as sementes foram pré-germinadas em papel (filtros para café), umedecido com água destilada, e colocadas em recipientes plásticos na parte inferior da geladeira por um período de 48 horas. Após o início da germinação foram transferidas para bandejas de 'isopor' de 200 células, utilizando-se um substrato comercial da Eucatex. As bandejas foram mantidas na EEHORTEC até o estádio de 4-5 folhas verdadeiras, quando foram transferidas para o LFF e transplantadas para vasos plásticos individuais com capacidade de 150 ml, quando atingiram o estádio de 5-6 folhas verdadeiras as plantas foram inoculadas mecanicamente com o LMV isolado 'Karla H25';

8 – A irrigação foi realizada com intervalos de uma a duas vezes ao dia de acordo com a necessidade, pelo sistema de microaspersão;

9 – Foi realizado um controle fitossanitário para doenças foliares, sempre que necessário.

3.3. Transmissão mecânica

Os inóculos empregados nos testes de transmissão mecânica foram preparados pela trituração das folhas apicais de plantas sintomáticas de alface em almofariz, adicionando-se PBS-Tween pH 7,4 (tampão fosfato de sódio e potássio em salina) contendo Sulfito de Sódio 0,01 M. Utilizou-se 1 g de folhas frescas infectadas para cada 10 ml de tampão. Os inóculos foram preparados a baixas temperaturas, pela manutenção dos almofarizes a -20 ^{0}C. As

folhas foram polvilhadas com abrasivo (caborundum 600 mesh) antes de serem friccionadas com o pistilo embebido no extrato bruto.

3.4 Coleta, identificação e manutenção dos isolados.

Foram coletadas 50 amostras de alface, pertencente as cultivares 'Raider' tipo americana, 'Karla' tipo lisa e 'Hortência' tipo crespa, com sintomas de mosaico, redução no porte da planta, má-formação da cabeça e necrose das folhas (semelhante ao sintoma do complexo 'vira-cabeça'), em campos de produção comercial na região de Atibaia, Estado de São Paulo, durante o ano de 2003 (Figuras 1, 2 , 3 e 4). Os materiais foram identificados e acondicionados em sacos plásticos de polietileno, os quais foram colocados em caixas de 'isopor' com gelo e levados ao LFF do CPDSV do IB.

No laboratório, as amostras foram avaliadas pelos sintomas e separadas em dois grupos: um com sintomas severos característicos de LMV e outro com sintomas brandos e pouco característicos do LMV. Com o objetivo de identificar o agente causal dos sintomas, as amostras foram submetidas a PTA-ELISA com os antissoros contra LMV, *Tomato sppoted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Inpatiens necrotic spot virus* (INSV), Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Turnip mosaic virus* (TuMV).

Figura 1. Alface ‘Karla’ com sintomas de mosaico, Atibaia -SP

Figura 2. Alface ‘Karla’ com sintomas, necrose, Atibaia -SP

Figura 3. Alface ‘Raider’ com sintomas de mosaico e nanismo, Atibaia-SP

Figura 4. Alface ‘Hortência’ com sintomas de mosaico e nanismo, Atibaia-SP

As amostras também foram inoculadas mecanicamente em plantas indicadoras pertencentes às espécies: *C. amaranticolor; C. quinoa; C. murale; L. sativa* 'White Boston'; *Datura stramonium*; *Nicotiana bhentamiana*; *N. debneyi*; *N. glutinosa*; *N. tabacum* 'Samsun'; *N. tabacum* 'White Burley' e *Petunia hybrida.* As plantas indicadoras foram mantidas em casa de vegetação, para observação da manifestação dos sintomas, e submetidas a testes de recuperação do vírus, em *C. amaranticolor*, *L. sativa* 'White Boston', e avaliação em PTA-ELISA com o antissoro para o LMV.

A infectividade dos vírus isolados de 'Raider', 'Karla' e 'Hortência' foi mantida pela técnica de desidratação do material foliar em cloreto de cálcio ($CaCl_2$) e armazenamento à baixa temperatura (-20 ^{o}C), conforme BARRADAS (1978). O vírus isolado de alface 'Karla H25' foi mantido, também, *in vivo* pela inoculação mecânica periódica, a cada trinta dias, em plantas de *C. amaranticolor, C. murale* e *L. sativa* 'White Boston', com inoculo proveniente de plantas da cultivar 'Vanguard 75' com sintomas característicos de mosaico.

3.5 Identificação do patotipo do LMV nos isolados 'Raider', 'Karla' e 'Hortência'.

Para identificar o patotipo do LMV, isolado nos cultivares de alface coletados, os isolados foram submetidos a testes de transmissão mecânica para os cultivares de alface diferenciadores: 'White Boston', 'Ithaca', 'Calona', 'Malika', 'Salinas 88' e 'Vanguard 75', as quais, possuem diferentes genes de resistência ao LMV (PINK, *et al*., 1992a) (Tabela 1). O cultivar White Boston foi empregado como padrão suscetível, em substituição ao 'Saladin' (JADÃO *et al*., 2004).

Tabela 1 Comportamento dos cultivares de alface diferenciadores para os quatros patotipos do LMV, proposto por PINK *et al.* (1992 b).

Cultivares de alface diferenciadores	Genes que conferem resistência	Patotipo do LMV			
		I	II	III	IV
'White Boston'	-	S[1]	S	S	S
'Ithaca'	Mo^{+}_{1}, Mo_{2}	R	S	S	S
'Malika'	(g) mo^{1}_{1}, Mo^{+}_{2}	R	R	S	S
'Calona'	(g) mo^{1}_{1}, Mo^{+}_{2}	R	R	S	S
'Salinas 88'	(mo) mo^{2}_{1}, Mo^{+}_{2}	R	R	R	S
'Vanguard 75'	(mo) mo^{2}_{1}, Mo_{2}	R	R	R	S

[1]Susceptibilidade (S) e Resistência (R).

Cada isolado foi inoculado, em duas plantas de cada hospedeira diferenciadora e seis plantas de *C. amaranticolor* e *C. quinoa*. As plantas foram inoculadas no estádio de 5-6 folhas verdadeiras, como controle negativo, foi mantida uma planta de cada cultivar de alface e uma de cada hospedeira. As plantas assintomáticas foram submetidas a testes de recuperação em *C. amaranticolor* e PTA-ELISA, para avaliar a presença do LMV.

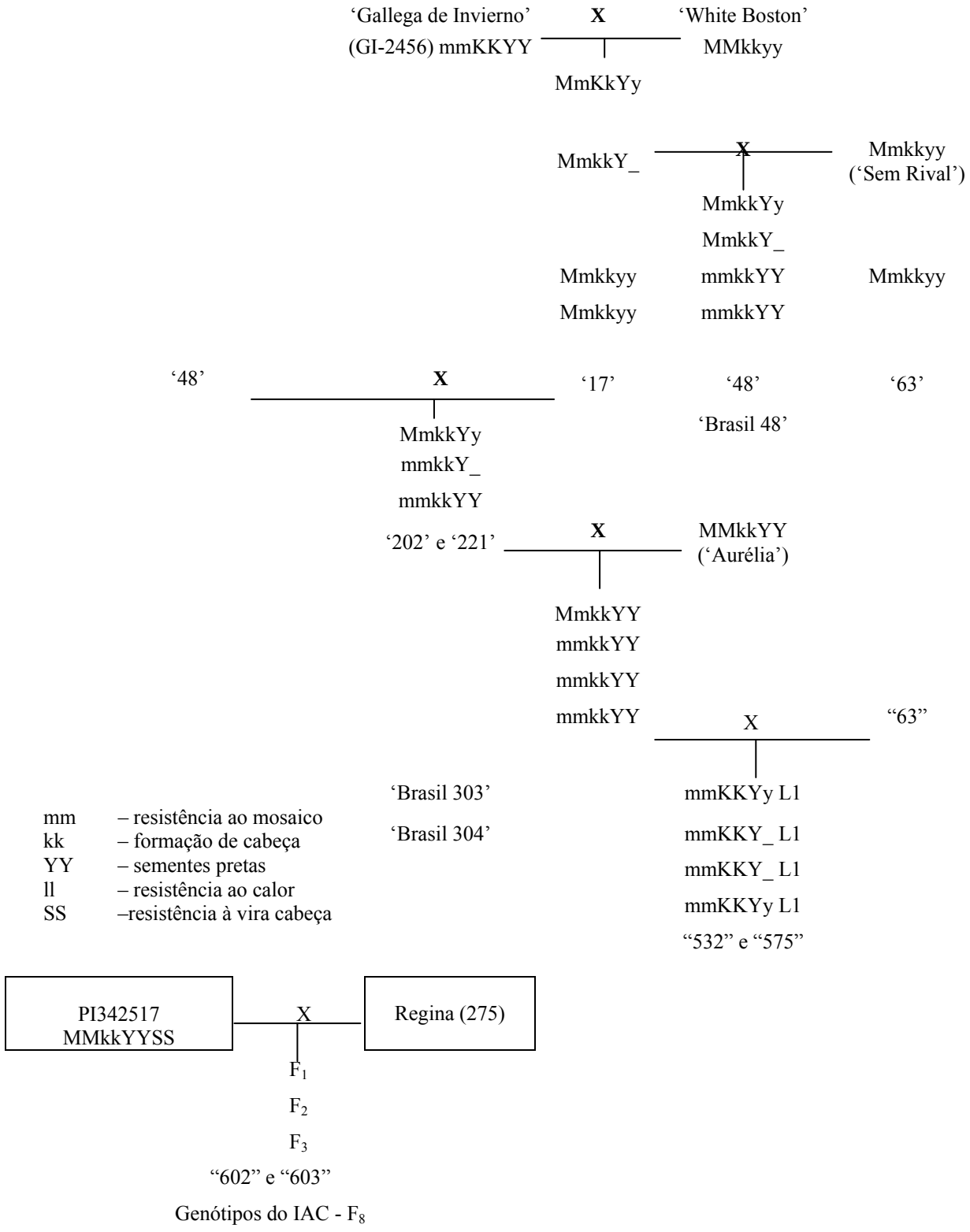
3.6 Genealogia dos genótipos de alface pertencentes ao IAC/*apta*

Foram utilizadas 18 linhagens do Programa de Melhoramento de Alface do IAC/***apta*** selecionadas, pelas características agronômicas e por apresentarem sintomas de mosaico brando em ensaios realizados em campo experimental. As linhagens utilizadas foram provenientes do cruzamento entre o cultivar 'Regina' e o PI 342517 ('Ancora') cuja genealogia está representado na Figura 5. O genitor 'Regina' possui o gene recessivo mo^{1}_{1} (anteriormente denominado g), incorporado pelo uso do cultivar Brasil 48 em sua genealogia

(Figura 6). Foram selecionados seis cultivares, representando os tipos crespa, lisa e americana, um com padrão de susceptibilidade e quatro cultivares com gene de resistência ao patotipo II.

Tabela 2 Relação dos genótipos empregados na avaliação da reação ao LMV isolado 'Karla H25'.

Lactuca sativa	Genes descritos	Origem
Linhagem 602-3		IAC/***apta***
Linhagem 602-4		IAC/***apta***
Linhagem 602-5		IAC/***apta***
Linhagem 602-22		IAC/***apta***
Linhagem 602-23		IAC/***apta***
Linhagem 602-33		IAC/***apta***
Linhagem 602-35		IAC/***apta***
Linhagem 602-44		IAC/***apta***
Linhagem 602-50		IAC/***apta***
Linhagem 602-53		IAC/***apta***
Linhagem 602-54		IAC/***apta***
Linhagem 602-71		IAC/***apta***
Linhagem 602-78		IAC/***apta***
Linhagem 602-82		IAC/***apta***
Linhagem 602-89		IAC/***apta***
Linhagem 602-108		IAC/***apta***
Linhagem 602-109		IAC/***apta***
Linhagem 602-110		IAC/***apta***
Cultivar 'Brasil 221'	mo^1_1	IAC/***apta***
Cultivar 'Rubete'	mo^2_1	Rijk Zwaan
Cultivar 'Kazan'	mo^2_1	Rijk Zwaan
Cultivar 'Gizele'	mo^1_1	Agristar
Cultivar 'Hortência'	-	Hortec Sementes
Cultivar 'White Boston'	-	IAC/***apta***



(Fonte –NAGAI, 1993; AZEVEDO FILHO *et al*. 1998).

Figura 5. Genealogia da série Brasil do IAC/***apta.***

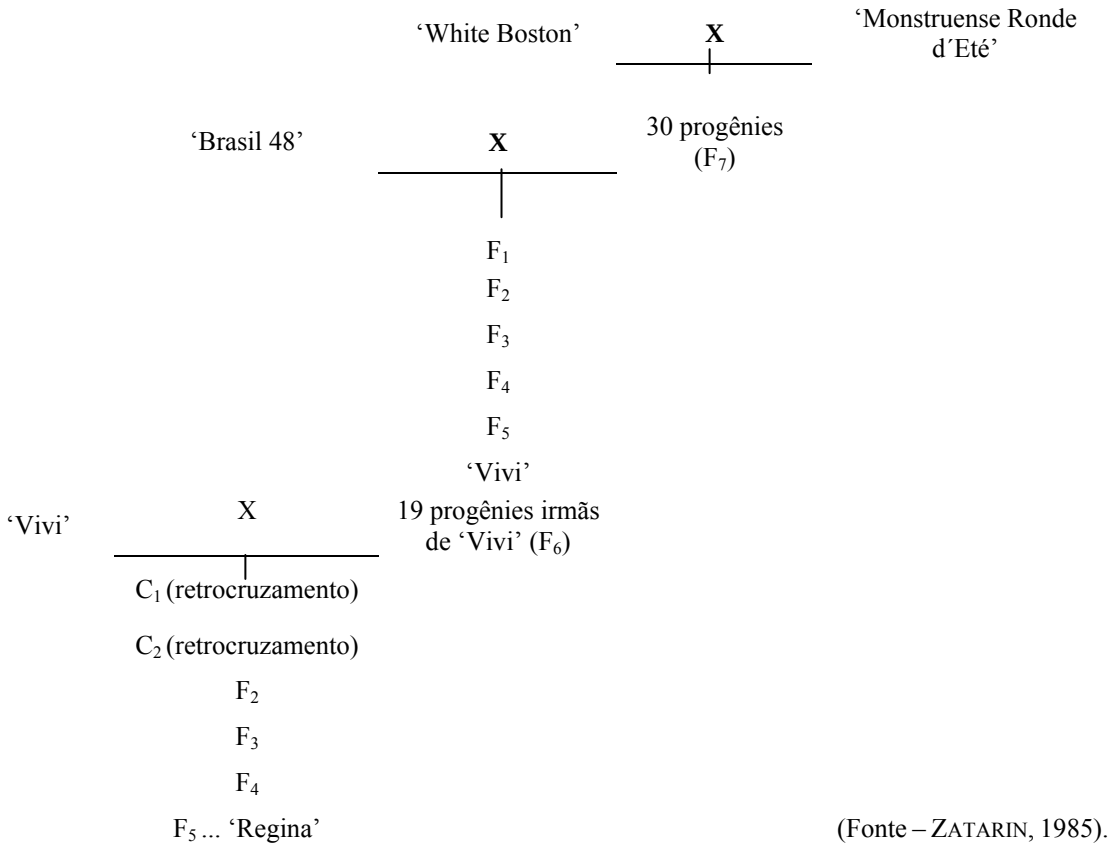


Figura 6. Genealogia do cultivar 'Regina'.

3.7 Avaliação da reação dos genótipos de alface ao vírus isolado de ‘Karla H25’

Para avaliar a reação das linhagens e cultivares empregados nestes experimentos, foi feita a opção pelo isolado de alface ‘Karla H25’, visto que todas as amostras apresentaram a mesma reação nas hospedeiras diferenciadoras. Para a realização da inoculação o isolado ‘Karla H25’ foi multiplicado na cultivar ‘White Boston’, a partir de inóculo proveniente de plantas da cultivar ‘Vanguard 75’ com sintomas característicos de mosaico.

Foram realizadas duas inoculações mecânicas, sendo a primeira no estádio de 5-6 folhas e a segunda no estádio de 7-8 folhas, uma semana após a primeira. Foram inoculadas com o isolado 'Karla H25', seis plantas de cada um dos 23 genótipos e como controle positivo da presença do vírus no inóculo foram inoculadas seis plantas de *C. quinoa* e seis plantas de alface 'White Boston'. Como controle negativo da manifestação dos sintomas nos genótipos avaliados, foi mantida uma planta de cada genótipo, sem ser inoculada.

O número de plantas foi definido para o estudo do comportamento em função do material genético utilizado ser proveniente de linhagens em geração avançada (F_8) e de cultivares, apresentando portanto, baixa variabilidade genética.

A avaliação do comportamento desses genótipos foi realizada semanalmente, após a primeira inoculação, pela manifestação e tipo dos sintomas. A presença ou ausência do vírus em plantas sem sintomas foi avaliada pela recuperação biológica (retroinoculação em *C. quinoa*) e teste sorológico (PTA-ELISA) 30 dias após a primeira inoculação, sempre nas folhas apicais. Nos testes biológicos foram consideradas positivas as amostras que induziram sintomas em *C. quinoa*. Em PTA-ELISA foram consideradas positivas as plantas que apresentaram, após leitura à 405 nm em leitor de ELISA, valores médios três vezes superiores aos valores médios dos controles sadios. O comportamento dos genótipos foi classificado com base na recuperação do vírus de plantas assintomáticas, conforme os critérios estabelecidos por MATTHEWS (2002) (Tabela 3).

Tabela 3 Classificação do comportamento das plantas a infecção por vírus, conforme critérios estabelecidos por MATTHEWS (2002).

Comportamento	Sintomas	Replicação viral	Recuperação
Imune	Ausente	Ausente	Negativa
Resistente	Local	Ausente	Negativa
Tolerante	Ausente	Presente	Positiva
Suscetível	Sistêmico	Presente	Positiva

Para avaliar se os resultados foram significativos, foi realizado o teste de χ^2 a 1% de significância para o grupo de linhagens e cultivares e através desta análise testou-se a hipótese de igualdade H_o, na qual os genótipos apresentaram comportamentos iguais (suscetíveis) e a hipótese alternativa H_1, na qual os genótipos apresentam comportamentos diferentes.

O valor de χ^2 foi calculado pela fórmula:

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^{j} (O_{li}^2) / ni - (\sum O_l)^2/N}{\bar{p} \cdot \bar{q}}$$

Sendo:

O_{li}: freqüência observada na coluna l da linha i

Ni: total da linha i

$\bar{p} = \sum O_i / N$

$\bar{q} = 1 - \bar{p}$

Os graus de liberdade foram calculados segundo a fórmula:

Gl = números de linhas da tabela - 1

Tabela 4 Dados climáticos de temperatura e luminosidade, médias obtidas nos meses da avaliação dos experimentos, no ano de 2004.

Experimentos	I	II	III
Meses	Fevereiro	Abril	Dezembro
Temperaturas médias	Max 30 ^{o}C e Min 26 ^{o}C	Max 28 ^{o}C e Min 20 ^{o}C	Max 34 ^{o}C e Min 24 ^{o}C
Luminosidade	13 horas	10 horas	15 horas

3.8 Teste sorológico PTA-ELISA ("*Plate Trapped Antigen* - Enzyme Linked-Immunosorbent Assay")

Os vírus presentes nas amostras de alface, coletadas em Atibaia, SP, foram identificadas sorologicamente, em PTA-ELISA (MOWART E EDAWSON, 1987) utilizando antissoros policlonais contra o LMV. Para a confirmação da presença do vírus em folhas apicais não inoculadas, de plantas de alface sem sintoma, pertencentes aos genótipos, inoculados com o isolado 'Karla H25', utilizou-se o antissoro policlonal contra o LMV em PTA-ELISA. Para tanto folhas de alface foram trituradas em tampão fosfato de sódio acrescido de Tweem e polivinilpirrolidona (PBS-TPo) na proporção 1:10 (g/ml) e o extrato

foliar foi diluído em tampão carbonato de cálcio pH 9,6, na proporção 1:1 (ml/ml). Foram utilizados como controle negativo, folhas de alface sadia e como controle positivo, folhas de alface infectadas com o vírus. Foram aplicados 100 µl de cada amostra nos poços das placas de poliestireno, com duas repetições, empregando-se o procedimento descrito por Clarck e Adams (1977).

Na última etapa foi empregado como o substrato da fosfatase alcalina, P-nitrofenil fosfato diluído em tampão substrato, dietanolamina pH 9,8, na proporção de 1:1 (mg/ml) aplicando-se 100 µl em cada poço da placa. As leituras foram realizadas em um leitor de ELISA Microplate Reader 3550-UV (Bio-Rad) a A_{405}nm.

Os resultados foram avaliados, dividindo-se o valor médio da absorbância obtida na leitura de cada amostra infectada (I), pelo valor médio obtido da leitura das amostras sadias (S). Os valores de I/S iguais ou superiores a três foram considerados positivos (COLARICCIO *et al*., 2002).

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação do vírus nos isolados de alface

O resultado do PTA-ELISA para as amostras estudadas foi positivo somente para o antissoro do LMV, possibilitando a identificação desta espécie de vírus como agente causal dos sintomas em alface nos cultivares 'Karla' (lisa), 'Hortência' (crespa) e 'Raider' (americana). As amostras não reagiram com os demais antissoros, resultado que indica a ausência de infecções mistas nas amostras avaliadas.

O resultado da inoculação mecânica das amostras de alface 'Raider', 'Hortência' e 'Karla' em plantas indicadoras, possibilitou confirmar a identificação do agente causal dos sintomas de mosaico e necrose no cultivo comercial de alface, como sendo o LMV, pois como relacionado na Tabela 5, as plantas de *C. amaranticolor, C. quinoa* e *C. murale* reagiram com sintomas de lesões locais cloróticas, que evoluíram para necróticas e se manifestaram sistemicamente nas folhas apicais, não inoculadas. Em plantas de *C. amaranticolor* foram observados os sintomas de lesões cloróticas sistêmicas. Plantas de alface 'White Boston' reagiram com sintomas de mosaico sistêmico, distorção foliar, redução do tamanho das folhas e da planta, características do LMV (Figura 7). As demais hospedeiras testadas, *Datura stramonium; Nicotiana bhentamiana; N. debneyi; N. glutinosa; N. tabacum* 'Samsun'; *N. tabacum* 'White Burley' e *Petunia hybrida* não manifestaram sintomas (Tabela 5). O

resultado negativo destas hospedeiras indicou que, as amostras não estavam infectadas por nenhuma das espécies de vírus do complexo do vira-cabeça, um dos principais problemas na cultura da alface, além do LMV. Algumas espécies de hospedeiras têm sido utilizadas como indicadoras para a presença de LMV, por apresentarem sintomas característicos de lesão local e sistêmica, como as espécies *C. quinoa* e *C. amaranticolor*, sintomas sistêmicos como *Nicotiana benthamiana* e sintoma local como *Gomphrena globosa* (ZERBINI *et al.*, 1995).

Na Tabela 6 estão relacionados os comportamentos das hospedeiras diferenciadoras quando inoculadas com LMV isolado de alface 'Raider', 'Hortência' e 'Karla H25'. Todas as hospedeiras diferenciadoras reagiram com sintomas sistêmicos de mosaico, distorção do limbo foliar e nanismo (Figura 8) ao LMV, isolado de 'Raider', 'Karla H25' e 'Hortência'. Esse resultado indica a presença do LMV patotipo IV nessas amostras, conforme reação descrita na literatura, em hospedeiras diferenciadoras (PINK *et al*, 1992b).

Tabela 5 Círculo parcial de hospedeiras e tipo de sintomas induzidos pelos três isolados de vírus de alface.

Plantas indicadoras	Isolados de LMV em alface		
	'Karla H25'	'Hortência'	'Raider'
Chenopodium amaranticolor	LLN; LSN[1]	LLN; LSN	LLN; LSN
Chenopodium quinoa	LLC; LSC	LLC; LSC	LLC; LSC
Chenopodium.murale	LLC; LSC	LLC; LSC	LLC; LSC
Datura stramonium	AS	AS	AS
Lactuca sativa 'White Boston'	MS; NA	MS; NA	MS; NA
Nicotiana bhentamiana	MS	MS	MS
Nicotiana debneyi	AS	AS	AS
Nicotiana glutinosa	AS	AS	AS
Nicotiana tabacum 'Samsun'	AS	AS	AS
Nicotiana tabacum 'White Burley'	AS	AS	AS
Petunia hybrida	AS	AS	AS

[1]AS: Ausência de sintomas; MS: Mosaico Sistêmico; LLN: Lesão Local Necrótica; LLC: Lesão Local Clorótica ; LSN: Lesão Sistêmica Necrótica ; LSC: Lesão Sistêmica Clorótica ; NA: Nanismo

Tabela 6 Reação das hospedeiras diferenciadoras utilizadas para a identificação do patotipo do LMV presente nos isolados de alface ‘Raider’, ‘Karla H25’ e ‘Hortência’.

Cultivares diferenciadores	Isolados de LMV de alface					
	‘Raider’	REC	‘Karla H25’	REC	‘Hortência’	REC
‘White Boston’	+[1]	+	+	+	+	+
‘Ithaca’	+	+	+	+	+	+
‘Malika’	+	+	+	+	+	+
‘Calona’	+	+	+	+	+	+
‘Salinas 88’	+	+	+	+	+	+
‘Vanguard 75’	+	+	+	+	+	+

[1] + - presença de sintoma; REC: Recuperação em *Chenopodium quinoa*

4.2 Reação dos genótipos de alface ao LMV patotipo IV isolado ‘Karla H25’.

Na tabela 7 encontram-se os resultados da reação dos genótipos inoculados com o LMV patotipo IV isolado ‘Karla H25’. Pela avaliação realizada, os sintomas observados foram semelhantes àqueles descritos para o LMV em alface por STANGARLIN (1995) e PINK *et al.* (1992b).

Tabela 7 Principais sintomas induzidos pelo LMV nos genótipos avaliados para a resistência.

Lactuca sativa	Experimento – Sintomas		
	I – fevereiro 2004	II – abril 2004	III – dezembro 2004
Linhagem 602-3	SS[1]	SS	Na
Linhagem 602-4	SS	SS	SS
Linhagem 602-5	ALF, Mo, E	MoB	DLF, Mo
Linhagem 602-22	MoB	MoB	DLF, Mo
Linhagem 602-23	MoB	SS	Mo
Linhagem 602-33	SS	SS	DLF, Mo
Linhagem 602-35	E, Mo, Na	E, Mo, Na	E, Mo, Na
Linhagem 602-44	E, Mo, Na	SS	DLF, Mo, Na
Linhagem 602-50	E, Mo, Na	E, Mo, Na	DLF, Mo, Na
Linhagem 602-53	DLF	DLF, MoB	DLF
Linhagem 602-54	DLF, Mo	SS	DLF, Mo
Linhagem 602-71	SS	Mo	DLF, Mo
Linhagem 602-78	E, Mo, Na	Mo, Na	DLF, Mo, Na
Linhagem 602-82	DLF	DLF	DLF, Mo
Linhagem 602-89	DLF, SS	DLF	DLF, Mo
Linhagem 602-108	DLF	DLF	DLF, Mo
Linhagem 602-109	DLF, E, Mo	DLF, E, Mo	DLF, E, Mo
Linhagem 602-110	DLF, Mo	SS	DLF, Mo
Cultivar 'Brasil 221'	SS	SS	NR
Cultivar 'Rubete'	MoB	NR	MoB
Cultivar 'Kazan'	MoB	NR	MoB
Cultivar 'Gizele'	MoB	NR	MoB
Cultivar 'Hortência'	E, Mo, Na	NR	Mo, Na
Cultivar 'White Boston'	E, Mo, Na	E, Mo, Na.	E, Mo, Na.

[1]ALF - Afilamento do Limbo Foliar; DLF - Distorção do Limbo Foliar; E – Esbranquiçamento; Mo - Mosaico; Na - Nanismo; MoB – Mosaico brando; SS – Sem Sintoma; NR – Não Realizado

Tabela 8 Comportamento dos genótipos de alface ao LMV patotitpo IV isolado 'Karla H25'.

Lactuca sativa		Experimento I					Experimento II					Experiemnto III					Total das
		NP[1]	**CS**	**SS**	**ELISA**	**Rec**	**NP**	**CS**	**SS**	**ELISA**	**Rec**	**NP**	**CS**	**SS**	**ELISA**	**Rec**	plantas avaliadas
Linhagem	602-3	4	0	4	+	+	6	0	6	+	+	7	1	6	+	+	17
Linhagem	602-4	3	0	3	+	+	6	0	6	+	+	8	0	8	+	+	17
Linhagem	602-5	6	4	2	+	+	6	4	2	-	-	8	8	0	NR	NR	20
Linhagem	602-22	6	5	1	+	+	6	2	4	-	-	8	5	3	+	+	20
Linhagem	602-23	6	2	4	-	-	6	0	6	+	+	8	5	3	+	+	20
Linhagem	602-33	5	1	4	+	+	6	2	4	+	+	8	6	2	+	+	19
Linhagem	602-35	6	6	0	NR	NR	6	5	1	-	-	8	7	1	+	+	20
Linhagem	602-44	6	4	2	+	+	6	0	6	+	+	8	5	3	+	+	20
Linhagem	602-50	3	2	1	+	+	6	3	3	+	+	8	5	3	+	+	17
Linhagem	602-53	4	1	3	+	+	6	2	4	+	+	8	7	1	+	+	18
Linhagem	602-54	6	2	4	-	-	6	0	6	+	+	8	5	3	+	+	20
Linhagem	602-71	6	4	2	+	+	6	3	3	-	-	8	7	1	+	+	20
Linhagem	602-78	6	5	1	+	+	6	2	4	+	+	8	7	1	+	+	20
Linhagem	602-82	3	2	1	+	+	6	3	3	-	-	8	5	3	+	+	17
Linhagem	602-89	6	5	1	+	+	6	2	4	-	-	8	8	0	NR	NR	20
Linhagem	602-108	6	4	2	+	+	6	2	4	-	-	8	6	2	+	+	20
Linhagem	602-109	6	4	2	+	+	6	2	4	-	-	8	8	0	NR	NR	20
Linhagem	602-110	6	4	2	-	-	6	0	6	+	+	8	7	1	-	-	20
Cultivar	'Brasil 221'	4	1	3	+	+	6	0	6	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	10
Cultivar	'Rubete'	6	6	0	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	8	8	0	NR	NR	14
Cultivar	'Kazan'	5	4	1	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	8	8	0	NR	NR	13
Cultivar	'Gizele'	5	5	0	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	8	8	0	NR	NR	13
Cultivar	'Hortência'	6	5	1	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	8	1	7	+	+	14
Cultivar	'White Boston'	6	6	0	NR	NR	6	6	0	NR	NR	8	8	0	NR	NR	20

[1]NP: número de plantas avaliadas ; CS: com sintoma; SS: sem sintoma; ELISA: + positivo, - negativo ; Rec.: Recuperação em *Chenopodium quinoa*, + positivo, - negativo; NR: não realizado.

χ^2 para linhagens = 61,45** ; χ^2 para cultivares =42,16**; χ^2 para genótipos= 105,61**

Figura 7. Alface ‘White Boston’, planta com sintomas de nanismo x planta sadia.

Figura 8. Alface ‘Salinas 88’, folha sadia x folha com distorção do limbo foliar

Os sintomas observados nas plantas avaliadas, durante os três experimentos realizados, foram ligeiramente diferentes. Este fato pode ter ocorrido devido aos experimentos terem sido conduzidos em diferentes épocas do ano, em casa de vegetação sem controle de temperatura e de luminosidade, embora não tenham sido registradas alterações significativas nas condições ambientais, nos três períodos em que foram realizados os experimentos (Tabela 4). A manifestação dos sintomas do LMV pode ser alterada de acordo com os fatores ambientais, como temperatura e luminosidade (RYDER, 1979). Em temperaturas elevadas, o número de plantas sem sintomas é maior (RYDER, 1979).

No experimento II o número de plantas assintomáticas foi maior quando comparado com os experimentos I e III realizados em outras épocas do ano. Segundo RYDER (1979), isto pode ser atribuído à interação entre temperatura e luminosidade, pois ele observou, nos Estados Unidos, que a porcentagem de plantas com sintomas foi menor no período de primavera – verão, quando havia mais horas diárias de temperaturas acima de 23 ^{o}C e mais horas de luz comparado com o período de outono-inverno, o inverso do que ocorreu nestes experimentos no Brasil.

Os resultados obtidos indicaram que o LMV pode multiplicar-se nas plantas de alface sem manifestar sintomas, como foi observado em alguns genótipos que apresentaram comportamento de tolerância ao vírus, porém estas plantas poderão manifestar sintomas do vírus, sob condições favoráveis. O maior número de plantas com sintomas em alguns genótipos, pode ter ocorrido devido a alterações fisiológicas provocadas pela mudança das condições ambientais ou pelo estádio de desenvolvimento da planta (COLARICCIO, 1996).

Pelo teste do χ^2 a 1% de significância para o grupo dos genótipos estudados, foram consideradas significativas as diferenças estatísticas, descartando a hipótese de que os genótipos são iguais , ou seja , suscetíveis ao LMV (Tabela 8). O mesmo resultado foi observado paras cultivares comerciais (Tabela 8). Tendo sido possível identificar genótipos com tolerância ao LMV patotipo IV 'Karla H25' entre as diferentes linhagens avaliadas.

Pela classificação do comportamento das plantas à presença dos vírus, conforme MATTHEWS (2002), as linhagens 602-3 e 602-4 foram consideradas tolerantes ao patotipo IV, uma vez que as plantas não apresentavam sintomas, mas a presença do vírus foi detectada por ELISA e por testes de retro-inoculação em *C. amaranticolor*.

A identificação de uma planta dentro da linhagem 602-3 com comportamento susceptível, observado no experimento III (Tabela 8), pode ser devido à contaminação genética. As sementes utilizadas para a avaliação foram obtidas em campo aberto, onde estavam sendo cultivadas 120 linhagens diferentes, em pequenas parcelas de um metro quadrado (doze plantas) circundadas por linhagens irmãs, ou seja, mesmo a alface sendo autógama pode ocorrer até 6,3% de polinização cruzada (VIGGIANO, 1990). Ou à contaminação mecânica durante o processo de beneficiamento das sementes das 120 linhagens (AZEVEDO FILHO, J. A. Comunicação pessoal: Pesquisador da ***apta*** Leste Paulista).

Os genótipos com ausência de sintomas submetidos a retroinoculação, das quais o vírus não foi recuperado seriam considerados imunes. Como não há infecção, também não há replicação do vírus nas células hospedeiras, portanto não há o estabelecimento de doença. Isto também pode ser atribuído à baixa concentração viral (Tabela 8). Como nenhum genótipo

apresentou esse comportamento nos três experimentos, não foi identificado gene para reação de imunidade entre os materiais avaliados.

Dentre os sintomas causados pelo LMV, o mais severo é a deformação do limbo foliar e nanismo, o que foi observado em diversas linhagens, na cultivar ‘White Boston’ e alfaces diferenciadores. Os cultivares ‘Brasil 221’, ‘Rubete’, ‘Kazan’ e ‘Gisele’ que apresentam gene de resistência ao patotipo II (Tabela 2) apresentaram sintomas de mosaico suave (Tabela 7).

5.0 CONCLUSÃO

As alfaces com sintomas de mosaico coletada em produtores da região de Atibaia foram identificada como sendo o LMV, patotipo IV.

As linhagens 602-3 e 602-4 apresentaram comportamento de tolerância, conforme o critério de classificação adotado.

Os genótipos com genes de resistência ao patotipo II (‘Brasil 221’, ‘Kazan’, ‘Rubete’, e ‘Gisele’) reagiram com sintomas de mosaico brando ao LMV patotipo IV isolado ‘Karla H25’, representando uma alternativa ao cultivo comercial de alface em nosso Estado.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCSEM – **Associação Brasileira de Sementes e Mudas**, www.abcsem.com.br, acesso em 2001 e 2003.

AGRISTAR – Catálogo de Produtos www.agristar.com.br acessado em 2003.

ANUÁRIO ESTATISTICO. **Serie Informativo Estatístico Agrícola**., SP, v.11, n.1, p.1236, 2000.

AZEVEDO FILHO, J. A.; NAGAI, H.; MELO, A .M. T.; YUKI, V.A . Melhoramento de alface tipo manteiga visando resistência ao tospovírus do vira – cabeça In: **38º Congresso Brasileiro de Olericultura**, Petrolina – PE, 26-31 de julho de 1998.

BANNEROT, H., BOULIDARD, L.; MARROU, J.; DUTEIL,M. Etude de l´hérédité de la tólerance au virus de la mosaique de la laitue chez la variété Gallega de invierno . **Annales de Phytopathologie**, v.1, p. 219 – 226, 1969.

BARRADAS, M. M. Organização de uma coleção de vírus fitopatogênicos em tecido desidratado com cloreto de cálcio. **Biológico,** v. 44 p. 221-230, 1978.

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. **The European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v.100, n.6, p. 293-314, 1994.

BRASE, M. L. e RAGAZZINO, A. *Nasonovia ribis-nigri* a virus vector of lettuce in Campania. **Informatore Fitopatologico**. V.17, n. 17, p. 3-5, 1977.

BRUNT, A; GRABTREE, K.; GIBBS, A. **Viruses of tropical Plants**. Redwood Press LTDA, 707p. 1990.

CLARK, M.F. e ADAMS, A N. Characterization of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses**. Journal of General Virology**, Great Britain, v.34, p.475-483, 1977.

COSTA, C.P. e SALA, F.C. A evolução da alfacicultura brasileira. **Horticultura brasileira**. V.23, N.1, Jan-Mar, 2005 (no prelo).

CHUNG, R.M.; AZEVEDO, F.J. A. e COLARICCIO, A. Reação de genótipos de alface ao vírus do mosaico da alface patotipo IV. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Gramado, 2004.

COSSA, A.C.; COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; CHAVES, A.L.R.; Partial characterization of Lettuce mosaic virus (LMV). Pathotype III in hydroponic lettuce. **Virus Reviews & Research**, v. 5, n. 2, p.195, 2000.

COSTA,C.L. Vetores de vírus de plantas – 1. insetos. In: LUZ,W.E. **Revisão Anual de patologia de plantas**, v.6, p. 103-171, 1998.

COLARICCIO, A. Identificação do vírus Y da batata, estirpe comum (PVY^0), em *Solanum palinacanthum* Dun. São Paulo, 1996. 112 p. **Dissertação** (Doutorado em Ciências na área de Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

DAVIS,R.M.; SUBBARAO, K.; RAID,R.N.; KURTZ,E.A. **Compendium of lettuce diseases**. The American Phytopathological Society, 79p, 1997.

DINANT, S., e LOT, H. Lettuce mosaic virus: A review. **Plant Pathology**, v. 41, p. 529-542, 1992.

EDWARDSON, J. R. e CHRISTIE, R.G. **The potyvirus group**. IV Fla. Agric. Exp. Stn. Monogr. 16 Ser., Vol. 1, 1991.

FERRERES, A. BLUA, M.J. e PERRING, T.M. Retention and transmission characterists of zucchini yellow mosaic virus by *Aphis gossypii* and *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae).**J. Econ. Entomol**., v. 85, p.759-765, 1992.

GROGAN, R.G. Control of lettuce mosaic with virus-free seed**. Plant disease**, v.64 p. 446-449, 1980.

KRAMER, M.; ORLANDO,A. SILBERSCHMIDT, K.M. Estudos sobre uma grave doença responsável pelo deperecimento de nossas culturas de alface**. O Biológico**, São Paulo, v.11, p.121-134, 1945.

KRAUSE, S. R.; MELLO, R.N.; ZAMBOLIM, E.M.; PAVAN, M.A.; CARVALHO, M.G.; LE GALL, O.; ZERBINI, F.M. Molecular characterization of two Brazilian isolates of *Lettuce mosaic virus* (LMV) with distinct biological properties. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.153-157, 2001.

KESSELI, R.V., OCHOA, O. and MICHELMORE, R. W. Variation at RFLP loci in *Lactuca spp* and Origin of cultivated lettuce**. Genome** v. 34, p430-436, 1991.

KOOPMAN, W. J. M. and DE JONG, J.H. A numerical analysis of karyotypes and DNA amounts in lettuce cultivars and species (Lactuca subject Lactuca, Compositae). **Acta Bot. Neerl,** v.45, p.211-222, 1996.

HAYES, R.J.; RYDER, E.J. Breeding Lettuce cultivars with high resistance to Lettuce Mosaic Virus. **Lettuce Workshop and Leafy Vegetable International Conference Proceedings**, 2004.

HUNTER, D.G. e BOWYER, J.W. Cytopathology of lettuce mosaic virus infected lettuce seeds and seedlings. **Journal of Phytopathology**, v, 137 n.1, p.61-72, 1993.

HUNTER, D.G. e BOWYER, J.W. Cytopathology of mature ovaries from lettuce plants infected by lettuce mosaic potyvirus. **Journal of Phytopathology**, v. 140, n.1, p. 11-18, 1994.

IBGE. http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp, acesso em Janeiro de 2005.

IEA . http://www.iea.sp.gov.br/out/ibcoiea.php, acesso em 2004.

JADÃO, A. S.; PAVAN, M.A.; KRAUSE, R.S.; ZERBINI, M.F. Efeitos na fotossíntese e Área foliar de cultivares de alface inoculadas mecanicamente com patótipos do Lettuce mosaic vírus e Lettuce mottle vírus. **Fitopatologia brasileira**. V.29, n.1, 2004.

LINDQUIST, K. On the origin of cultivated lettuce. **Hereditas**, Lund, v. 46, p. 319-350, 1960a.

LINDQUIST, K. Cytogenetics studies in the Serriola groups of Lactuca. **Hereditas**, Lund, v 46, p. 75 – 151, 1960b.

MAISONNEUVE,B.; BELLEC,Y.; SOUCHE,S.; LOT,H. Une nouvelle resistance au virus de la mosaique de la litue (LMV) identifiee chez *Lactuca virosa*. **6th Rencontres de Virologie Vegetable**, Aussois (França), 9-13 de marco, 1997.

MATTHEWS, R.E.F. **Plant Virology.** San Diego – California. Academic Press, 835 p. 2002.

MATTHEWS, R.E.F. Classification and nomenclature of viruses. Virus Taxonomy 3th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Intervirol.,** v. 12, p.129, 1979.

MORCILLO,A.M. Teste do qui-quadrado (χ^2)
www.fcm.unicamp.br/centros/ciped/mp639/teste%20Qui_quadrado.pdf, acesso em 2003.

MOWART, W. P. e DAWSON,S. Detection and identification of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractioned antisera. **Journal of virological methods** v.15, p.233-247, 1987.

MURPHY, F. A.; FAUQUET,C.M.; BISHOP,D.H.L.; GHABRIAL, S.A; JARVIS, A.W.; MARTELLI,G.P.; MAYO,M.A. ; SUMMERS,M.D**. Virus Taxonomy**. Sixt Report of the International Committe on Taxonomy of virus. Springer – Verlag Austria, 1995, 586p.

NAGAI, H. Obtenção de novos cultivares de alface *(Lactuca sativa* L.) resistentes ao mosaico e ao calor. I-Brasil 48, 202 e 221. **Revista de Olericultura**, v.17, p.129-137, 1979.

NAGAI, H. Alface tipo Manteiga In: FURLANI, A.M.C.; VIÉGAS, G.P. (Eds.) **O melhoramento de plantas no Instituto Agronômico -** Campinas: Instituto Agronômico, 1993. p.204-221.

NAGAI, H.; COSTA, A. S. Incorporação de resistência ao vírus de mosaico em alface do tipo manteiga. **Arquivos do Instituto Biológico**. V.38., n.3, p95-98, 1971.

OLIVEIRA, F. A.; FIGUEIRA, A.R. Estudos de isolados do vírus do mosaico da alface. **Fitopatologia Brasileira**, v.23 (suplemento), p. 321,1998.

OLIVEIRA, F. A. de. Identificação e Caracterização de um isolado do vírus do mosaico da alface (*Lettuce mosaic vírus*-LMV). Lavras-MG, 1999. 63 p. **Dissertação** (Mestrado em Fitopatologia), Universidade Federal de Lavras.

PAVAN, M.A e Kurozawa C.L.. Doenças da Alface. **Manual de Fitopatologia**, vol2 3ª edição, São Paulo: Ed. Ceres, 1997, 774 p.

PINK, D. A. C.; KOSTAVA, D.; WALKEY, D.G.A. Differentation of pathotypes of lettuce mosaic virus. **Plant Pathology**, 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.169-174. 1992b.

RYDER, E. J. Transmission of common lettuce mosaic virus through the gametes of lettuce plants. **Plant Disease Reporter**, v.48, p522-523, 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. **American Society for Horticultural Sciences Journal**, v .95, p. 378-9, 1970.

RYDER, E.J. Seed transmission of lettuce mosaic virus in mosaic resistant lettuce. **American Society for Horticultural Sciences Journal**, v. 98, p. 610-614, 1973.

RYDER, E. J. **Leafy Salad Vegetables** Ed. AVI Publishing Company, INC Westport, Connecticut, 1979, 266p.

RYDER, E.J. Lettuce Breeding. **Breeding Vegetable Crops**, AVI Publishing Company, INC. Westport, Connecticut, 583 p, 1986.

RYDER, E.J. Inheritance and interactions of necrotic, mottles and resistance reactions to lettuce mosaic virus in lettuce**. American Society for Horticultural Sciences Journal**, v. 27, n.2, p. 279-283, 2002.

RYDER, E.J. e WHITAKER, T.W. **Lettuce In Evolution of Crop Plants** Ed. Simmonds NW, 1976.

REVERS, F.; LOT, H; SOUCHE, S.; LEGALL, O; CANDRESSE, T.; DUNEZ, J. Biological and molecular variability of lettuce mosaic virus isolates. **Phytopathology,** v.83, p.397-403,1997a.

REVERS, F.; YANG, S.; WALTER, J.; SOUCHE, S.; LEGALL, O; CANDRESSE, T.; DUNEZ, J. Comparison of the complete nucleotide sequences of two isolates of lettuce mosaic virus differing in their biological properties. **Virus Research v.**47, p167-177,1997b.

RIJK ZWAAN – Catálogo de produtos www.**rijkzwaan**.nl, acesso em 2003.

SAKATE, R.K.; MELLO, R.N.; PAVAN, M. A.; ZAMBOLIN, E. M.; CARVALHO, M.G.; LE GALL, O.; ZERBINI, M.F. Molecular characterization of two Brazilian isolates of Lettuce mosaic virus with distinct biological properties. **Fitopatologia Brasileira** v.26, 2, 2001.

SHUKLA, D.D.; WARD, C.W.; BRUNT, A.A. The *Potyviridade*. Cambrigde, University Press, 500p., 2000.

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 Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

STANGARLIN, O.; PAVAN, M.A.; DA SILVA, N. Occurrence of a new pathotype of lettuce mosaic virus on lettuce in Brazil. **Plant Disease**, v. 84 n.4, p 490, 2000.

TOMLINSON, J. A. Lettuce mosaic virus. In: Commonwealth Agricultural Bureaux Association of Applied Biologists. **Descriptions of Plant Viruses**, n. 9. Kew, 1970.

VAN DER PAHLEN, A. e CRNKO, J. El virus del mosaico de la lechuga (Marmor lactucae Holmes) en Mendonza y Buenos Aires. **Revista de Investigaciones Agropecuarias** v.11, p.25-31, 1965.

VAN REGENMORTEL, M.V.H.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS,E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. **Virus Taxonomy**. Academic Press. San Diego-California. p.162, 2000.

VIGGIANO, J. Produção de sementes de alface (coord.). **Produção de sementes de hortaliças**, Jaboticabal, FCAV/FUNEP, 261p., 1990.

ZERBINI, F.M.; KOIKE, S.T.; GILBERTSON, R.L. Biological and molecular characterization of lettuce mosaic potyvirus isolates from the Salinas Valley of California. P**hytopathology**, V.85 n.7, p.746-752, 1995.

ZERBINI, F.M. Doenças causadas por vírus em alcachofra, alface, chicória, morango e quiabo. **Informe Agropecuário**, v.17, n.182, p.23-24 1995.

ZERBINI JR., F. M. The emergence of a new viral strain under conditions of high selective pressure: Lettuce mosaic (A case study). **Virus Reviews & Research**, v.2, n.2, p.131-132, 1997.

ZATARIN, M. Comportamento de progênies de alface (*Lactuca sativa* L.) em diferentes épocas de plantio Piracicaba, 1985. 90 p. **Dissertação** (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.