



ANTONIA THALYTA LOPES SILVEIRA

**OCORRÊNCIA DE VÍRUS EM LAVOURAS DE ALFACE
(*Lactuca sativa* L.) NO SUL DE MINAS GERAIS**

**LAVRAS – MG
2019**

ANTONIA THALYTA LOPES SILVEIRA

**OCORRÊNCIA DE VÍRUS EM LAVOURAS DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.) NO SUL
DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Antonia dos Reis Figueira
Orientadora

Dra. Priscilla de Sousa Geraldino Duarte
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Silveira, Antonia Thalyta Lopes.

Ocorrência de vírus em lavouras de alface (*Lactuca sativa* L.)
no Sul de Minas Gerais / Antonia Thalyta Lopes Silveira. - 2019.
44 p. : il.

Orientador(a): Antonia dos Reis Figueira.

Coorientador(a): Priscilla de Sousa Geraldino Duarte.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. diagnose viral. 2. Tospovirus. 3. LMV. I. Figueira, Antonia
dos Reis. II. Duarte, Priscilla de Sousa Geraldino. III. Título.

ANTONIA THALYTA LOPES SILVEIRA

**OCORRÊNCIA DE VÍRUS EM LAVOURAS DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.) NO SUL
DE MINAS GERAIS
VÍRUS OCCURRENCE IN LETTUCE (*Lactuca sativa* L.) CROPS LOCATED IN
SOUTH OF MINAS GERAIS STATE - BRAZIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 19 de fevereiro de 2019

Dr. Ricardo Magela de Souza - UFLA

Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa - EMBRAPA

Profa. Dra. Antonia dos Reis Figueira
Orientadora

Dra. Priscilla de Sousa Geraldino Duarte
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2019**

Aos meus pais, Célio e Maria do Carmo.

A minha irmã, Thacyla.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

À Professora Antonia dos Reis Figueira, pela orientação, paciência e disposição para ajudar.

A todos os funcionários do DFP/UFLA, especialmente Carlos, Ana Maria e Ariane por todo auxílio e carinho.

A José Roberto pelas viagens, companhia e paciência durante a coleta de amostras.

A todos os colegas de departamento, pois muitos se tornaram amigos, e alguns irmãos.

Aos meus colegas de laboratório, Daniele, Sérgio, Andrés, Jéssica, Mirelly, Franciely, Priscilla, Kelly e Thallinton.

Aos meus pais, Célio e Maria do Carmo pelo amor e apoio incondicional, em todas as minhas decisões nas diferentes etapas de minha vida e a minha irmã Thacyla.

A todos os membros das famílias Lopes e Silveira, pelo apoio, força e oração, especialmente as minhas tias Alila e Iraides.

À família Garcia Fernandez, pela acolhida, amor e carinho.

À Mariele, Nadjla e Vanessa, pela amizade, apoio e carinho.

Ao professor Cleilson Uchôa, pelo apoio, amizade e carinho.

“Eu não posso mudar a direção do vento, mas posso ajustar minhas velas para sempre chegar ao meu destino” (Jimmy Dean)

RESUMO

A alface é uma das hortaliças mais consumida pelos brasileiros e cultivada por todo o mundo. Um fator limitante na produção desta cultura é a presença de doenças viróticas que afetam principalmente as folhas, desvalorizando e inutilizando-as comercialmente. Com a finalidade de determinar quais são os vírus prevalentes em alface, foram coletadas amostras em lavouras comerciais. As amostras foram coletadas em campos de produção nas cidades de Lavras, Nepomuceno, Santana da Vargem, Boa Esperança, Três Corações, Três Pontas, Varginha e São Gonçalo do Sapucaí. Parte do material coletado foi inoculado mecanicamente em plantas indicadoras. A outra parte foi dessecada e armazenada para estudos futuros e o restante submetido a RT-PCR para diagnose dos vírus presentes. Foram empregados primers específicos para os principais vírus que infectam a alface: *Lettuce mosaic virus* (LMV), *Lettuce mottle virus* (LeMoV), *Lettuce big-vein associated virus* (LBVaV), *Mirafiori lettuce big-vein ophiovirus* (MLBVV), para espécies do gênero *Tospovirus* e específico para *Groundnut ringspot tospovirus* (GRSV), *Tomato chlorotic spot tospovirus* (TCSV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) e *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV). Os vírus encontrados no campo foram o LMV, LeMoV e os Tospovirus TCSV e GRSV, com maior ocorrência do LMV e do TCSV. A caracterização molecular dos isolados brasileiros confirmou a identidade das espécies de Tospovirus TCSV e GRSV.

Palavras-chave: diagnose viral, Tospovirus, LMV, LeMoV, GRSV, TCSV.

ABSTRACT

Lettuce (*Lactuca sativa*) can be found growing all over the world and is the Brazil's most consumed vegetable. The viral diseases are considered a limiting factor in the production of this crop, since it can affect their leaves, devaluing and making them commercially useless. This study was carried out aiming to determine which viruses are prevalent in some commercial areas located in southern region of Minas Gerais state, Brazil. Samples were collected in crops located in Lavras, Nepomuceno, Santana da Vargem, Boa Esperança, Três Corações, Três Pontas, Varginha and São Gonçalo do Sapucaí. Part of the collected material was mechanically inoculated in indicators plants; part was desiccated and stored for future studies and the remainder was submitted to RT-PCR. The primers used were specific for the mains viruses that infect lettuce: *Lettuce mosaic virus* (LMV), *Lettuce mottle virus* (LeMoV), *Lettuce big-vein associated virus* (LBVaV), *Mirafiori lettuce big-vein ophiovirus* (MLBVV), *Tospovirus* genus and *Tospovirus* species specific for *Groundnut ringspot tospovirus* (GRSV), *Tomato chlorotic spot tospovirus* (TCSV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) and *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV). The viruses found in the field were LMV, LeMoV and Tospovirus TCSV and GRSV, with higher occurrence of LMV and TCSV. The molecular characterization of the Brazilian isolates confirmed the identity of the Tospovirus TCSV and GRSV species.

Keywords: viral diagnosis, Tospovirus, LMV, LeMoV, GRSV, TCSV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização das cidades de coleta das amostras de alface no estado de Minas Gerais.....	16
Figura 2. Sintomas observados em plantas indicadoras após inoculação mecânica em casa de vegetação.	20
Figura 3. Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos da PCR para o gênero Tospovirus e espécies do gênero.	22
Figura 4. Cladograma construído com base na sequência de nucleotídeos do Seq1 (TCSV) e de outras espécies de Tospovirus disponíveis no GenBank.	27
Figura 5. Cladograma construído com base na sequência de nucleotídeos do Seq2 (GRSV) e de outras espécies de Tospovirus disponíveis no GenBank.	27
Figura 6. Cladograma construído com base na sequência de aminoácidos do Seq1 (TCSV) e de outras espécies de Tospovirus disponíveis no GenBank.	28
Figura 7. Cladograma construído com base na sequência de aminoácidos do Seq2 (GRSV) e de outras espécies de Tospovirus disponíveis no GenBank.	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação dos primers empregados para a diagnose de vírus em alface.....	17
Tabela 2 - Isolados de tospovirus do GenBank empregados para comparação com as sequências dos isolados estudados.....	18
Tabela 3 - Sintomas apresentados pelas plantas indicadoras após a inoculação mecânica com os respectivos vírus.....	19
Tabela 4 - Resultados das análises de diagnose realizados nas amostras de alface coletadas no campo.....	21
Tabela 5 - Identidade de nucleotídeos entre a sequência Seq1 (TCSV) com acessos do GenBank dos membros do gênero <i>Tospovirus</i>	24
Tabela 6 - Identidade de nucleotídeos entre a sequência Seq2 (GRSV) com acessos do GenBank dos membros do gênero <i>Tospovirus</i>	25
Tabela 7 - Identidade entre os aminoácidos do Seq1 (TCSV) e os isolados de tospovirus provenientes do GenBank.....	25
Tabela 8 - Identidade entre os aminoácidos do Seq 2 (GRSV) e os isolados de tospovirus provenientes do GenBank.....	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1 O cultivo da Alface	8
2.2. Doenças viróticas que afetam a alface	9
2.2.1 <i>Lettuce mosaic virus</i> - LMV	9
2.2.2 <i>Lettuce mottle virus</i> - LeMoV	10
2.2.3 <i>Varicosavirus</i> e <i>Ophiovirus</i>	11
2.2.4 <i>Tospovirus</i>	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Local do experimento	15
3.2 Obtenção das plantas e manutenção do inóculo	15
3.3 Testes biológicos	15
3.3 Testes moleculares	16
3.3.1 Extração do RNA viral	16
3.3.4 RT-PCR para diagnose dos vírus	17
3.3.5 Sequenciamento e análise das sequências	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 Testes biológicos	19
4.2 Testes de diagnose	21
5. CONCLUSÃO	29
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	30

1. INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta herbácea, com caule diminuto, ao qual se prendem as folhas. Estas são amplas e crescem em roseta, em volta do caule, podendo ser lisas ou crespas, formando ou não uma “cabeça”, com coloração em vários tons de verde, ou roxa, conforme a cultivar. É uma das hortaliças mais cultivadas e consumidas no mundo, com produção mundial de 24,9 milhões de toneladas anuais (FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS-FAO, 2017).

No Brasil, representa 50% de toda a produção e comercialização nacional de hortaliças com 66.301 propriedades produtoras, área total plantada de 80.000 ha, gerando cinco empregos diretos/ha. A cultura é também a terceira em maior volume de produção, perdendo apenas para a melancia e o tomate e movimentando cerca de 8 bilhões de reais no varejo, com produção de mais de 1,5 milhão de toneladas por ano (FILGUEIRA, 2008; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS-ABCSEM, 2016). O Estado de Minas Gerais se destaca como uma das regiões de maior produção do país, com produção de 30 mil toneladas e produtividade de 23 toneladas/ha (SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA-SNA, 2015).

Diversas doenças podem afetar a cultura da alface, entre as quais as de origem viral despertam a atenção pela sua complexidade, inexistência de medidas curativas de controle e frequentemente por causarem perdas significativas na produção. Geralmente, os sintomas foliares observados em plantas infectadas por vírus são mosaico, necrose, arroxamento, deformação, mosqueado e bronzeamento, além de redução no desenvolvimento da planta, resultando em alterações morfológicas que inviabilizam a sua comercialização.

Durante muito tempo o *Lettuce mosaic virus* (LMV), pertencente ao gênero *Potyvirus*, foi o principal vírus detectado nas lavouras de alface brasileiras. Em anos recentes, algumas espécies de tospovirus têm aparecido com maior frequência, em incidências que tem levado os produtores até a abandonarem certas áreas de produção. As principais espécies de tospovirus detectadas no Brasil foram: *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV), *Groundnut ringspot tospovirus* (GRSV), *Tomato chlorotic spot tospovirus* (TCSV). Esses vírus pertencem à família *Tospoviridae*, gênero *Orthotospovirus*. Além desses vírus, outro que também tem aparecido, embora com menor incidência, o *Lettuce big-vein associated varicosavirus* (LBVaV), do gênero *Varicosavirus*, e o *Mirafiori lettuce big-vein ophiovirus*

(MLBVV) do gênero *Ophiovirus*, agente etiológico do engrossamento das nervuras da alface (PAVAN et al., 2008; LIMA et al., 2016; PACIFICO, 2017) .

Mais de 900 espécies de plantas, pertencentes a 90 famílias botânicas, incluindo plantas cultiváveis, ornamentais e daninhas, já foram relatadas como susceptíveis aos tospovirus (OLIVER; WHITFIELD, 2016). Geralmente eles provocam perda de rendimento em um grande número de culturas economicamente importantes, como amendoim, alface, papaia, ervilha, batata, pimenta doce, tabaco, tomate e em culturas ornamentais, como alstroemeria, begônia, crisântemo, dália, gerbera, gloxinia e impatiens. Sob condições naturais, os tospovirus são transmitidos pelo inseto vetor tripses de modo persistente propagativo (RILEY et al, 2011). A aquisição do vírus pelo vetor ocorre na fase larval, porém a transmissão somente ocorrerá na fase adulta.

Entre os anos de 2016 e 2017, um levantamento das doenças em alface no sul de Minas Gerais, 15,4% das doenças encontradas foram de etiologia viróticas, sendo que os tospovirus foram encontrados em 99% das propriedades avaliadas (PACIFICO, 2017). Nesse levantamento foram encontradas apenas as espécies TCSV e GRSV.

Nesse trabalho pretende-se investigar a ocorrência de viroses nos campos produtores de alface, localizados na região Sul de Minas Gerais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O cultivo da Alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) pertence à ordem Asterales e família *Asteraceae*. O centro de origem está no sudoeste da Ásia, mais precisamente entre a Mesopotâmia e o Curdistão, devido à diversidade de espécies. No Egito as folhas foram utilizadas na alimentação, como afrodisíaco e sacrifícios à deusa Min, e as sementes para óleo alimentar. A partir do Egito chegou à Grécia e Roma, tornou-se conhecida pelas qualidades relacionadas à digestão sendo mencionada por vários escritores. Difundiu-se pela China, Europa, América (VRIES, 1997) e foi introduzida no Brasil pelos portugueses em 1647 (SALA; COSTA, 2012).

É uma planta anual, originária de clima temperado, uma das hortaliças mais populares e consumidas no Brasil e no mundo, devido ao sabor, qualidade nutricional e preço acessível ao consumidor (SALA; COSTA, 2012). Entre os principais tipos de alface produzidos no país destacam-se os tipos: crespa, lisa, americana, mimosa, romana, roxa/vermelha e crocante, com variação de formatos, tamanho e coloração (SALA; COSTA, 2016).

Cultivares do grupo lisa foram as mais plantadas até a década de 1990. Posteriormente, ocorreu uma mudança na tendência do mercado consumidor e as cultivares pertencentes ao grupo crespa passaram a ser produzidas em larga escala e, atualmente, correspondem ao principal segmento de alface cultivado no Brasil. A não formação de cabeça, aliada à presença de folhas flabeladas, conferiu às cultivares crespas uma melhor adaptação às condições ambientais do verão, que se caracterizam pelas altas temperaturas e índices de pluviosidade elevados. No início dos anos 90, a demanda de mercado da alface americana também foi impulsionada para atender as redes de lanchonetes *fast foods* (AZEVEDO FILHO, 2017).

Seu cultivo é realizado de maneira intensiva e geralmente é praticado por agricultores familiares, gerando cinco empregos diretos por cada hectare cultivado e a obtenção de elevada produção em pequenas áreas de plantio (COSTA; SALA, 2005; CARVALHO FILHO; GOMES; COSTA-CARVALHO, 2012). Atualmente, existem pelo menos quatro sistemas produtivos de alface no Brasil: o cultivo convencional, o sistema orgânico em campo aberto, o cultivo protegido no sistema hidropônico e o protegido sob solo (RESENDE et al., 2007; FILGUEIRA, 2008).

2.2. Doenças viróticas que afetam a alface

Dentre os fitopatógenos que infectam a alface, os vírus são importantes pelo seu potencial de induzir quedas na produtividade, qualidade e rentabilidade da cultura, pela ausência de medidas curativas e pela sua rápida disseminação no campo. Muitas viroses têm sido descritas na cultura da alface, entretanto nem todas são de ocorrência rotineira (PAVAN et al., 2008; MORENO; FERERES, 2012).

Diversos vírus foram relatados afetando regiões produtoras de alface mundialmente, as espécies *Alfalfa mosaic virus* (AMV, *Alfamovirus*); *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV, *Nepovirus*); *Beet western yellows virus* (BWYV, *Polerovirus*); *Beet yellow stunt virus* (BYSV, *Closterovirus*); *Bidens mottle virus* (BiMoV, *Potyvirus*); *Bidens mosaic virus* (BiMV, *Potyvirus*); *Broad bean wilt virus* (BBWV, *Fabavirus*); *Cucumber mosaic virus* (CMV, *Cucumovirus*); *Dandelion yellow mosaic virus* (DYMV, *Sequivirus*); *Lettuce big-vein associated varicosavirus* (LBVaV, *Varicosavirus*); *Mirafiori lettuce big-vein ophiovirus* (MLBVV, *Ophiovirus*); *Lettuce chlorosis virus* (LCCV, *Crinivirus*); *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV, *Crinivirus*); *Lettuce mosaic virus* (LMV, *Potyvirus*); *Lettuce mottle virus* (LeMoV, um possível *Sequivirus*); *Lettuce necrotic yellows cytorhabdovirus* (LNYV, *Cytorhabdovirus*); *Lettuce speckles mottle virus* (LSMV, *Umbravirus*); *Sonchus yellow net nucleorhabdovirus* (SYNV, *Nucleorhabdovirus*); *Sowthistle yellow vein nucleorhabdovirus* (SYVV, *Nucleorhabdovirus*); *Tobacco rattle virus* (TRV, *Tobravirus*); *Tobacco ringspot virus* (TRSV, *Nepovirus*); *Tobacco streak virus* (TSV, *Ilarvirus*); *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV, *Orthotospovirus*); *Tomato chlorotic spot tospovirus* (TCSV, *Orthotospovirus*); *Groundnut ringspot tospovirus* (GRSV, *Orthotospovirus*) e *Turnip mosaic virus* (TuMV, *Potyvirus*) (COLARICCIO; CHAVES, 2017).

2.2.1 *Lettuce mosaic virus* - LMV

O mosaico da alface causado pelos vírus *Lettuce mosaic virus* (LMV) foi relatado pela primeira vez na Flórida, EUA, em 1921. É considerada a virose de maior importância em lavouras de alface no mundo, e já foi relatada em todos os continentes (GERMAN-RETANA et al., 2008). No Brasil, teve seu primeiro relato em 1945 (KRAMER et al., 1945).

Pertencente à família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*, é constituído por partículas virais filamentosas e flexuosas com tamanho aproximado de 750 nm de comprimento e 15 nm de

diâmetro, contendo RNA de fita simples senso positivo (ssRNA+). Seu genoma possui uma única ORF de 10.080 nucleotídeos que codifica uma poliproteína (WYLIE et al., 2018). Devido ao aumento de isolados identificados por todo o mundo, foi realizado o agrupamento em patotipo ou estirpes para facilitar os estudos; Atualmente, o LMV possui três grupos: LMV-Yar, LMV-Greek e LMV-RoW, o último grupo contém o maior número de isolados e dois subgrupos LMV-Most e LMV-Common (LIM et al., 2014).

O LMV possui uma ampla gama de hospedeiros, cerca 121 espécies, de 17 famílias botânicas, abrangendo 60 gêneros; das quais a família Asteraceae apresenta a maior quantidade de espécies suscetíveis (GERMAN-RETANA et al., 2008; PAVAN et al., 2008).

O LMV é encontrado com maior frequência em períodos de temperatura amena e baixa umidade, causando sintomas característicos como mosaico, nanismo, distorção, embolhamento foliar e necrose (PAVAN et al., 2008). A sua transmissão ocorre por afídeos, de maneira não persistente, sendo as espécies *Myzus persicae* e *Macrosiphum euphorbiae* os principais insetos vetores (BRAULT et al., 2010; KOBORI et al., 2011). Além disso, pode também ser transmitido por sementes, infectando tecidos embrionários, com taxa de transmissão entre 1 a 16%, variando de acordo com o patotipo e a cultivar (PEREIRA et al., 2012). Essas características facilitam a ocorrência de epidemias em cultivares susceptíveis, podendo afetar de 80 a 100% das plantas (DINANT; LOT, 1992).

Com o desenvolvimento de cultivares portadoras do gene de resistência recessiva, *mol¹* e *mol²*, houve considerável redução na incidência do LMV nos campos produtores. Entretanto, alta pressão de inóculo, aliada à presença de afídeos no campo, pode levar à queda de resistência da planta, uma vez que essa, quando portadora dos genes *mol¹* e *mol²* não são imunes ao vírus (PEREIRA et al., 2012; LUCAS, 2014; SALA; COSTA, 2016).

2.2.2 Lettuce mottle virus - LeMoV

Esse vírus foi relatado pela primeira vez por Kitajima et al. (1980) no Brasil, com o nome de mosaico necrótico da alface, devido aos sintomas observados na planta. Em 1982, no Distrito Federal, foi relatado por Marinho et al. (1982) infectando tanto as cultivares de alface resistentes como as susceptíveis ao LMV. Em 1986 mudou o nome para Mosqueado da alface, como é conhecido até os dias atuais (MARINHO; KITAJIMA, 1986). No ano de 2005, foi relatado por Krause-Sakate et al., (2008) infectando alfases no Chile.

Esse vírus induz sintomas como mosqueado e mosaico, semelhantes aos induzidos pelo LMV e geralmente aparece em baixa incidência nos campos (MARINHO; KITAJIMA, 1986; FIRMINO et al., 2008). Em 2012, num levantamento realizado em algumas regiões produtoras de alface, no Estado de São Paulo, observou-se maior incidência comparada ao LMV (DE MARCHI et al., 2012).

A sua espécie ainda não está definitivamente classificada pelo International Committee on Taxonomy of Viruses (ICVT), de modo que no momento é uma espécie candidata a ordem *Picornavirales*, família *Secoviridae*, gênero *Sequivirus* com base no sequenciamento parcial do genoma e visualização da partícula viral em microscópio eletrônico de transmissão (JADÃO, 2004; THOMPSON et al., 2017). O gênero *Sequivirus* é caracterizado por partículas isométricas, não envelopadas com tamanho aproximado de 30 nm de diâmetro, contendo RNA de fita simples senso positivo (ssRNA+). Possui uma única ORF que codifica uma poliproteína que é posteriormente clivada em oito proteínas funcionais (TURNBULL-ROSS et al., 1993; THOMPSON et al., 2017).

Marinho et al. (1986) conseguiram transmitir o LeMoV pelo afídeo *Hyperomyzus Lactucae* L. e por inoculação mecânica. Entretanto, em experimentos recentes realizados por Oliveira (2016), não foi obtida a transmissão do LeMoV pelos afídeos *Aphis gossypii*, *Aphis fabae* e *Myzus persicae*. Também não observaram a transmissão desse vírus por sementes, mas ressaltaram que seriam necessários estudos complementares para uma conclusão definitiva.

2.2.3 Varicosavirus e Ophiovirus

Conhecida como espessamento das nervuras ou Big-vein, essa virose teve o seu primeiro relato na Califórnia, EUA, em 1934 (JAGGER; CHANDLER, 1934). A identidade do agente causal permaneceu incerta por muitos anos, sendo considerada uma doença semelhante a vírus. Somente em 1983 foram visualizadas partículas virais no extrato vegetal de plantas infectadas, em microscópio eletrônico (VERBEEK et al., 2013). O espessamento das nervuras é uma virose complexa e importante, causada por dois vírus transmitidos por fungo, que ocorre em todos as cultivares de alface e em todos os tipos de cultivo. São potencialmente capazes de causar perdas consideráveis, sendo que já foram reportadas perdas em torno de 50 a 70% em alguns campos (SANCHES, 2006; MORENO & FERERES, 2012).

O sintoma ocorre devido à hiperplasia das células próximas as nervuras, que aumentam seu volume, tornando-se cloróticas e translúcidas. As plantas apresentam também deformação foliar e redução no crescimento. Caso sejam infectadas nos primeiros estágios de crescimento, além de drástica redução no crescimento, as plantas chegam a morrer (SANCHES et al., 2007; PAVAN et al., 2008; MORENO; FERERES, 2012). A doença ocorre em regiões subtropicais, principalmente em temperaturas inferiores a 20°C. No Brasil os sintomas têm sido observados principalmente no inverno (PAVAN et al., 2008; KOBORI et al., 2011).

Estudos têm mostrado que, frequentemente, existem dois vírus associados a essa doença: o *Lettuce big-vein associated varicosavirus* (LBVaV), pertence ao reino *Riboviria*, filo *Negarnaviricota*, subfilo *Haploviricota*, classe *Milneviricetes*, ordem *Serpentovirales*, família *Aspiviridae*, espécie tipo do gênero *Varicosavirus* e o *Mirafiori lettuce big-vein ophiiovirus* (MLBVV) pertencente ao reino *Riboviria*, filo *Negarnaviricota*, subfilo *Haploviricota*, classe *Monjiviricetes*, ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, gênero *Varicosavirus*. O LBVaV possui genoma bipartido de RNA fita simples senso negativo (ssRNA-), não envelopado, de partículas flexuosas em forma de bastonetes com cerca de 320 a 360 nm e 18 nm de diâmetro. O RNA 1 (6.8 kb) codifica duas proteínas, enquanto o RNA 2 (6.1kb) codifica cinco proteínas (VERBEEK et al., 2013; WALKER et al., 2018). O MLBVV possui partícula filamentosa e flexuosa, não envelopados, com conformação retorcida e comprimento estimado em 760 nm, contendo RNA de fita simples de senso negativo (ssRNA-). O seu genoma apresenta de 11,3 a 12.5 kb dividido em quatro RNAs, que codificam sete proteínas funcionais (GARCÍA et al., 2017).

A transmissão de ambos os vírus ocorre naturalmente pelo fungo de solo *Olpidium virulentus*, conhecido também por *O. brassicae*, pelos zoósporos lançados de esporângios, que aparentemente levam o vírus nos seus protoplastos e o transmitem para raízes saudáveis. O vírus também é transmitido pelos esporos de resistência (oósporos), os quais sobrevivem por anos no solo na ausência de plantas hospedeiras (SANCHES et al., 2007; VERBEEK et al., 2013; LAY et al., 2018).

2.2.4 Tospovirus

A primeira ocorrência mundial da doença virótica denominada “vira-cabeça” ou “spotted wilt” foi observada em tomateiros na Austrália, no início do século 20. Entretanto, o

agente causal permaneceu desconhecido até 1930, quando foi demonstrado que a doença era causada por um vírus denominado *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), que se tornou a espécie tipo do gênero *Tospovirus* (OLIVER; WHITFIELD, 2016). Esse nome é derivado do aspecto da planta infectada, que apresenta o sintoma típico de curvatura do ponteiro para baixo em tomateiros.

As espécies de *Tospovirus* foram reconhecidas como uma grande praga agrícola a partir da década de 1980, não somente pelo seu potencial de causar perdas mais também pelo aparecimento de novas espécies no gênero, chegando a ser associado à perda mundial estimada em mais de US\$ 1 bilhão em 1994 (GOLDBACH; PETERS, 1994). Com base em 10 anos de análise de dados no estado da Geórgia, EUA, entre os anos 1996 a 2006 foram estimados perdas de US \$ 1,4 bilhão para as culturas de amendoim, fumo, tomate e pimenta (RILEY et al, 2011).

Os tospovirus são vírus com genoma tripartido de RNA de fita simples senso negativo, organizados em partículas esféricas de 80 a 120 nm de diâmetro, as quais são envelopadas por uma membrana de glicoproteínas de 5-10 nm que estão inseridas no invólucro de bicamada lipídica de aproximadamente 5 nm de espessura. Os três RNAs genômicos possuem tamanhos variados, denominados RNA L (grande), RNA M (médio) e o RNA S (pequeno) localizados no núcleo da partícula viral, em todos os segmentos do RNA genômico possuem nove nucleotídeos conservados no terminal 3' e complementares ao terminal 5' que confere uma aparência pseudocircular em cada segmento de RNA genômico (KING et al., 2012; OLIVER; WHITFIELD, 2016).

São transmitidos por diversas espécies de tripses (ordem *Thysanoptera*, família *Thripidae* e subfamília *Thripinae*) de maneira circulativa propagativa (WHITFIELD et al., 2015). Atualmente são conhecidas mais de 2000 espécies de tripses, mas apenas 14 espécies foram relatadas como transmissoras dos tospovirus por todos os continentes (PAPPU et al., 2009; RILEY et al., 2011; WANG et al., 2016). No Brasil, cinco espécies foram relatadas como transmissoras de tospovirus, mas a principal espécie responsável pela disseminação nas Américas do Norte e Sul, Austrália, Europa e o Oriente Médio é a espécie *Frankliniella occidentalis* (NAGATA et al., 1999; MONTEIRO, 2001; NAGATA et al., 2000; NAGATA et al., 2004; OLIVER; WHITFIELD, 2016).

Em 2011 o TSWV foi listado na segunda posição entre os 10 vírus mais importantes que afetam as plantas, de acordo com sua relevância econômica e científica. A importância econômica do TSWV resulta da sua distribuição mundial; ampla gama de hospedeiros (mais

de 1000 espécies de plantas), incluindo tomate, pimenta, alface, amendoim, crisântemo e cebola; das perdas significativas resultantes da infecção e a dificuldade em gerenciar os vetores (SCHOLTHOF et al., 2011; LIMA et al., 2016).

No Brasil, TSWV foi relatado pela primeira vez em 1937, afetando plantas de fumo e, no ano seguinte, 23 espécies foram listadas como suscetíveis, dentre elas a alface, que em 1941 teve seu primeiro relato em condições de campo. Entretanto, somente no ano de 1988, surtos epidêmicos da doença na cultura da alface foram relatados, causando perdas estimadas em até 100%, em lavouras no estado de Pernambuco. Posteriormente, em 2004, novas epidemias em São Paulo em condições de cultivo hidropônico ocasionaram prejuízos da ordem de 40%. Existem poucos estudos quantitativos sobre as perdas provocadas pelos tospovirus no campo, porém levantamentos realizados entre os anos de 2011-2015 tem mostrado um aumento significativo da incidência de vira cabeça, não só no campo mais também em cultivos hidropônicos (COSTA; FORSTER, 1938; COSTA; FORSTER, 1941; MORAES et al., 1988; COLARICCIO et al., 2004; COLARICCIO, 2015; LIMA et al., 2016).

Os tospovirus pertencem ao reino *Riboviria*, filo *Negarnaviricota*, subfilo *Polyploviricotina*, classe *Ellioviricetes*, ordem *Bunyavirales*, família *Tospoviridae*, gênero *Orthotospovirus*. Atualmente existem 18 espécies oficialmente reconhecidas no gênero *Tospovirus* (KING et al., 2018; ICTV, 2019), sendo que o critério para reconhecer e oficializar uma nova espécie é baseado na especificidade do vetor, na gama de plantas hospedeiras, nas relações sorológicas da proteína N, e na identidade dessa mesma proteína que deve ser de pelo menos 90% de aminoácidos para ser considerada uma mesma espécie (KING et al., 2012).

No Brasil, foram relatadas seis espécies de tospovirus: *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot tospovirus* (TCSV), *Groundnut ringspot tospovirus* (GRSV), *Zucchini lethal chlorosis tospovirus* (ZLCV), *Iris yellow spot tospovirus* (IYSV) e *Chrysanthemum stem necrosis orthotospovirus* (CSNV). Porém, em alface somente as espécies TSWV, GRSV e TCSV têm sido encontradas e descritas na literatura, sendo o TCSV a principal espécie no estado de São Paulo, enquanto GRSV prevaleceu no Vale do Rio São Francisco, no Estado de Pernambuco (POZZER et al., 1999; COLARICCIO et al., 2001; PAVAN et al., 2008; LIMA et al., 2016).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

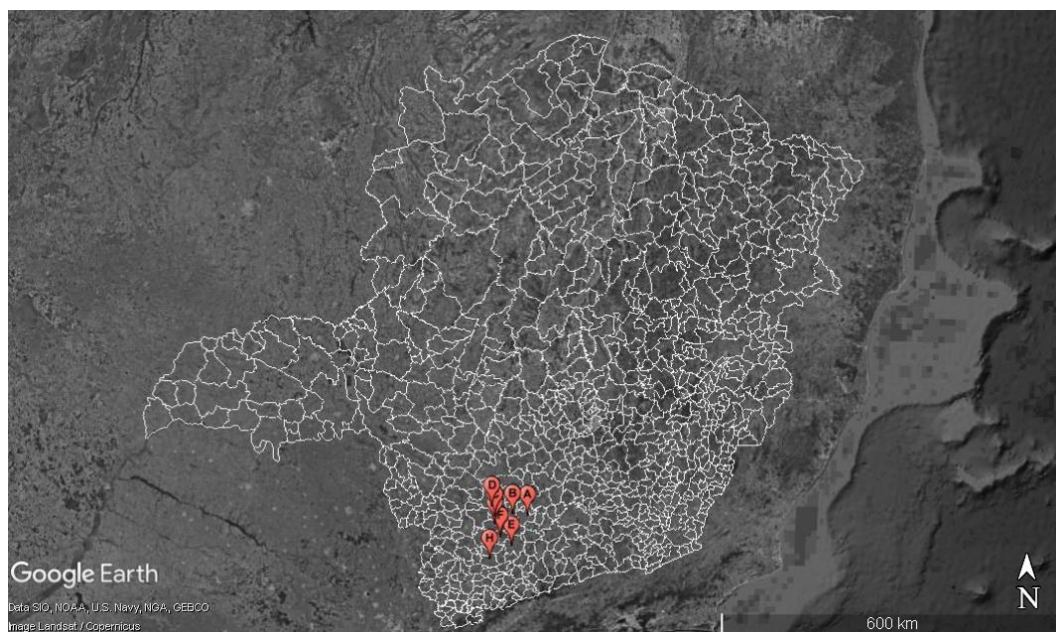
3.1 Local do experimento

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e no laboratório de Virologia Molecular do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.2 Obtenção das plantas e manutenção do inóculo

As plantas de alface com sintomas suspeitos de virose foram coletadas em campos de produção de cidades do sul de Minas Gerais (Figura 1).

Figura 1. Localização das cidades de coleta das amostras de alface no Estado de Minas Gerais.



Legenda: A-Lavras, B-Nepomuceno, C-Santana da Vargem, D-Boa Esperança, E-Três Corações, F-Três Pontas, G-Varginha, H-São Gonçalo do Sapucaí.

3.3 Testes biológicos

O material vegetal coletado foi empregado para multiplicação e confirmação da infecção viral por inoculação mecânica, parte foi utilizada para extração do RNA viral, e o restante foi armazenado em congelador a -80°C.

Na inoculação mecânica os tecidos foliares das amostras foram macerados em solução tampão de fosfato 0,01M, pH 7, contendo sulfito de sódio 0,01M, na proporção de 1g/5mL e inoculados por fricção em folhas de plantas indicadoras jovens (*Lactuca sativa*, *Datura stramonium*, *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana* e *Solanum lycopersicum*), previamente polvilhadas com carborundum (CSi). Todas as plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação e observadas diariamente a visualização de sintomas.

3.3 Testes moleculares

3.3.1 Extração do RNA viral

O RNA total foi extraído de plantas de alface sadias e com sintomas de virose coletados nos campos de produção, pelo método do Trizol (AFGC PROTOCOLS, 2002). As folhas jovens foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e o pó obtido foi ressuspendido na solução extratora Trizol (38% de fenol saturado, 0,8M de tiocianato de guanidina, 0,4M de tiocianato de amônio e 0,1M de acetato de sódio, pH 5 e 5% de glicerol), na proporção de 1g de tecido / 5mL solução. Em seguida, o extrato obtido foi transferido para microtubos e incubados (em banho-maria) por 5 minutos a 60°C. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4°C. O pellet foi descartado e o sobrenadante transferido para novos microtubos, adicionando-se a eles 300µL de clorofórmio. Esses tubos foram agitados em vórtex, deixados à temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4°C. Após a transferência da fase aquosa para novos tubos, foi adicionado ½ volume do sobrenadante coletado, de solução contendo 0,8M de Citrato de Sódio + 1,2M de Cloreto de Sódio e ½ volume de isopropanol. Os tubos foram então agitados cuidadosamente, por inversão, e deixados à temperatura ambiente por 10 minutos, com posterior centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70% gelado (-20°C). O RNA precipitado foi secado a vácuo e ressuspendido em 25µL de água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). O RNA total extraído foi analisado em gel de agarose a 0,7%, contrastado com *Gel Red Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium), antes de ser utilizado nos testes subsequentes.

3.3.4 RT-PCR para diagnose dos vírus

Para a síntese do cDNA foram utilizados 2 µL do RNA total extraído da planta, 0,5 µL do *random primer* ou *oligo d(T)*, 0,5 µL de dNTPs (10 mM) e 4,6 µL de água ultrapura. A mistura foi incubada por 10 minutos a 70°C, após o que, imediatamente transferida para um recipiente com gelo. Em seguida, foram adicionados 2 µL de *buffer* (5X) M-MLV e 0,4 µL da enzima transcriptase reversa M-MLV (Ludwig) e incubada por 60 minutos a 37°C, seguindo de 10 min a 70°C, de acordo com as recomendações do fabricante. Após essa etapa, os microtubos foram mantidos em gelo para posterior uso.

Para o preparo da PCR foram utilizados: 2,5 µL *buffer* (10X), 0,75 µL do MgCl₂, 0,5 µL de dNTPs, 0,75 µL do *primer reverse*, 0,75 µL do *primer forward* (Tabela 1), 1 µL do cDNA, 18,5 µL de água ultrapura tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato) e 0,25 µL da enzima TAQ DNA Polymerase (200U/ µL) (Ludwig). Na reação de PCR foram utilizados os seguintes ciclos: desnaturação inicial a 95° C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de 95° C por 45 segundos, temperatura de anelamento do par de *primers* (Tabela 1) por 1 minuto, 72° C por 1 minuto, e uma extensão final a 72° C por 5 minutos. Para análise dos resultados, o produto da PCR foi analisado em gel de agarose 0,7% contrastado com *Gel Red Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium).

Tabela 1 - Relação dos primers empregados para a diagnose de vírus em alface.

VÍRUS	PRIMER	GENE*	SEQUÊNCIA (5'-3')	PRODUTO	FONTE
Tospovirus	Br65	N	CCCGGATCCTGCAGAGCAATTGTGCA	453 pb	Eiras et al., 2001
	Br60	N	ATCAAGCCTTCTGAAAGTCAT		
TSWV	TSWV722	N	GCTGGAGCTAAGTATAGCAGC	620 pb	Adkins e Rosskopf, 2002
	TSWV723	N	CACAAGGCAAAGACCTTGAG		
GRSV	GRSV-N-v	N	AGAGCTGGAACATGGGTCTG	595 pb	Webster et al., 2011
	GRSV-N-vc	N	GAAAGGTCTAGATCAAACCTGCCAC		
TCSV	TCSV-Nv2	N	CCTAAAGCTTCITTAGTGTATACTTCG	530 pb	Webster et al., 2013
	TCSV-Nvc2	N	CTAACTCAGGCTGGAGAAATCGAG		
TCSV	GLY5-v	G _N G _C	CAGAGTGTGCTTTGAAGTTCCC	166 pb	Webster et al., 2011
	GLY4-vc	G _N G _C	AGCATTCTGTTGTCAGGGCTAC		
CSNV	N5	N	GAGCGACTGCGGAATACTCT	950 pb	Takeshita et al., 2011
	N3	N	GACACACTTAAATCTTTAACACACC		
LeMoV	Lmo3	RdRp	ACATGAGCACTAGTGAGG	300 pb	Jadão et al., 2007
	Lmo4		AGATAGAGCCGCTCGCG		
LMV	LMV 9204F	CP	CAAAGGCAATCACACAG	595 pb	Duarte et al., 2016
	LMV 9798R		TTCTCTTCTGGGTTG		
LBVaV	LBVV-CP1	CP	AAGCTTCCGTACTGTCC	485 pb	Rosales et al., 2004
	LBVV-CP2		CCTTGATACAGTTTTTGACC		
MLBVV	MiLVV-CP3	CP	TTGCAACGTGATGAAACC	743 pb	
	MiLVV-CP4		AAAGAAGAGAAGCCTGTTC		

Legenda: *N- nucleocapsídeo; GNGC- glicoproteína; RdRp- RNA polimerase dependente de RNA; CP- capa proteica. Fonte: Do autor (2019).

3.3.5 Sequenciamento e análise das sequências

Os fragmentos de PCR obtidos foram sequenciados por uma empresa especializada no Brasil. A análise das sequências do gene do nucleocapsídeo foi realizada utilizando o NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e o alinhamento das sequências de nucleotídeos e aminoácidos foi por meio do programa CLUSTAL W2 (versão 1.2.2). As relações filogenéticas foram estudadas utilizando o algoritmo neighbor-joining para nucleotídeos e aminoácidos, empregando bootstrap com 5.000 repetições com o programa MEGA X (KUMAR et al., 2018). As sequências empregadas para comparação com as sequências dos isolados estudados se encontram discriminadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Isolados de tospovirus do GenBank empregados para comparação com as sequências dos isolados estudados.

Acesso	Espécie	País de Origem	Referência
L12048	<i>Groudnut ringspot tospovirus</i> (GRSV)	Brasil	Pang et al., 1993
KY400110	<i>Groudnut ringspot tospovirus</i> (GRSV)	Brasil	Reis et al., 2016
MH686229	<i>Groudnut ringspot tospovirus</i> (GRSV)	Brasil	De Marchi et al., 2018
JX244196	<i>Tomato chlorotic spot tospovirus</i> (TCSV)	Estados Unidos	Londono et al., 2012
KX463274	<i>Tomato chlorotic spot tospovirus</i> (TCSV)	Brasil	De Oliveira et al., 2016
HQ644140	GRSV/TCSV Recombinantes	Estados Unidos	Webster et al., 2011
AF067069	<i>Zucchini lethal chlorosis tospovirus</i> (ZLCV)	Brasil	Bezerra et al., 1998
DQ233474	<i>Iris yellow spot tospovirus</i> (IYSV)	Estados Unidos	Pappu et al., 2006
EF445397	<i>Polygonum ringspot tospovirus</i> (PoIRSV)	Itália	Ciuffo et al., 2008
NC_003843	<i>Watermelon silver mottle tospovirus</i> (WSMoV)	Taiwan	Yeh et al., 1996
NC_003619	<i>Groundnut bud necrosis tospovirus</i> (GBNV)	Estados Unidos	Satyanarayana et al., 1996
EU373752	<i>Watermelon bud necrosis tospovirus</i> (WBNV)	Índia	Kunkaliker et al., 2011
HQ402596	<i>Groundnut yellow spot tospovirus</i> (GYSV)	China	Yin et al., 2010
NC_002051	<i>Tomato spotted wilt tospovirus</i> (TSWV)	Holanda	De Haan et al., 1990
NC_003624	<i>Impatiens necrotic spot tospovirus</i> (INSV)	Holanda	De Haan et al., 1992

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Testes biológicos

Os sintomas apresentados pelas plantas indicadoras inoculados com todas as amostras coletadas, com os respectivos vírus, se encontram discriminados na Tabela 3.

Tabela 3 - Sintomas apresentados pelas plantas indicadoras após a inoculação mecânica com os respectivos vírus.

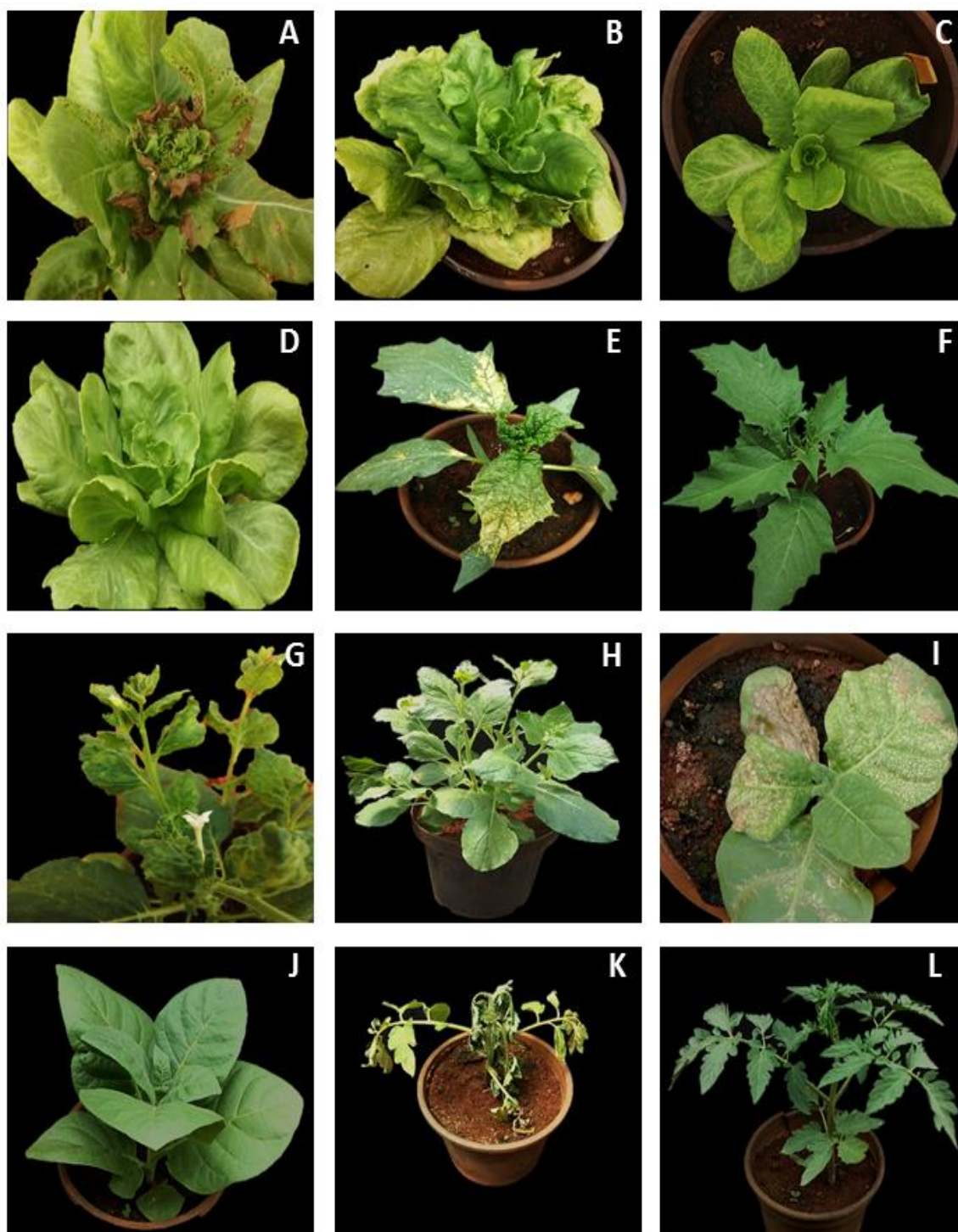
Hospedeira Inoculada	Sintomas Induzidos Pelos Vírus*			
	LMV	LeMoV	TCSV	GRSV
<i>Lactuca sativa</i>	M, Em, En	Mo	PN, PC, Ar, N, Ef	PN, PC, Ar, N, Ef
<i>Chenopodium quinoa</i>	LLC	-	-	-
<i>Datura stramonium</i>	-	-	PC, Er, N	PC, Er, N
<i>Nicotiana benthamiana</i>	-	-	M, Df, Em	M, DF, Em
<i>Nicotiana tabacum</i>	-	-	AN, PC, N	AN, PC, N
<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-	PC, VC, Em, Ar	PC, VC, Em, Ar

Nota: *AN = anéis necróticos; Ar = arroxamento; Df = deformação foliar; Er = enrugamento; Ef = enfezamento; Em = embolhamento; LLC = lesões locais cloróticas; M = mosaico; N = necrose; PC = pontos cloróticos; PN = pontos necróticos; VC = vira cabeça.

Fonte: Do autor (2019).

Em *Lactuca sativa*, os sintomas induzidos pelo LMV se caracterizaram por mosaico, embolhamento e enfezamento, tendo aparecido aproximadamente 10 a 20 dias após a inoculação (Figura 2). Sintomas semelhantes têm sido encontrados por outros autores (DINANT E LOT, 1992; GERMAN-RETANA ET AL., 2008; SOLEIMANI ET AL., 2011). Os sintomas induzidos por LeMoV apareceram na forma de mosqueado e os induzidos pelos tospovirus encontrados, cujas identidades foram posteriormente confirmados pelos testes moleculares, foram pontos cloróticos e/ou pontos necróticos, necroses, redução no crescimento foliar e arroxamento na maioria das plantas de alface (Figura 2). Sintomas semelhantes foram descritas por Webster et al. (2015) em alface inoculadas com os tospovirus TCSV e GRSV na Florida e por Yin et al. (2014) na China.

Figura 2. Sintomas observados em plantas indicadoras após inoculação mecânica em casa de vegetação.



Legenda: A: alface infectadas com tospovirus; B: alface infectada com LMV; C: alface infectada com LeMoV; D: planta de alface sadia; E: *Datura stramonium* infectada com tospovirus; F: planta de *D. stramonium* sadia; G *Nicotiana benthamiana* infectada com tospovirus; H: *N. benthamiana* sadia; I: *Nicotiana tabacum* infectada com tospovirus; J: *N. tabacum* sadia; K: *Solanum lycopersicum* infectado com tospovirus; L: *S. lycopersicum* sadio.

Fonte: Do autor (2019).

4.2 Testes de diagnose

Os resultados obtidos nos testes de diagnose realizados se encontram discriminados na Tabela 4. De modo geral, nota-se que grande parte das amostras coletadas não foi positiva quando analisadas por RT-PCR com os primers empregados para a diagnose dos vírus LMV, LeMoV, GRSV e TCSV. Isso provavelmente ocorreu porque os sintomas observados nas plantas de alface estabelecidas em condições de campo nem sempre são prontamente reconhecíveis. Muitos outros sintomas, principalmente de necrose, causados por bactérias e fungos podem ser confundidos com sintomas causados por vírus, principalmente pelos tospovirus.

Tabela 4 - Resultados das análises de diagnose realizados nas amostras de alface coletadas no campo.

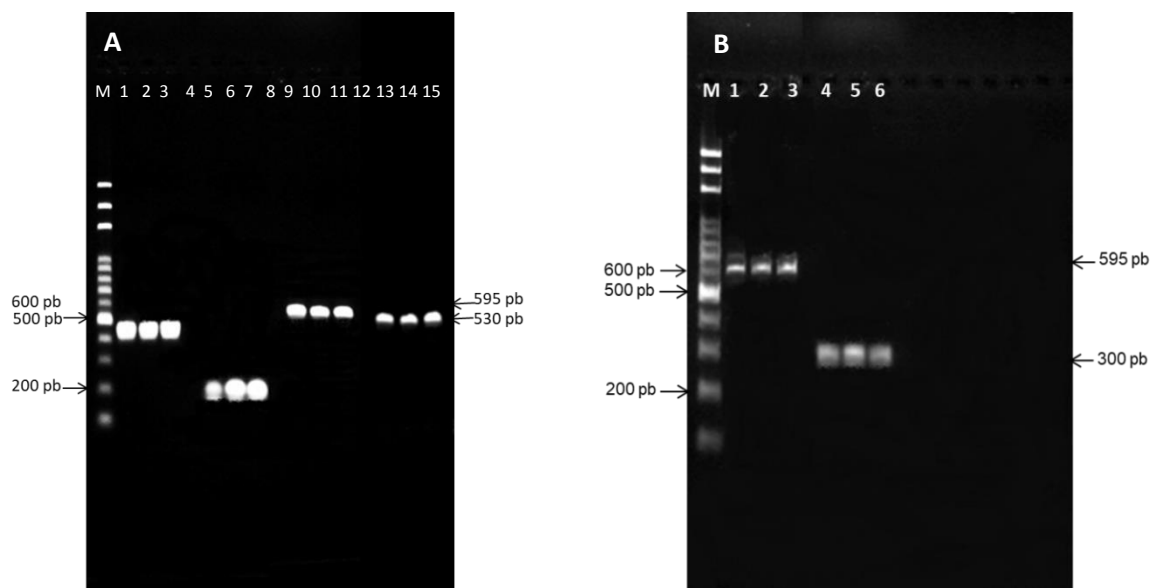
Local da Coleta	Nº Total de Amostras	LMV		LeMoV		GRSV		TCSV		Negativas
		+	%	+	%	+	%	+	%	%
Três Corações	23			2	8,7	3	13,0			78,3
Santana da Vargem	30	8	26,7			2	6,7	14	46,7	19,9
Boa Esperança	20	1	5							95,6
Três Pontas	13							5	38,5	61,5
Nepomuceno	6									
São Gonçalo do Sapucaí	3	1	33,3					1	33,3	33,4
Varginha	13	2	16,7					3	23,1	62,2
Lavras	5	1	20			1	20			60,0

Note: + número de amostras positivas.

Fonte: Do autor (2019).

Considerando-se que geralmente o produtor faz roging das plantas com alterações morfológicas na lavoura, determinar a incidência de vírus nos campos de alface é praticamente impossível. Isso porque as plantas com sintomas que permanecem no campo não indicam a incidência real nas lavouras, pois essa desconsideraria as plantas eliminadas. Dessa forma, esse trabalho pode apenas registrar a ocorrência dos vírus nas diferentes áreas amostradas. Todas as amostras consideradas positivas induziram sintomas nas plantas inoculadas mecanicamente e permitiram a amplificação de bandas robustas no RT-PCR, conforme podem ser vistas na Figura 3.

Figura 3. Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos da PCR para o gênero *Tospovirus*, espécies do gênero, LMV E LeMoV.



Legenda: A- M: Marcador 100 pb; 1-3: amplificação dos primers Br60/65; 5-7: amplificação dos primers Glyco 5v/4vc; 9-11: amplificação dos primers GRSV Nv/Nvc; 13-15: amplificação dos primers TCSV Nv2/Nvc2. B- M: marcador 100 pb; 1 a 3: amplificação dos primers LMV 9204F/9798R; 4 a 6: amplificação dos primers Lmo3/ Lmo4.

Fonte: Do autor (2019).

O LMV foi detectado em cinco dos oito municípios amostrados, indicando que a sua presença no campo continua sendo marcante. Isso provavelmente se deve ao fato de que a maioria das cultivares de alfaces plantadas ou são suscetíveis ou tolerantes, de modo que o potencial de inóculo permanece alto, pois as plantas tolerantes não mostram sintomas e se constituem numa disseminadora silenciosa do vírus no campo (PEREIRA et al., 2012; LUCAS, 2014; SALA; COSTA, 2016).

O LeMoV apareceu apenas em Três Corações, indicando que a sua presença é bem restrita em relação aos demais vírus. Essa baixa incidência tem sido registrada também por outros autores, em outras partes do país (MARINHO E KITAJIMA, 1986; FIRMINO et al., 2008; OLIVEIRA, 2016).

Os tospovírus não foram encontrados nas regiões de Nepomuceno e de Lavras. Entretanto, isso não deve significar que estão ausentes nessas regiões, mas apenas que as lavouras de alface visitadas foram poucas, sem plantio comercial representativo. Isso porque em anos anteriores os produtores procuraram os laboratórios do DFP-UFLA com diversas

amostras de tospovírus, que não foram naquela data diagnosticados por testes moleculares específicos, mas apenas por primers degenerados para o gênero (dados não publicados).

Nas lavouras em que os tospovirus foram encontrados, nota-se que o GRSV foi o de menor ocorrência, detectados apenas em Três Corações, Santana da Vargem e Lavras enquanto que o TCSV foi encontrado em metade das áreas amostradas. Esse vírus, que não constituía problema para as lavouras de alface na década passada, começou a ser considerado um problema que, segundo comunicação pessoal dos produtores, levou ao abandono de determinadas áreas pelo alto potencial de inóculo na região. Ao contrário do encontrado por Pacífico (2017), não foram encontradas infecções mistas com esses dois vírus.

No levantamento realizado por Pacífico (2017) em lavouras de alface, observou-se que 15,4% das doenças encontradas eram viróticas, e que os tospovirus predominavam entre elas, tendo sido detectadas em todas as propriedades visitadas. Entretanto não foram encontrados sintomas de LMV no campo.

Considerando as mudanças climáticas nos últimos anos, com a elevação da temperatura, o aumento das perdas em campos de produção foram veiculadas nos meios de comunicação e mudanças no cenário epidemiológico das viroses que afetam a alface tem sido relatada (KORBORI et al., 2011). Inspecionando a cultura da alface no estado de São Paulo, no ano de 2014 encontrou 53% de infecção por tospovirus, seguido por LMV (9%) e LeMoV (5%); E no ano de 2015 a incidência de tospovirus subiu para 80% e não foram encontrados os outros dois vírus (OLIVEIRA, 2016).

Em anos recentes, a diagnose do GRSV vinha sendo feita por meio dos primers denominados de Glyco4vc e Glyco5v descritos por Webster et al. (2010). Entretanto, Tantiwanich et al. (2018) comprovaram que esses pares de primers anelavam com ambas as espécies de Tospovirus, a TCSV e a GRSV, pois têm como alvo o segmento M do genoma viral, onde ocorreram recombinações genômicas, conforme constatado por Webster et al. (2015). Dessa forma, o fragmento de 166 pb pode ser amplificado nessas duas espécies, não permitindo a diferenciação entre elas. Dessa forma, trabalhos publicados anteriormente com a utilização desse par de primer, provavelmente mostraram resultados equivocados quando se referiram à incidência dessas espécies.

No início desse trabalho esses dois primers foram empregados para a diagnose do GRSV. Por isso, após a publicação de Tantiwanich et al. (2018), novos primers foram adquiridos e, de fato, algumas amostras que tinham sido diagnosticadas como GRSV, foram

posteriormente identificadas como TCSV. Por isso, uma amostra amplificada para cada uma das espécies foi sequenciada e analisada geneticamente.

As identidades de nucleotídeos do isolado brasileiro Seq 1 com os outros isolados de TCSV do GenBank ficou acima de 90%. O isolado HQ644140, que é recombinante entre o TCSV e GRSV foi de 81%, mostrando que esse vírus deve ter uma maior quantidade de nucleotídeos do GRSV do que do TCSV (Tabela 5). O isolado Seq 2, quando comparado com os outros isolados do GenBank também apresentou uma alta identidade, entre 98 e 100% (Tabela 6).

As identidades dos aminoácidos estão discriminadas nas Tabelas 7 e Tabela 8. Novamente a identidade de aminoácidos entre o Seq 1 e os isolados de TCSV do GENBank ficou entre 95 e 100% (Tabela 7), enquanto que o Seq 2, quando comparado com os demais isolados de GRSV, apresentou identidades entre 99 e 100% (Tabela 8).

Tabela 5 - Identidade de nucleotídeos entre a sequência Seq1 (TCSV) com acessos do GenBank dos membros do gênero *Tospovirus*.

Nº	Isolados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	DQ233474	-	52	53	31	31	33	35	37	39	38	38	35	37	37
2	NC_003619		-	80	33	31	36	30	32	31	34	34	35	35	35
3	EU373752			-	36	32	36	32	32	34	37	37	35	36	36
4	NC_003624				-	34	34	39	38	39	39	39	37	38	38
5	EF445397					-	58	40	44	46	49	50	46	50	51
6	NC_003843						-	45	46	48	49	50	46	49	49
7	HQ402596							-	44	46	50	50	44	48	48
8	AF067069								-	59	64	63	61	63	62
9	NC_002051									-	74	74	68	72	72
10	MH686229										-	98	81	85	85
11	HQ644140											-	81	85	85
12	Seq1												-	96	95
13	KX463274													-	100
14	JX244196														-

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 6 - Identidade de nucleotídeos entre a sequência Seq2 (GRSV) com acessos do GenBank dos membros do gênero *Tospovirus*.

Nº	Isolados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	EU373752	-	56	33	36	36	36	40	38	38	38	38	33	36	34
2	DQ233474		-	33	33	32	31	32	33	33	33	33	32	37	36
3	HQ402596			-	39	36	40	39	40	40	40	40	41	40	40
4	NC003624				-	39	42	40	40	40	40	40	39	41	42
5	AF067069					-	61	64	64	64	64	64	46	52	54
6	NC002051						-	71	74	75	75	74	48	49	48
7	KX463274							-	83	83	83	83	52	51	50
8	L12048								-	99	99	98	50	52	55
9	Seq2									-	100	99	49	52	55
10	KY400110										-	99	49	52	55
11	MH686229											-	49	52	54
12	EF445397												-	55	55
13	NC003843													-	85
14	NC003619														-

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 7 - Identidade entre os aminoácidos do Seq1 (TCSV) e os isolados de tospovirus provenientes do GenBank.

Nº	Isolados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	HQ402596	-	29	22	24	24	22	18	22	22	26	26	24	26	28
2	NC_003624		-	62	63	66	66	57	63	63	32	32	29	31	33
3	AF067069			-	74	80	79	73	78	78	33	35	35	31	40
4	NC_002051				-	80	80	73	78	78	29	31	31	35	38
5	MH686229					-	99	83	89	89	32	35	33	35	41
6	HQ644140						-	82	87	87	30	34	32	35	40
7	Seq1							-	95	95	26	27	28	28	34
8	KX463274								-	100	28	29	30	33	39
9	JX244196									-	28	29	30	33	39
10	NC_003843										-	90	84	43	45
11	NC_003619											-	84	42	45
12	EU373752												-	41	44
13	DQ233474													-	64
14	EF445397														-

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 8 - Identidade entre os aminoácidos do Seq 2 (GRSV) e os isolados de tospovirus provenientes do GenBank.

Nº	Isolados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	HQ402596	-	24	18	20	20	19	19	19	19	21	24	23	21	21
2	NC_003624		-	58	61	56	58	60	60	60	28	30	29	30	31
3	AF067069			-	74	79	80	81	81	81	30	30	32	30	38
4	NC_002051				-	79	80	81	81	81	30	30	30	36	37
5	KX463274					-	87	88	88	88	27	27	27	31	37
6	L12048						-	99	99	99	30	30	31	36	40
7	Seq2							-	100	100	30	30	32	35	40
8	MH686229								-	100	30	30	32	35	40
9	KY400110									-	30	30	31	35	40
10	EU373752										-	83	82	37	40
11	NC_003843											-	89	40	43
12	NC_003619												-	38	41
13	DQ233474													-	58
14	EF445397														-

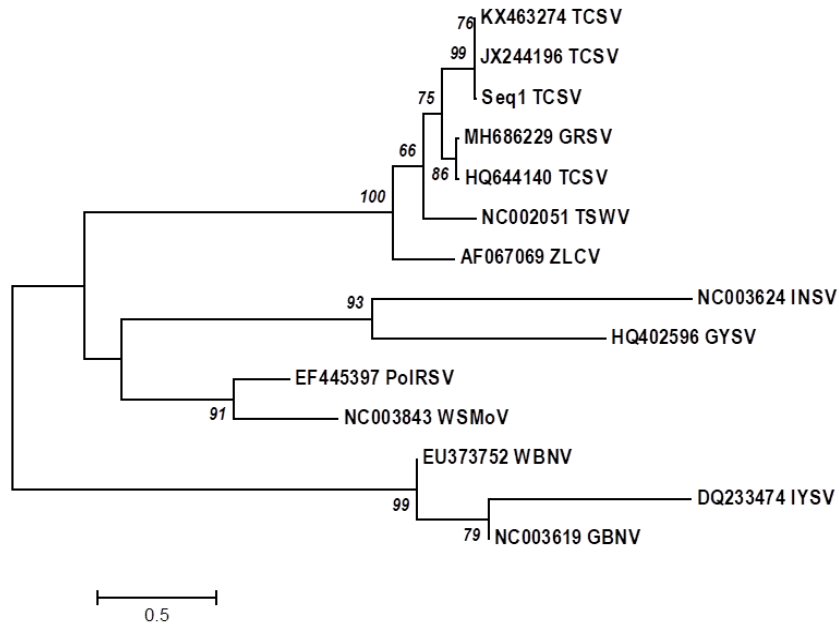
Fonte: Do autor (2019).

Considerando-se que o critério para classificação das espécies é a identidade mínima de nucleotídeos que deve ser de 90%, fica comprovada a identidade dos dois isolados sequenciados.

As árvores construídas com base na sequência de nucleotídeos e na sequência de aminoácidos (Figuras 4 e 5) mostraram um claro agrupamento entre isolados da mesma espécie. Exceção foi vista no isolado HQ644140, recombinante, que se agrupou com o isolado de GRSV.

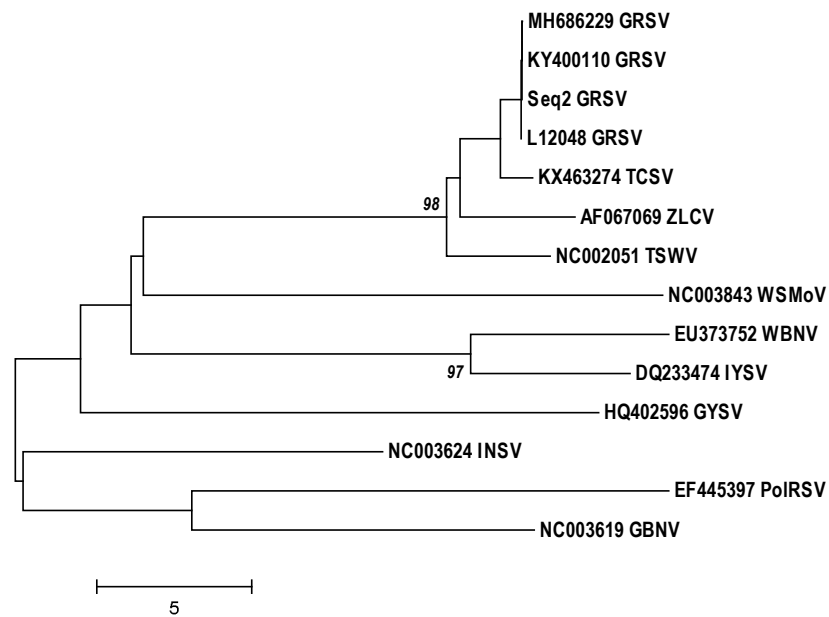
As árvores filogenéticas construídas com base na sequência de aminoácidos (Figuras 6 e 7) apresentaram a mesma tendência das construídas com base na sequência de nucleotídeos, mostrando que os isolados brasileiros agruparam com as espécies TCSV e GRSV.

Figura 4. Cladograma construído com base na sequência de nucleotídeos do Seq1 (TCSV) e de outras espécies de Tospovirus disponíveis no GenBank. Os valores foram obtidos pelo MEGA X e teste neighbor-joining, com 5000 repetições.



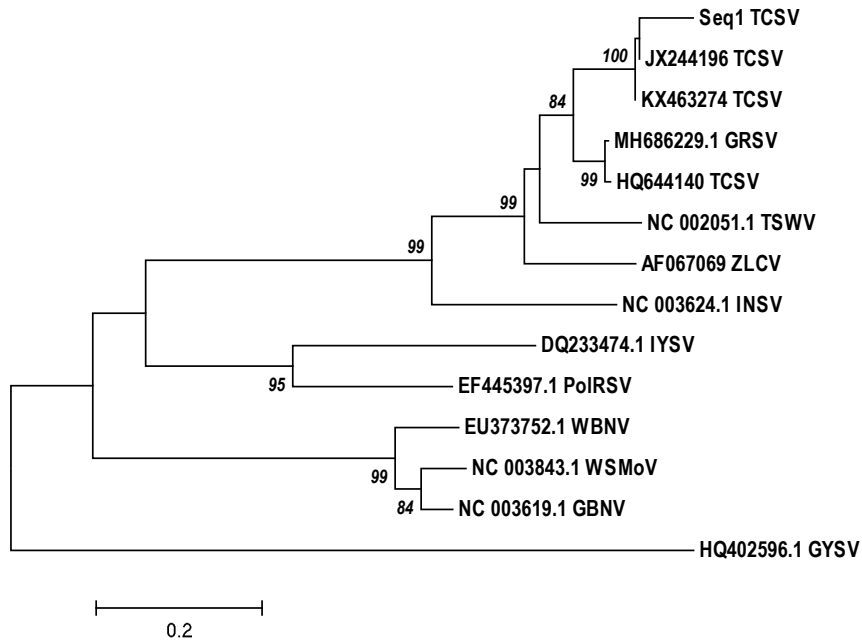
Fonte: Do autor (2019).

Figura 5. Cladograma construído com base na sequência de nucleotídeos do Seq2 (GRSV) e de outras espécies de Tospovirus disponíveis no GenBank. Os valores foram obtidos pelo MEGA X e teste neighbor-joining, com 5000 repetições.



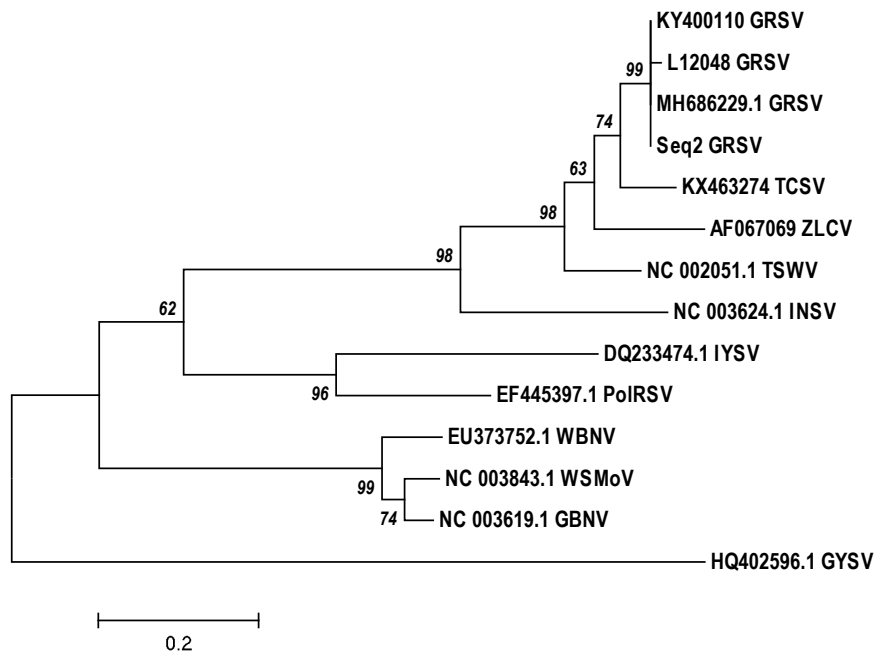
Fonte: Do autor (2019).

Figura 6. Cladograma construído com base na sequência de aminoácidos do Seq1 (TCSV) e de outras espécies de Tospovirus disponíveis no GenBank. Os valores foram obtidos pelo MEGA X e teste neighbor-joining, com 5000 repetições.



Fonte: Do autor (2019).

Figura 7. Cladograma construído com base na sequência de aminoácidos do Seq2 (GRSV) e de outras espécies de Tospovirus disponíveis no GenBank. Os valores foram obtidos pelo MEGA X e teste neighbor-joining, com 5000 repetições.



Fonte: Do autor (2019).

5. CONCLUSÃO

Os vírus encontrados no campo foram o LMV, LeMoV e os Tospovirus TCSV e GRSV, com maior ocorrência do LMV e do TCSV.

Os primers Glyco4vc e Glyco5v não discriminaram entre as espécies TCSV e GRSV.

A caracterização molecular dos isolados brasileiros, além de confirmarem a identidade das espécies de Tospovirus TCSV e GRSV, mostrou uma clara separação das diferentes espécies de Tospovirus na árvore filogenética.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADKINS, S.; ROSSKOPF, E. N. Key West nightshade, a new experimental host for plant viruses. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 1310-1314. 2002.

AFGC PROTOCOLS. Disponível em:

<<https://www.arabidopsis.org/portals/masc/AFGC/RevisedAFGC/site2RnaL.htm#isolation>>. Acesso em: nov/ 2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS. **O mercado de folhosas: números e tendências**. 2016. Disponível em: <http://www.abcsem.com.br/upload/arquivos/O_mercado_de_folhosas__Numeros_e_Tendencias_-_Steven.pdf>. Acesso em: 18 fev. 2018.

AZEVEDO FILHO, J. A. **A cultura da alface**. In: Boletim Técnico Aspectos Fitossanitários da Cultura da Alface. São Paulo: Instituto biológico, 2017.

BEZERRA, I.C.; NAGATA, T.; POZZER, L.; PRINS, M.; KORMELINK, R.; DE AVILA, A.C.; RESENDE, R.O. Chrysanthemum stem necrosis virus and zucchini lethal chlorosis virus, two new species and serogroups in the Tospovirus genus. *Molecular Biology*, EMBRAPA Hortaliças, KM 09 - BR 060 - Bsb/Anapolis, Brasília, DF 70359-970, Brasil. 1998.

BRAULT, V.; UZEST, M.; MONSION, B.; JACQUOT, E.; BLANC, S. Aphids as transport devices for plant viruses. **C. R. Biologies**. 333: 524–538. 2010.

CARVALHO FILHO, J. S.; GOMES, L. A.; COSTA-CARVALHO, R. R. Incidência de galhas de *Meloidogyne incognita* raça 1 em progênie de F2: 3 (‘Salinas 88’x ‘Colorado’) de alface. **Scientia Plena**. v. 8, n. 2, 2012.

COLARICCIO, A; CHAVES, A.L.R. **Aspectos Fitossanitários da Cultura da Alface**. Boletim Técnico. São Paulo: Instituto Biológico, 2017.

COLARICCIO, A. Vira-cabeça pode causar prejuízos de 100% à alface. *Revista campo e negócios*. Disponível em: <<http://www.revistacampoenegocios.com.br/vira-cabeça-podem-causar-prejuizos-de-100-a-alface-2/>>. Acesso em: 02/2018. 2015.

COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; CHAVES, A. L. R.; HARAKAVA, R.; CHAGAS, C.M. *Tomato chlorotic spot virus* in Hydroponically-Grown Lettuce in São Paulo state, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**. 29:307-311. 2004.

COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; CHAVES, A. L. R.; CHAGAS, C. M. Diversidade de tospovírus em diferentes regiões produtoras de olerícolas do estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**. Vol. 27. Nº 2. 2001.

COSTA, A. S.; FORSTER, R. A transmissão mecânica de “vira-cabeça”, por fricção, com suco. **Revista de Agricultura**. v. 13, n. 5-6. 1938.

COSTA, A. S.; FORSTER, R. Identidade do vírus de vira-cabeça e sua inclusão no grupo do vírus de “spotted wilt.” **Bragantia**. Boletim tecnico do Instituto Agrônômico do estado de São Paulo. Campinas. 1:491-516. 1941.

COSTA, C. P.; SALA, F. C. A evolução da alfacultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 118-120, 2005.

CIUFFO, M.; TAVELLA, L.; PACIFICO, D.; MASENGA, V.; TURINA, M. A member of a new Tospovirus species isolated in Italy from wild buckwheat (*Polygonum convolvulus*). **Arch Virol**. 153:2059–2068. 2008.

DE HAAN, P.; DE ÁVILA, A.C.; KORMELINK, R.; WESTERBROEK, A.; GIELEN, J.J.J.; PETERS, D.; GOLDBACH, R. The nucleotide sequence of the S RNA of *Impatiens* necrotic spot virus, a novel tospovirus. **Federation of European Biochemical Societies**. Volume 306, number 1, 27-32. 1992.

DE HAAN, P.; WAGEMAKERS, L.; PETERS, D.; GOLDBACH, R. The S segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. **Journal of General Virology**. 71:1001-1007. 1990.

DE MARCHI, B. R.; SPADOTTI, D. M. A.; OLIVEIRA, M. L.; SANCHES, M. M.; KRAUSE-SAKATE, R.; PAVAN, M. A. Levantamento revela a predominância do *Lettuce mottle virus* em três regiões produtoras de alface no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, n. 3, p. 245-247, 2012.

DE MARCHI, B.R.; BELLO, V.H.; WATANABE, L.F.M.; DA SILVA, F.B.; MÜLLER, C.; PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R. Characterization and complete genome sequence of groundnut ringspot orthotospovirus in soybean in Brazil. **Journal of Plant Pathology**. Note disease. 2018.

DE OLIVEIRA, A. S.; ALMEIDA, M. M. S.; MELO, F.L.; RESENDE, R. O. Virus-derived genomes from cultivated vegetables in Dominican Republic. Cell Biology, University of Brasilia, Campus Darcy Ribeiro, Brasilia, DF 70910-900, Brazil. 2016.

DINANT, S.; LOT, H. Lettuce mosaic virus. **Plant Pathology**. 41, 528-542. 1992.

DUARTE, P. S. G.; FIGUEIRA, A. R.; GALVINO-COSTA, S. B. F.; SOTERO, A. J.; POMPEU, D. C.; FERNANDES, J. R. C.; CARVALHO, A. L. A. Establishment of a bank of positive controls for diagnosis of quarantine viruses and viroids in Brazil through PCR and RT-PCR. **Crop Protection**. 86: 31- 41. 2016.

EIRAS, M.; RESENDE, R. O.; MISSIAGGIA, A. A.; DE ÁVILA, A. C. RT-PCR and Dot Blot hybridization methods for a universal detection of tospoviruses. **Fitopatologia Brasileira** 26:170-175. 2001.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3ed. Viçosa: Editora UFV. 2008. 421p.

FIRMINO, A. C., KRAUSE-SAKATE, R., PAVAN, M.A., SILVA, N., HANAI, S.M.,

ANBO, R.H., NIETZSCHE, T., LE GALL, O. Prevalence of Lettuce mosaic virus - common strain on three lettuce producing areas from São Paulo State. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v.34, n.2, p.161-163, 2008.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO Statistical Yearbook**. FAOSTAT, 2017. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e.pdf>> Acesso em : 3 jan. 2019.

GARCÍA, M.L., DAL BÓ, E., DA GRAÇA, J.V., GAGO-ZACHERT, S., HAMMOND, J., MORENO, P., NATSUAKI, T., PALLÁS, V., NAVARRO, J.A., REYES, C.A., LUNA, G.R., SASAYA, T., TZANETAKIS, I.E., VAIRA, A.M., VERBEEK, M., and ICTV Report Consortium, 2017, ICTV Virus Taxonomy Profile: *Ophioviridae*, **Journal of General Virology**, 98: 1161–1162.

GERMAN-RETANA, S.; WALTER, J.; LE GALL, O. Lettuce mosaic virus: from pathogen diversity to host interactors. **Molecular Plant Pathology**. 9 (2) , 127–136. 2008.

GOLDBACH, R.; PETERS, D. Possible causes of the emergence of tospovirus diseases. **Semin. Virol.** 5, 113–120. 1994.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. Virus Taxonomy: 2018 Release. Disponível em: < https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=20180178>. Acesso em: 21 jan. 2019.

JADÃO, A. S.; KRAUSE-SAKATE, R.; LIBERTI, D.; PAVAN, M. A.; ECHER, M. M.; SVANELLA-DUMAS, L.; ZERBINI, F. M.; CANDRESSE, T.; LE GALL, O. Further characterization of two sequiviruses infecting lettuce and development of specific RT-PCR primers. **Arch Virol**. 152: 999–1007. 2007.

JADÃO, A. S. **Caracterização parcial e desenvolvimento de oligonucleotídeos específicos para detecção de *Sequivirus* infectando alface**. 2004. 126 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

JAGGER IC, CHANDLER N. Big vein, a disease of lettuce. **Phytopathology** 24, 1253–6. 1934.

KING, A. M. G.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. London: Elsevier/Academic Press. 2012.

KING, A. M. Q et al. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**. 163:2601–2631. 2018.

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

- KORBORI, R. F.; BRUNELLI, K. R.; GIORIA, R. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças da alface no Brasil. In: Impactos das mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2011. 356 p.
- KRAUSE-SAKATE, R.; FIRMINO, A. C.; JADÃO, A. S.; PAVAN, M. A.; SILVA, N.; HANAI, S. M.; ANBO, R. H.; NIETZSCHE, T. Ocorrência generalizada do Lettuce mottle virus em três regiões produtoras de alface do Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.1, p.88-89, 2008.
- KRAMER, M.; ORLANDO, A.; SILBERSCHMIDT, K.M. Studies on a serious virus disease responsible for the dying-off of our Lettuce crops. **O biológico**, São Paulo, v.11, n. 5, p. 121-134, 1945.
- KUNKALIKAR, S.R.; POOJARI, S.; ARUN, B.M.; RAJAGOPALAN, P.A; CHEN, T.; YEH, S.; NAIDU, R.A.; ZEHR, U.B.; RAVI, K.S. Importance and genetic diversity of vegetable-infecting tospoviruses in India. **Phytopathology**. 101:367-376. 2011. 2011.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Mol. Biol. Evol.** 35(6):1547–1549. 2018.
- LAY, C.; HAMEL, C.; ST-ARNAUD, M. Taxonomy and pathogenicity of *Olpidium brassicae* and its allied species. **Fungal Biology**. 122: 837-846. 2018.
- LIMA, M. F.; FILHO, M. M.; BOITEUX, L. S.; SUINAGA, F. A. **Doença vira-cabeça em alface: sintomatologia, transmissão, epidemiologia e medidas de controle**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2016. 16 p. (Circular Técnica, 153).
- LIM, S.; ZHAO, F.; YOO, R.H.; IGORI, D.; LEE, S.; LIM, H.; MOON, J.S. Characteristics of a Lettuce mosaic virus Isolate Infecting Lettuce in Korea. **Plant Pathol. J.** 30(2): 183-187. 2014.
- LONDONO, A., CAPOBIANCO, H., ZHANG, S. AND POLSTON, J.E. First record of Tomato chlorotic spot virus in the USA. University of Florida, 1453 Fifield Hall Hull Rd, Gainesville, FL 32611, USA. 2012.
- LUCAS, M. A. **Sequenciamento genômico parcial de isolado atípico do *Lettuce mosaic virus* (LMV)**. 2014. 72 p. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- MARINHO, V.L.; KITAJIMA, E.W.; LIN, M.T. & COSTA, C.L. Caracterização do vírus do mosqueado da alface. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.7, n.3, p.543, 1982.
- MARINHO VLA, KITAJIMA EW. Virus do mosqueado da alface – um vírus isométrico transmitido por afídeo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 11, p. 923–936, 1986.
- MONTEIRO, C. R et al. Espécies de *Frankliniella* (Thysanoptera: Thripidae) de importância agrícola no Brasil. **Neotropical Entomology**. 1:65-72. 2001.

MORAIS, G. J.; WANDERLEY, L. J.; COSTA, A. S. Surto de vira-cabeça na cultura da alface em Pernambuco. **Hort. Bras.** 6(2), novembro 1988.

MORENO, A.; FERERES, A. Virus Diseases in Lettuce in the Mediterranean Basin. In: *Advances in Virus Research*, 84: 247-288. 2012.

NAGATA, T et al. Tissue tropism related to vector competence of *Frankliniella occidentalis* for tomato spotted wilt *Tospovirus*. **Journal of General Virology**. 80:507-15. 1999.

NAGATA T et al. Transmission of Chrysanthemum Stem Necrosis Virus, Recently Discovered Tospovirus, by Two Thrips Species. **Journal of Phytopathology** 148:123-125. 2000.

NAGATA T et al. The competence of four thrips species to transmit and replicate four tospoviruses. **Plant Pathology**. 53:136-140. 2004.

OLIVEIRA, M. L. **Caracterização biológica e molecular do *Lettuce mottle vírus* (LeMoV) em alface e sequenciamento de nova geração de vírus em jasmim estrelado**. 2016. 95 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2016.

OLIVER, J. E.; WHITFIELD, A. E. The Genus *Tospovirus*: Emerging Bunyaviruses that Threaten Food Security. **Annu. Rev. Virol.** 2016. 3:101-24.

PACIFICO, M. G. **Levantamento de doenças da alface americana no sul do estado de Minas Gerais**. 2017. 63 p. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

PANG, S.Z; SLIGHTOM, J. L.; GONSALVES, D. The biological properties of a distinct tospovirus and sequence analysis of its S RNA. **Phytopathology**, v. 83, n. 7, p. 728-733, 1993.

PAPPU, H.R et al. Sequence diversity of the nucleoprotein gene of iris yellow spot virus (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*) isolates from the western region of the United States. **Arch Virol**. 151: 1015–1023. 2006.

PAPPU, H. R et al. Global status of *Tospovirus* epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. **Virus Research**. 141(2):219-36. 2009.

PAVAN, M. A et al. Virus diseases of lettuce in Brazil. **Plant Viruses**. 2 (1). 35 – 41. 2008.

PEREIRA, L. S et al. Indexação do Lettuce mosaic virus em sementes e plântulas de genótipos de alface. **Revista Brasileira de Sementes**. Vol. 34, nº 4 p. 628 - 635, 2012.

POZZER, L et al. Characterization of a *Tospovirus* isolate of *Iris yellow spot virus* associated with a disease in onion fields in Brazil. **Plant Disease** 83:345-350. 1999.

REIS, L.N.A., ANDRADE, G.P., PIO-RIBEIRO, G., GODOY, I.J., SANTOS, J.F., RESENDE, R.O., BLAWID, R., MELO, F.L. AND PEREIRA-CARVALHO, R.C.

Universidade de Brasília. Campus Universitario Darcy Ribeiro, Brasília, DF 70910-900, Brasil. 2016.

RESENDE, F. V et al. **Cultivo de alface em sistema orgânico de produção**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2007. 16 p. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 56).

RILEY, D. G et al. Thrips Vectors of Tospoviruses. **J. Integ. Pest Mngmt.** 1(2): 2011; DOI: 10.1603/IPM10020.

ROSALES, M.; SEPULVEDA, P.; BRUNA, A. First Report of *Lettuce big vein virus* and *Mirafiori lettuce virus* in Chile. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 1286. 2004.

SALA, F.C.; COSTA C.P. Melhoramento de alface. In: NICK, C.; BOREM, A. (Org.). **Melhoramento de Hortaliças**. Viçosa: UFV, 2016. p. 95-126.

SALA, F. C.; COSTA, C. P. Retrospectiva e tendência da alficultura brasileira. **Horticultura Brasileira** 30: 187-194. 2012.

SANCHES, M. M. **Caracterização molecular e biológica do *Lettuce big-vein associated virus* e *Mirafiori lettuce big-vein virus* e estudo da ocorrência em relação a época e sintoma em plantas de alface no estado de São Paulo**. 2006. 56 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. 2006.

SANCHES, M. M.; KRAUSE-SAKATE, R.; ZERBINI, F. M.; ROSALES, M.; LE GALL, O.; PAVAN, M.A. Frequência de *Lettuce big-vein associated virus* e *Mirafiori lettuce big-vein virus* em plantas de alface no Estado de São Paulo e transmissão através de extrato vegetal e solo. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.4, p.378-382, 2007.

SATYANARAYANA, T.; MITCHELL, S.E.; REDDY, D.V.R.; BROWN, S.; KRESOVICH, S.; JARRET, R.; NAIDU, R.A.; DEMSKI, J.W. Peanut bud necrosis tospovirus S RNA: complete nucleotide sequence, genome organization and homology to other tospoviruses. **Arch Virol.** 141:85-98. 1996.

SCHOLTHOF, K. G et al. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology** . 12(9), 938–954. 2011.

SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA. **Alface americana: crocância verde conquista mercado**. SNA News, 2015. Disponível em: < <http://sna.agr.br/crocancia-verde-conquista-mercado/>>. Acesso em: 6 jan. 2019.

SOLEIMANI, P.; MOSAHEBI, G.; HABIBI, M.K. Identification of some viruses causing mosaic on lettuce and characterization of *Lettuce mosaic virus* from Tehran Province in Iran. **African Journal of Agricultural Research**. vol. 6(13), pag. 3029-3035, 2011.

TAKESHITA, M.; NAGAI, N.; OKUDA, M.; MATSUURA, S.; OKUDA, S.; FURUYA, N.; TSUCHIYA, K. Molecular and biological characterization of Chrysanthemum stem necrosis virus isolates from distinct regions in Japan. **Eur J Plant Pathol.** 131:9–14. 2011.

- TANTIWANICH, Y.; CHIEMSOMBAT, P.; NAIDU, R. A.; ADKINS, S. Integrating local lesion assays with conventional RT-PCR for detection of interspecies tospovirus reassortants and mixed tospovirus infections. **Plant Disease**. 102(4): 715-719. 2018.
- THOMPSON, J.R., DASGUPTA, I., FUCHS, M., IWANAMI, T., KARASEV, A.V., PETRZIK, K., SANFAÇON, H., TZANETAKIS, I. E., VAN DER VLUGT, R., WETZEL, T., YOSHIKAWA, N., and ICTV Report Consortium. 2017, ICTV Virus Taxonomy Profile: *Secoviridae*, **Journal of General Virology**, 98, 529–531.
- TURNBULL-ROSS, A. D.; MAYO, M. A.; REAVY, B.; MURANT, A. F. Sequence analysis of the parsnip yellow fleck virus polyprotein: evidence of affinities with picornaviruses. **Journal of General Virology**. 74, 555-561. 1993.
- VERBEEK, M.; DULLEMANS, A. M.; VAN BEKKUM, P. J.; VAN DER VLUGT, R. A. A. Evidence for Lettuce big-vein associated virus as the causal agent of a syndrome of necrotic rings and spots in lettuce. **Plant Pathology**. 62, 444–451. 2013.
- VRIES, I. M. Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. **Genetic Resources and Crop Evolution** 44: 165–174, 1997.
- WALKER, P.J., BLASDELL, K.R., CALISHER, C.H., DIETZGEN, R.G., KONDO, H., KURATH, G., LONGDON, B., STONE, D.M., TESH, R.B., TORDO, N., VASILAKIS, N., WHITFIELD, A.E., and ICTV Report Consortium. 2018, ICTV Virus Taxonomy Profile: *Rhabdoviridae*, **Journal of General Virology**, 99:447–448. 2018.
- WANG, Z et al. Two newly recorded genera and new species of Thripinae from China (Thysanoptera: Thripidae). **Zoological Systematics** 41(3):253-260. 2016.
- WEBSTER, C.G. et al. Emergence of *Groundnut ringspot virus* and *Tomato chlorotic spot virus* in Vegetables in Florida and the Southeastern United States. **Virology**. 2015.
- WEBSTER, C. G. et al. First report of *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) in tomato, pepper and jimsonweed in Puerto Rico. **Plant Health Progress**, Saint Paul, v. 10, p. 1094. 2013.
- WEBSTER, C.G. et al. A natural M RNA reassortant arising from two species of plant- and insect-infecting bunyaviruses and comparison of its sequence and biological properties to parental species. **Virology**. 413 216–225. 2011.
- WEBSTER, C. G. et al. First report of *Groundnut ringspot virus* infecting tomato in south Florida. **Plant Health Progress**, Saint Paul, v. 10, p.1094. 2010.
- WHITFIELD, A. E.; FALK, B. W.; ROTENBERG, D. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. **Virology**. 479-480. Pag 278–289. 2015.
- WYLIE, S.J et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Potyviridae*. **Journal of General Virology**, 98: 352–354. 2018
- YEH, S.D.; SUN, I.J.; HO, H.M.; CHANG, T.F. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of the S RNA of watermelon silver mottle virus. **Acta Horticulturae**. 431, 244-260. 1996.

YIN, Y.Y.; DONG, J.H.; ZHANG, Z.K. Complete sequence of Groundnut yellow spot virus isolate SP-C S RNA. Institute of Biotechnology and Germplasm Resources, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Xueyun Road No.9, Kunming, Yunnan 650223, China. 2010.