

PROPRIEDADES BIOLÓGICAS, FÍSICO-QUÍMICAS E IMUNOLÓGICAS DO VÍRUS DO MOSQUEADO DA ALFACE, UM POSSÍVEL *SEQUIVIRIDAE*

A.L.R. Chaves^{1*}, M.A. Pavan², A. Colariccio¹, N. da Silva²

¹Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: chaves@biológico.sp.gov.br

RESUMO

Um vírus causando sintomas de mosqueado em alface (*Lactuca sativa*) 'Verônica' foi identificado por meio de estudos biológicos, físico-químicos, sorológicos e microscopia eletrônica. Todos os métodos de purificação testados produziram um baixo rendimento, fato confirmado através do baixo número de partículas isométricas observadas ao microscópio eletrônico e do número reduzido de lesões locais em *Chenopodium quinoa*. O círculo de hospedeiras foi restrito a poucas espécies pertencentes às famílias botânicas Asteraceae, Chenopodiaceae e Solanaceae e a maioria das cultivares de alface comerciais testadas foram suscetíveis quando inoculadas mecanicamente. *Helichrysum bracteatum*, planta da vegetação espontânea, mostrou ser hospedeira diferencial, pois foi suscetível a este vírus e não ao *Lettuce mosaic virus* - LMV (*Potyvirus*). Através de ELISA-PTA constatou-se relacionamento com o *Dandelion yellow mosaic virus* - DaYMV (*Sequivirus*).

PALAVRAS-CHAVE: Hospedeira diferencial, *Lactuca sativa*, Lettuce mottle virus (LeMoV), *Sequivirus*.

ABSTRACT

BIOLOGICAL, PHYSICAL-CHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL PROPERTIES EXHIBITED BY THE LETTUCE MOTTLE VIRUS, A POSSIBLE *SEQUIVIRIDAE*. Plants of lettuce (*Lactuca sativa*) cv 'Verônica' showing mottle symptoms were submitted to biological, serological and physico-chemical tests and to electron microscopy observations to determine a possible association of a virus to that symptomatology. All the purification methods yielded virus isolates in low concentration, as observed by the low number of isometric particles in electron microscopy exam and in accordance to local lesion assay on *Chenopodium quinoa*. The host range was restricted to a few species of Asteraceae, Chenopodiaceae and Solanaceae, and most commercial lettuce cultivars developed mottle when mechanically inoculated with the virus. *Helichrysum bracteatum*, a spontaneous Asteraceae, was found to be as a potential differential host since it is susceptible to this virus and not to *Lettuce mosaic virus* (*Potyvirus*). A serological relationship with the *Dandelion yellow mosaic virus* (*Sequivirus*) was demonstrated by PTA-ELISA.

KEY WORDS: Differential host, *Lactuca sativa*, Lettuce mottle virus (LeMoV), *Sequivirus*.

INTRODUÇÃO

O Estado de São Paulo é um dos principais produtores de alface do Brasil apresentando uma área cultivada de aproximadamente 8.337 hectares totalizando uma produção anual de 7.074.000 engradados que acondicionam 9 duzias de alface cada (INFORMAÇÕES ESTATÍSTICAS DA AGRICULTURA, 2000).

Entre os grandes problemas fitossanitários da cultura de alface merecem destaque as doenças causadas por vírus que podem causar quebra de produção de até 100%, tornando o controle preventivo,

prática indispensável (RESENDE & CUPERTINO, 1995). Mundialmente, inúmeras viroses já foram descritas ocorrendo naturalmente em plantas de alface, sendo estas causadas pelos vírus pertencentes aos gêneros *Closterovirus*, *Comovirus*, *Cucumovirus*, *Fabavirus*, *Ilarvirus*, *Luteovirus*, *Nepovirus*, *Potyvirus*, *Rhabdovirus*, *Sequivirus*, *Tobravirus*, *Tospovirus*, *Umbravirus* e *Varicosavirus* (DAVIS *et al.*, 1997).

Os vírus descritos em alface, em nossas condições, pertencem principalmente ao gênero *Potyvirus*, podendo ser citados o *Lettuce mosaic virus* (LMV), *Bidens mosaic virus* (BiMV) e o *Bidens mottle virus*

²UNESP, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Departamento de Defesa Fitossanitária, Botucatu, SP, Brasil.

*Bolsista do CNPq/Mestrado

(BiMoV). As espécies *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Lettuce necrotic yellow virus* (LNYV), pertencentes respectivamente aos gêneros *Cucumovirus* e *Cytorhabdovirus*, além de diferentes espécies de *Tospovirus* e do *Lettuce mottle virus* (LeMoV), sem família e gênero definidos também já fora relatados (KITAJIMA, 1986; KITAJIMA, 1992).

Quanto a importância dos vírus isométricos descritos em alface deve-se destacar o registro do CMV (*Cucumovirus*) cuja ocorrência, atualmente, é inexistente devido ao abandono da prática de cultivos de alface intercalados com áreas destinadas a produção de flores variadas que também são hospedeiras desse vírus (COSTA, 1983).

Amostras de alface apresentando mosqueado e provenientes de diferentes regiões produtoras do Brasil vem sendo descritas nos últimos anos como sendo isolados do LeMoV (MARINHO & KITAJIMA, 1986a,b; STANGARLIN, 1995). Dos isolados de LeMoV relatados, há somente descrições de sua morfologia isométrica e dos sintomas induzidos nas diferentes cultivares de alface, o que permite supor ser este um vírus emergente na cultura da alface cujas informações de suas propriedades biológicas, físico-química e sorológicas ainda são pouco relatadas (RESENDE & CUPERTINO, 1995).

No hemisfério norte, quebras de produção na cultura da alface são registradas devido a ocorrência do *Dandelion yellow mosaic virus* (DaYMV), vírus isométrico pertencente ao gênero *Sequivirus* (DAVIS *et al.*, 1997). Os primeiros relatos do DaYMV foram feitos simultaneamente em diferentes regiões da Grã-Bretanha, em plantas de *Taraxacum officinale* Weber (dente-de-leão) e em plantações comerciais de alface, causando sintomas de mosaico intenso (KASSANIS, 1944). De maneira geral, esse vírus encontra-se bastante disseminado no continente europeu, onde foi relatado principalmente em culturas de alface na Alemanha, Boêmia, Dinamarca, Finlândia, Noruega, República Tcheca e Suécia (Boss *et al.*, 1983).

De acordo com o sistema adotado pelo "International Committee for Virus Taxonomy" (ICTV), apesar dos avanços obtidos com o advento da biologia molecular, a utilização de técnicas clássicas de observação de sintomas, círculo de hospedeiras, transmissão, propriedades físicas *in vitro*, morfologia, efeitos citopáticos e sorologia ainda são de fundamental importância para a correta nomenclatura e taxonomia dos vírus (KITAJIMA *et al.*, 1997). Assim, Os resultados dos testes biológicos, físico-químicos, sorológicos e análises ao microscópio eletrônico, obtidos a partir de um isolado de vírus causador de mosqueado em alface serão, a seguir descritos, visando fornecer subsídios para futuros estudos.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolado viral

O vírus estudado foi isolado a partir de alface 'Verônica' com sintomas de mosqueado sistêmico, proveniente de áreas produtoras do município de Campinas, SP. Sua manutenção foi feita através do armazenamento à -20°C, em tecido foliar desidratado com cloreto de cálcio, e por inoculações mecânicas sucessivas em plantas de *Chenopodium quinoa* Willd.

Transmissão mecânica

Os ensaios de inoculação mecânica partiram da produção de inóculo obtido por meio da maceração de folhas frescas de alface naturalmente infectadas em tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0 + sulfito de sódio 0,01 M, ou de folhas congeladas e trituradas previamente em nitrogênio líquido, com posterior adição do tampão Tris-HCl, pH 8,0 (TACM). O inóculo foi padronizado em todos os testes biológico na proporção 1:5 (g / mL), sendo os mesmos friccionados nas folhas das plantas indicadoras, utilizando como abrasivo Carborundum (600 mesh).

Foram testadas 42 espécies de plantas indicadoras, pertencentes a 11 famílias botânicas e 26 cultivares comerciais de *Lactuca sativa* L. dos tipos americana, crespa e lisa. Plantas da família Asteraceae, pertencentes a vegetação espontânea, foram inoculadas para se determinar uma possível hospedeira diferencial para o vírus estudado e o LMV. Todas as plantas utilizadas foram obtidas a partir de semeadura e mantidas em casa-de-vegetação.

Transmissão por sementes

Lotes de 100 sementes provenientes de plantas de *C. quinoa* e de alface das cultivares Hortênsia, Verônica e Elisa, infectadas experimentalmente por inoculação mecânica, foram semeadas e mantidas em casa-de-vegetação por um período de 45 dias com a finalidade de avaliar a transmissão do vírus por sementes.

Transmissão por vetor

Afídeos das espécies *Aphis gossypii* Glover, *Brevicoryne brassicae* L., *Myzus persicae* Sulz, mantidos em plantas sadias de alface 'Verônica', foram utilizados nos testes de transmissão. Os afídeos foram submetidos a um período de jejum de 2 horas e em seguida submetidos a 10 min, referentes ao período de aquisição, em plantas de alface 'Brisa' experimentalmente infectadas. Após este período, 100 afídeos foram transferidos, em grupos iguais (10 afídeos por planta), para 10 plantas sadias de alface 'Verônica', onde permaneceram para se alimentar

por 2 horas (período de transmissão) sendo os mesmos eliminados manualmente após o experimento.

Todas as plantas utilizadas nos testes de transmissão e que não manifestaram sintomas, foram submetidas a testes de recuperação do vírus por meio da inoculação mecânica em plantas de *C. quinoa* sadias, a fim de verificar a ocorrência de latência do vírus nas diferentes hospedeiras.

Propriedades físicas

Os extratos obtidos a partir de folhas infectadas de *C. quinoa* foram utilizados para determinar as propriedades físicas do vírus. Através da técnica de desidratação em cloreto de cálcio, folhas de *C. quinoa* com sintomas sistêmicos foram armazenadas em congelador, à temperatura de -20° C a fim de se avaliar a longevidade e a infectividade do vírus.

Purificação

Aproximadamente 500 g de folhas de *C. quinoa* mecânicamente inoculadas e apresentando sintoma sistêmico foram utilizadas para a purificação do vírus. Para tanto, empregou-se a metodologia descrita para o LeMoV (MARINHO & KITAJIMA, 1986a). Ao protocolo original realizaram-se algumas alterações como a adição de etilenodiamina tetracetato dissódio (EDTA) e ácido ascórbico ao tampão de extração, bem como 10% de polietilenoglicol (PEG) + 0,1 M de cloreto de sódio (NaCl) ao volume final do sobrenadante proveniente do processo de clarificação com butanol e clorofórmio que foi homogeneizado por uma hora a 4° C e centrifugado a 10.000 g a 4° C.

O vírus parcialmente purificado foi submetido a gradiente linear de sacarose ou de sulfato de cézio, preparados em tampão fosfato 0,02 M pH 7,0. O gradiente de sacarosa contendo a preparação de vírus parcialmente purificado foi submetido a uma ultracentrifugação de 20.500g durante 3 horas a 4° C. Quando se utilizou gradiente de sulfato de cézio a ultracentrifugação foi de 70.000 g por 3 horas a 4° C. Todas as fases do processo de purificação, para a observação de partículas virais, foram monitoradas através da inoculação em *C. quinoa* e também análises ao microscópio eletrônico, através da técnica de contrastação negativa. A partir do espectro de absorção na região de luz ultravioleta da preparação semi-purificada foi determinada a concentração do vírus, utilizando-se para tanto, valor de coeficiente de extinção igual a 7 (MATTHEWS, 1992).

Produção de anti-soros

Para a produção de anti-soros, galinhas poedeiras com seis meses de idade foram imuniza-

das na região superior do peito, com a aplicação de três injeções subepidérmicas, em intervalos de uma semana, com preparação do vírus semi-purificada e emulsificada em igual volume de adjuvante de Freund. A partir da primeira aplicação, os ovos foram coletados diariamente para a extração dos anticorpos das gemas.

Os anti-soros foram obtidos utilizando-se a metodologia da precipitação com polietilenoglicol - PEG (POLSON & VON WECHMAR, 1980), sendo a sua titulação feita pelo teste de microprecipitina (ALMEIDA & LIMA, 2001).

Testes de dupla difusão em ágar e ELISA-PTA (CONVERSE & MARTIN, 1990) foram realizados com os anti-soros extraídos dos ovos coletados no quinto e sétimo dia após cada imunização. Para tanto, foram previamente adsorvidos em extrato de plantas de *C. quinoa* sadias e incubados por duas horas a 37° C.

Identificação sorológica

De acordo com a disponibilidade do anti-soro, a identificação sorológica do isolado foi realizada por PTA-ELISA (*Plate Trapped Antigen*) e /ou DAS-ELISA (*Double antibody sandwich*) (CONVERSE & MARTIN, 1990), utilizando antissoros contra o *Arabis mosaic virus* - ArMV (*Nepovirus*), *Cowpea severe mosaic virus* - CPSMV (*Comovirus*), CMV (subgrupo I e II), *Eggplant mosaic virus* - EMV (*Tymovirus*), *Tobacco ringspot virus* - TRSV (*Nepovirus*), provenientes da soroteca do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia do Instituto Biológico; *Potato leafroll virus* - PLRV (*Luteovirus*) cedido pelo Dr. José A.C. de Souza-Dias do Centro de Fitopatologia do Instituto Agronomico de Campinas; e o DaYMV fornecido pelo Dr. L. Boss.

As leituras de absorbância ($A_{405\text{ nm}}$) foram feitas 30 e 45 min após a aplicação do substrato (*p*-nitrofenilfosfato), utilizando-se o aparelho *Microplate reader* 3550-UV (Bio-Rad). As análises foram feitas a partir da relação da média das leituras (triplicata) das amostras infectadas, sobre a leitura das amostras sadias (I / S). Foram consideradas positivas, as amostras com leitura 3 vezes superior à média dos controles negativos.

Microscopia eletrônica de transmissão

Para o estudo das alterações ultraestruturais em secções ultrafinas, foram utilizados fragmentos de folhas de *C. quinoa* e *Nicotiana benthamiana* infectadas experimentalmente com o vírus estudado, os quais foram processados e observadas ao microscópio eletrônico de acordo com metodologia descrita por MARTELLI & RUSSO (1984).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nas características de baixa estabilidade e imumogenicidade confirmadas nos testes físico-químicos e nos processos de purificação e obtenção de antissoros, bem como pela baixa concentração em plantas hospedeiras e morfologia isométrica observados respectivamente em testes biológicos e em análises ao microscópio eletrônico, foi possível concluir que o vírus isolado de alface 'Verônica' proveniente do município de Campinas tratava de um isolado do LeMoV.

O vírus foi transmitido mecanicamente quando se utilizou principalmente nitrogênio líquido para pulverização das folhas infectadas e tampões de extrações protetivos no preparo do inóculo. Este procedimento proporcionou um maior número de lesões locais em plantas de *C. quinoa* inoculadas quando comparado com outros processos de inoculação, demonstrando uma maior estabilidade do vírus, uma vez que o número de lesões locais produzidas por uma hospedeira esta diretamente relacionada com a concentração e estabilidade do vírus no inóculo (BETTI, 1995).

Das espécies de plantas indicadoras testadas *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *C. murale*, *Helychrysus bracteatum* e *Nicotiana benthamiana* foram suscetíveis ao vírus. Plantas de *C. quinoa* desenvolveram pontos cloróticos locais e mosaico sistêmico, enquanto *C. amaranticolor* e *C. murale* desenvolveram respectivamente sintomas de pontos cloróticos e necróticos locais. Plantas de *N. benthamiana* comportaram-se como hospedeiras latentes para o vírus e *H. bracteatum*, planta da vegetação espontânea, desenvolveu sintomas sistêmicos de clareamento de nervuras e deformação foliar; enquanto que *G. globosa* e *Z. elegans* não manifestaram sintomas (Tabelas 1 e 2).

Estes resultados mostraram que o isolado de LeMoV comportou-se biologicamente de maneira diferente daquele descrito originalmente no Distrito Federal, que induzia respectivamente sintomas de lesões locais e latência em *G. globosa* e *Z. elegans* e não manifestava sintomas em *H. bracteatum* (MARINHO & KITAJIMA, 1986b).

Sintomas de mosqueado sistêmico também foram observados na maioria das cultivares de alface testadas. As cultivares 'Karla', 'Romana Branca', 'Simpson' e 'Vitória de Santantão' não desenvolveram sintomas, podendo estas serem utilizadas futuramente em programas de melhoramento, por possuírem possíveis fontes de resistência a este vírus. As cultivares Brasil-303, Elisa, Floresta, Hortênsia e Regina, que são recomendadas devido a sua adaptabilidade às condições ambientais brasileiras e resistentes ao LMV, mostraram-se suscetíveis ao isolado de LeMoV (Tabela 1).

Como as plantas de alface infectadas no campo apresentavam sintomas semelhantes aos induzidos por estirpes menos agressivas do *Lettuce mosaic vírus* (LMV), e pelo fato de que o círculo de hospedeiras experimentais geralmente reflete o círculo de hospedeiras naturais do vírus (MATTHEWS, 1992), plantas da vegetação espontânea, pertencentes à família Asteraceae, foram utilizadas nos testes biológicos. Plantas de *G. parviflora* e *H. bracteatum*, quando inoculadas com um isolado de LMV-II, demonstraram que apenas a primeira espécie reagiu com sintomas de mosaico sistêmico. Estes resultados permitiram concluir que, estas duas espécies de plantas podem ser utilizadas como hospedeiras diferenciais para o LMV e para isolados do LeMoV evitando assim diagnósticos equivocados, uma vez que os sintomas induzidos por estes vírus em alface são semelhantes e a ocorrência de infecção mistas destes também é relatada com frequência em campo no Estado de São Paulo (STAMGARLIN, 1995).

Tabela 1 - Círculo de hospedeiras e sintomas induzidos pelo vírus isolado de alface 'Verônica' proveniente de Campinas.

Família	Espécies	Sintomas	Recuperação*
Aizoaceae	<i>Tetragonia expansa</i>	-	-
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i>	-	-
Apocynaceae	<i>Catharanthus roseus</i>	-	-
Asteraceae	<i>Cichorium endivia</i>	-	-
	<i>Helianthus annuus</i>	-	-
	<i>Lactuca sativa</i>		
	De Mesa ¹	Mo, S	+
	Nabuco ¹	Mo, S	+
	Tainá ¹	Mo, S	+
	Brisa ²	Mo, S	+
	Elba ²	Mo, S	+
	GrandsRapids ²	Mo, S	+

Tabela 1 Cont. - Círculo de hospedeiras e sintomas induzidos pelo vírus isolado de alface 'Verônica' proveniente de Campinas.

Família	Espécies	Sintomas	Recuperação*
	Great Lakes ²	Mo, S	+
	Hanson ²	Mo, S	+
	Mimosa Salad Bowl ²	Mo, S	+
	Quatro Estações ²	Mo, S	+
	Romana Branca ²	-	-
	Simpson ²	-	-
	Vera ²	Mo, S	+
	Babá de Verão ³	Mo, S	+
	Brasil 303 ³	Mo, S	+
	Carolina ³	Mo, S	+
	Elisa ³	Mo, S	+
	Floresta ³	Mo, S	+
	Hortênsia ³	Mo, S	+
	Karla ³	-	-
	Nacional ³	Mo, S	+
	Regina ³	Mo, S	+
	Sem Rival ³	Mo, S	+
	Verônica ³	Mo, S	+
	Vitória de Santantão ³	-	-
	White Boston ³	Mo, S	+
	<i>Lactuca serriola</i>	-	-
Balsaminaceae	<i>Impatiens</i> sp.	-	-
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium amaranticolor</i> &Reyn.	PC,L ¹	+
	<i>C. quinoa</i>	PC,L / M,S	+
	<i>C. murale</i>	PN,L	+
	<i>C. polisperum</i>	-	-
Cruciferae	<i>Raphanus sativus</i>	-	-
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i>	-	-
	<i>Cucurbita pepo</i>	-	-
Fabaceae	<i>Glycine max</i>	-	-
	<i>Phaseolus vulgares</i>	-	-
Portulacaceae	<i>Portulaca oleraceae</i>	-	-
Solanaceae	<i>Datura stramonium</i>	-	-
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	-	-
	<i>Nicandra physaloides</i>	-	-
	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Lt, S	+
	<i>N. clevelandii</i>	-	-
	<i>N. glutinosa</i>	-	-
	<i>N. rustica</i>	-	-
	<i>N. sylvestris</i>	-	-
	<i>N. tabacum</i> 'Samsun'	-	-
	'TNN'	-	-
	'Turkish'	-	-
	'White Burley'	-	-
	<i>Petunia hybrida</i>	-	-
	<i>Physalis floridana</i>	-	-
	<i>Solanum americanum</i>	-	-
	<i>S. melongena</i>	-	-

Legendas: L (sintoma local), Lt (latência), M (mosaico), Mo (mosqueado), PC (pontos cloróticos), PN (pontos necróticos), S (sintoma sistêmico), ¹ (cultivar americana), ² (cultivar crespa), ³ (cultivar lisa), - (transmissão negativa), + (transmissão positiva), * Recuperação (plantas indicadoras sintomáticas e assintomáticas inoculadas mecanicamente em *Chenopodium quinoa* para confirmação da transmissão)

Tabela 2 - Sintomas induzidos pelo vírus isolado de alface 'Verônica' e pelo *Lettuce mosaic virus* (LMV) em vegetação subspontânea pertencentes à família Asteraceae.

Espécie (nome popular)	Vírus isolado de alface	LMV
<i>Bidens pilosa</i> (picão preto)	-	-
<i>Bidens sulphurea</i> (cosmos amarelo)	-	-
<i>Coreopsis lanceolata</i> (margaridinha amarela)	-	-
<i>Emilia sonchifolia</i> (falsa serralha)	-	-
<i>Galinsoga parviflora</i> (picão branco)	-	M, S ¹
<i>Helichrysum bracteatum</i> (sempre-viva)	CN, DF, S	-
<i>Sonchus oleraceae</i> (serralha)	-	-
<i>Taraxacum officinale</i> (dente de leão)	-	-
<i>Zinnia elegans</i> (capitão)	-	-

Legendas: CN (clareamento de nervuras), DF (deformação foliar), L (sintoma local), M (mosaico), PC (pontos cloróticos), S (sintoma sistêmico), - (transmissão mecânica negativa)

Sementes de *C. quinoa* e de alface 'Elisa', 'Hortênsia 1' e 'Verônica', experimentalmente infectadas, originaram plantas saudáveis que não desenvolveram sintomas durante um período de 45 dias após a germinação. Resultados negativos foram obtidos em testes de recuperação em plantas de *C. quinoa*. Estes resultados demonstram que o LeMoV não é transmitido pela semente em alface, confirmando assim, que são poucos os vírus que infectam alface e que são transmitidos por sementes, podendo ser citados o *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Lettuce mosaic virus* (LMV) e *Tobacco ringspot virus* (TRSV) (RICHARDSON, 1979).

A maioria dos vírus isométricos que infectam a alface são transmitidos por insetos pertencentes à família Aphididae (BLUA et al., 1994). Em testes de transmissão utilizando afídeos pertencentes às espécies *A. gossypii*, *B. brassicae* e *M. persicae* obteve-se resultados negativos confirmando a possível especificidade, no processo de transmissão, do LeMoV com o afídeo *Hyperomyzus lactucae* L (MARINHO & KITAJIMA, 1986b).

Nos testes de estabilidade o vírus apresentou ponto de inativação termal (P.I.T.) de 65° C, ponto final de diluição (P.F.D.) de 10⁻³, longevidade "in vitro" (L.I.V.) de 2 dias em extrato mantido a temperatura ambiente e manutenção da infectividade em tecido vegetal desidratado por 515 dias (período máximo testado). Propriedades que estão dentro da faixa de variação daquelas descritas também para o DaYMV (Boss et al., 1983).

O processo de purificação foi realizado no vigésimo primeiro dia após a inoculação, sendo este intervalo de tempo estabelecido a partir da contagem do maior número de lesões locais induzidas em plantas de *C. quinoa* reinoculadas a partir de uma fonte da mesma espécie apresentando sintomas sistêmicos. Obteve-se uma melhor sedimentação do vírus quando se acrescentou 10% de PEG e 0,1 M de NaCl ao volume do sobrenadante proveniente do processo de clarifi-

cação com butanol e clorofórmio seguido de centrifugação a 10.000 g por 10 min.

Após ressuspensão e ultracentrifugação do pellet a 70.000g por 3h obteve-se uma concentração maior do vírus do que aquela obtida sem o PEG, fato confirmado pela leitura de absorbância (A_{260}/A_{280}) e pela observação de partículas isométricas ao microscópio eletrônico, o que permitiu concluir que uma grande parcela de partículas de vírus ficava dispersa no sobrenadante proveniente da fase de clarificação.

As preparações semi purificadas quando submetidas a gradiente de densidade de sacarose ou de sulfato de cério não formaram banda característica. O precipitado quando ressuspensado e submetido a análise espectrofotométrica não proporcionou uma leitura característica de nucleoproteína, indicando perda das partículas do vírus no gradiente, provavelmente devido às características do vírus de instabilidade e baixa concentração na planta hospedeira.

A análise espectrofotométrica das preparações semi purificadas forneceu uma leitura de absorbância entre o pico mínimo e pico máximo (A_{260}/A_{280}) de 1,34. A concentração do vírus estimada foi de 0,38 mg/mL, considerada baixa para padrões de vírus vegetais (MATHEWS, 1992). A porcentagem do ácido nucléico estimada de acordo com GIBBS & HARRISON (1976) foi de 32%, estando este valor dentro do intervalo descrito para vírus isométricos.

Os anti-soros policlonais obtidos por meio da imunização de galinhas foram titulados através do teste de microprecipitina (VAN REGENMORTEL, 1982), o que permitiu observar que ele apresentou baixo título (1:512). Em testes de dupla difusão em ágar a formação de linha de precipitação próxima ao antígeno foi observada, indicando que ele se difundia vagarosamente ou não se difundia no gel, provavelmente devido ao seu maior peso molecular.

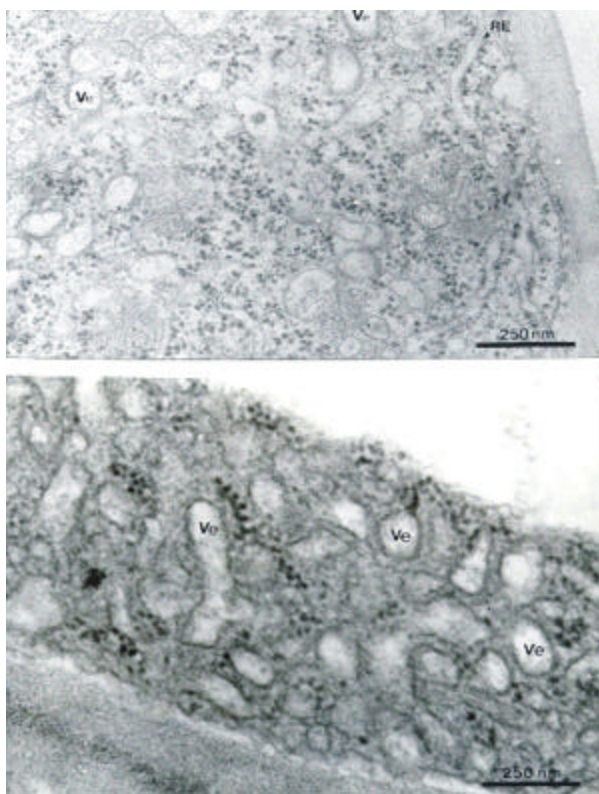


Fig. 1 - Micrográfia eletrônica de células do mesófilo de *Chenopodium quinoa* (A) e *Nicotiana benthamiana* (B) com região citoplasmática apresentando vesículas com membrana dupla "VE" e espessamento do retículo endoplasmático "RE".

Em cortes ultrafinos de folhas de *C. quinoa* ao microscópio eletrônico visualizou-se espessamentos do retículo endoplasmático e vesículas com membrana dupla dispersas no citoplasma (Fig. 1A). Em plantas de *N. benthamiana* assintomáticas foram observadas presumíveis partículas isométricas do vírus no plasmodesma e alterações semelhantes àquelas observadas em *C. quinoa* (Figs. 1B e 2).

Em PTA-ELISA, após a leitura de absorbância ($A_{405\text{ nm}}$), os valores obtidos permitiram concluir que o vírus isolado de alface apresentou relacionamento sorológico com o DaYMV, cuja leitura média do material infectado foi de 0,450 e de 0,020 para o material sadio. Não foi observada reação do vírus com os demais antissoros utilizados.

A transmissão negativa por sementes, juntamente com as características de baixa concentração, círculo de hospedeiras restrito, a não transmissão mecânica para plantas *Taraxacum officinale*, morfologia isométrica, dificuldade em observar partículas ao microscópio eletrônico através do extrato de plantas infectadas, baixa estabilidade nos testes *in vitro*, resposta satisfatória somente através de ELISA e negativos nos testes de dupla difusão estão de acordo com as características descritas para diversos isola-

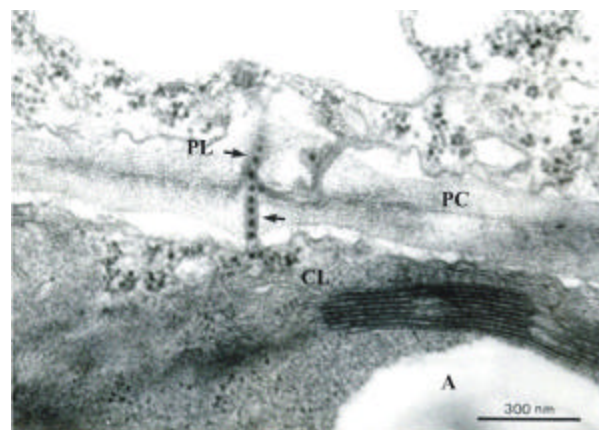


Fig. 2 - Micrográfia eletrônica de presumíveis partículas do vírus isolado de alface 'Verônica', proveniente de Campinas, em plasmodesmo "PL" de *Nicotiana benthamiana* assintomática (indicado por setas); "A"- amido; "CL"- cloroplasto; "PC" - parede celular.

dos europeus do DaYMV (Boss *et al.*, 1983) e parcialmente com o LeMoV, assim denominado no Brasil por MARINHO & KITAJIMA (1986a,b).

Pelo fato de ter sido observado o relacionamento sorológico com o DaYMV, possivelmente o LeMoV seja um provável membro da família *Sequiviridae* onde se enquadram, atualmente, com base nas propriedades biológicas, físico-químicas e sorológicas os gêneros *Sequivirus* e *Waikavirus* (VAN REGENMORTIEL, 2000).

De maneira geral o DaYMV se encontra disseminado na Europa, sendo o relato mais recente registrado em culturas de alface na Polônia, cuja a identificação foi baseada principalmente por meio do círculo de hospedeiras, testes físico-químicos e sorológicos (TWARDOWICZ-JAKUSZ *et al.*, 1997).

Interações entre o LMV e o DaYMV já foram descritas ocorrendo frequentemente em culturas de alface na região central da Polônia também por TWARDOWICZ-JAKUSZ *et al.* (1997). Este tipo de interação também vem sendo ultimamente registrada e estudada no Brasil, uma vez que, vírus isométricos com a mesmas características do isolado estudado vem sendo relatados em coinfeções com o LMV em alface na região de Campinas, SP (STANGARLIN, 1995; JADÃO *et al.*, 2004).

Estudos futuros de melhoramento devem ser realizados para se obter fontes de tolerância ou resistência que visem o controle deste possível *Sequivirus*, uma vez que a maioria das cultivares de alface testadas e disponíveis para comercialização no Brasil mostraram-se suscetíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A.M.R. & LIMA, J.A.A. *Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia*. Brasília: Publicações da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2001. 186p.

- BETTI, J.B. Técnicas de detecção aplicadas no diagnóstico de vírus de plantas. *Summa Phytopathol.*, v.21, n.1, p.72-76, 1995.
- BLUA, M.J.; PERRING, T.M.; MADORE, M.A. Plant virus induced changes in aphid population development and temporal fluctuations in plant nutrients. *J. Chem. Ecol.*, v.20, n.3, p.691-707, 1994.
- BOSS, L.; HUIJEBERTS, N.; HUTTINGA, H.; MAAT, D.Z. Further characterization of *Dandelion yellow mosaic virus* from lettuce and dandelion. *Neth. J. Plant Pathol.* v.89, n.5, p.207-222, 1983.
- CONVERSE, R. & MARTIN, R. Enzyme-linked immunosorbent assay. In: HAMPTON, R.O.; BALL, E.M.; DE BOER, S.H. (Eds.). *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens*. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1990. p.179-204.
- COSTA, A.S. Tornou-se rara a ocorrência do vírus do mosaico do pepino em plantações de alface e tomate em São Paulo. *Summa Phytopath.*, v.9, p.39, 1983.
- DAVIS R.M.; SUBBARAO, K.V.; RAID, R.N.; KURTS, E.A. *Compendium of lettuce diseases*. St. Paul: APS Press, 1997. 79p.
- GIBBS, A.J. & HARRISON, B.D. *Plant virology: the principles*. London: Edward Arnold Publishers, 1976. 292p.
- INFORMAÇÕES ESTATÍSTICAS DA AGRICULTURA (ANUÁRIO IEA). São Paulo: Instituto de Economia Agrícola, Coordenadoria de Pesquisa dos Agronegócios, Secretaria da Agricultura e Abastecimento, Governo do Estado de São Paulo, v.11, n.1, 2000. 233p.
- JADÃO, A.S., PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; ZERBINI, F.M. Efeitos na fotossíntese e área foliar de cultivares de alface inoculadas mecânicamente com patótipos do *Lettuce mosaic virus* e *Lettuce mottle virus*. *Fitopatol. Bras.*, v.29, n.1, p.11-15, 2004.
- KASSANIS, B. A virus attacking lettuce and dandelion. *Nature*, v.154, p.6, 1944.
- KITAJIMA, E.W., DE ÁVILA, A.C., RESENDE, R.O. Taxonomy of plant viruses (Revisão). *Fitopatol. Bras.*, v.22, n.1, p.5-24, 1997.
- KITAJIMA, E.W. Lista de publicações de viroses e enfermidades correlatas de plantas no Brasil de 1986 a 1993. *Fitopat. Bras.*, Supl. Esp., p.92, 1992.
- KITAJIMA, E.W. Lista de publicações de viroses e enfermidades correlatas de plantas no Brasil de 1911 a 1985. *Fitopat. Bras.*, Supl. Esp., 1986.
- MARINHO, V.L.A. & KITAJIMA, E.W. Purificação e sorologia do vírus do mosqueado da alface. *Fitopat. Bras.*, v.11, n.4, p.937-942, 1986a.
- MARINHO, V.L.A. & KITAJIMA, E.W. Vírus do mosqueado da alface - um vírus isométrico transmitido por afídeo. *Fitopatol. Bras.*, v.11, n.4, p.923-935, 1986b.
- MARTELLI, G.P. & RUSSO, M. The use of thin sectioning for visualization and identification of plant viruses. In: MARAMOROSCH, K. & KOPROWSKI, H (Eds.). *Methods in virology*. New York: Academic Press, 1984. p.143-192.
- MATTHEWS, R.E.F. *Fundamentals of plant virology*. California: Academic Press, 1992. 403p.
- POLSON, A. & VON WECHMAR, M.B. Isolation of viral antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol. Commun.*, v.14, n.5, p.475-493, 1980.
- RESENDE, R.O. & CUPERTINO, E.P. Doenças em hortaliças. *Inf. Agropecu.*, v.18, n.184, p.18-27, 1995.
- RICHARDSON, M.J. *An annotated list of seed-borne diseases*. Zurich: International Seed Testing Association, 1979. 320p.
- STANGARLIN, O.S. *Identificação dos vírus causadores de mosaico em cultivares de alface (Lactuca sativa L.) resistentes ao vírus do mosaico da alface nas regiões produtoras do Estado de São Paulo*. Botucatu: 1995. 72p. [Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu].
- TWARDOWICZ-JAKUSZ, A.; ZIELINSKA, L.; KANIEWSKI, W. Occurrence and identification of viruses affecting lettuce in Poland II – *Dandelion yellow mosaic virus* (DYMV). *J. Plant Prot. Res.*, v.37, n.1/2, p.18-27, 1997.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. New York: Academic Press, 2000. 1162p.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V. *Serological and immunochemical of plant viruses*. New York: Academic Press, 1982. 302p.

Recebido em 25/5/04

Aceito em 23/8/04