



KELLY MARQUES PEREIRA

**ESTUDO BIOLÓGICO E MOLECULAR DE DOIS ISOLADOS
DE *Lettuce mosaic virus* (LMV)**

LAVRAS - MG

2018

KELLY MARQUES PEREIRA

ESTUDO BIOLÓGICO E MOLECULAR DE DOIS ISOLADOS DE

Lettuce mosaic virus (LMV)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Antonia dos Reis Figueira

Orientadora

Dra. Priscilla de Sousa Geraldino Duarte

Coorientadora

LAVRAS - MG

2018

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

Pereira, Kelly Marques.

Estudo biológico e molecular de dois isolados de *Lettuce mosaic virus* (LMV) / Kelly Marques Pereira. - 2017.

50 p. : il.

Orientadora: Antônia dos Reis Figueira.

Coorientadora: Priscilla de Sousa Geraldino Duarte.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Alfaca. 2. LMV. 3. DAS-ELISA. I. Figueira, Antônia dos Reis. II. Duarte, Priscilla de Sousa Geraldino. III. Título.

KELLY MARQUES PEREIRA

ESTUDO BIOLÓGICO E MOLECULAR DE DOIS ISOLADOS de
Lettuce mosaic virus (LMV)

BIOLOGICAL AND MOLECULAR STUDY OF TWO ISOLATES OF
Lettuce mosaic virus (LMV)

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

APROVADA em 18 de outubro de 2017.

Prof. Dr. Sára Maria Clalfoun de Souza EPAMIG

Prof. Dr. César Augusto Brasil Pinto UFLA

Profa. Dra. Antonia dos Reis Figueira
Orientadora

Dra. Priscilla de Sousa Geraldino Duarte
Coorientadora

LAVRAS - MG

2018

A minha mãe, Ione pelo amor incondicional .

Ao meu pai, Rodolfo que sempre sonhou em ter um filho estudando na UFLA

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fortalecer diariamente na busca dos meus sonhos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade de realizar o Mestrado.

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

À Profa. Dra. Antônia dos Reis Figueira, primeiramente pela oportunidade de trabalhar no Centro de Indexação de Vírus e pela orientação durante o mestrado, pela confiança e por todos os ensinamentos durante essa caminhada.

À Dra. Priscilla de Sousa Geraldino Duarte, pela coorientação, por todas as experiências compartilhadas, pela paciência, dedicação e companhia nas horas de trabalho e nos momentos de descontração.

À minha mãe Ione, pela companhia nas noites em claro, por acreditar em mim quando eu achava que não iria suportar e pelo amor incondicional. Aos meus irmãos, Rodolfo Junior e Kátia, pelo apoio e às irmãs de coração Jaqueline e Carolina por serem sempre presentes em minha vida.

Ao meu pai Rodolfo, que partiu muito cedo, deixando o exemplo de conquistas com o trabalho digno e sempre desejou ter um filho estudando na UFLA, instituição que ele prestou diversos serviços.

Ao Diego, pelo amor, paciência, companheirismo e meu parceiro de laboratório nos finais de semana.

A todos que, de forma direta e indireta, contribuíram para que eu chegasse até aqui e concretizasse esse sonho.

Aos colegas de laboratório, Dani, Mirelly, Gaby, Sérgio, Andrés, aos estagiários e às meninas da faxina, meus sinceros agradecimentos por todos os momentos compartilhados.

MUITO OBRIGADA!!!

RESUMO

O *Lettuce mosaic virus* (LMV) é considerado um dos vírus de maior importância na cultura da alface, pois além de causar perdas consideráveis na cultura, é transmitido por sementes e por afídeos. Em condições naturais, podem ocorrer diversas variantes genéticas do LMV, como a estirpe que causa o fechamento de cabeça em alface cv. Regina 579, que tem sido estudada no DFP/UFLA, denominado LMV cf. Neste trabalho, foi estudado o efeito dessa estirpe, em comparação com outra estirpe, denominado LMV AF198, em 12 cultivares de alface: Quatro Estações, Grand Rapids, Rubete, Everglades, Salinas 88, Winslow, Colorado, Regina, Raider Plus, Balsamo, Luiza e Grandes Lagos. As cultivares de alface foram inoculadas mecanicamente com os dois isolados virais, foram mantidas repetições como controle. As plantas foram monitoradas visualmente, para avaliação dos sintomas e, a partir do 14º dia após inoculação, foram testadas, semanalmente, pelo teste sorológico DAS-ELISA para acompanhar o desenvolvimento da infecção. As cultivares que não foram positivas para o DAS-ELISA e as que apresentaram sintomas diferentes entre as estirpes foram submetidas à extração de RNA e ao RT-PCR. Simultaneamente, foram desenhados primers específicos para amplificação das proteínas P3 e 6K2, uma vez que em trabalhos anteriores, sugeriu-se um estudo dessas proteínas, ou seja, as mesmas candidatas à indução do sintoma atípico do LMV cf. Dentre os sintomas observados, as cultivares em que se apresentaram o fechamento da cabeça quando inoculadas com LMV Cf, foram, Regina 579 e Quatro Estações. Na estirpe LMV cf, as cvs. Rubete, Everglades, Salinas 88 e Luíza apresentaram resistência, com resultado negativo no DAS-ELISA, as demais cvs. apresentaram concentração de partículas virais e foram positivas. Na estirpe LMV AF198, somente as cvs. Everglades e Luíza mantiveram a resistência, apresentando resultado negativo; dentre as cvs. que apresentaram resultado positivo destaca-se a Salinas 88, que, embora não tenha apresentado sintomas, foi detectada concentração de partículas virais com resultado positivo no DAS-ELISA, mesmo resistente. No RT-PCR todas as cvs. analisadas foram positivas. Foi concluído que existe diferença entre as duas estirpes, as quais podem ser observadas nos sintomas induzidos nas cvs. e nos resultados obtidos pelo DAS-ELISA e RT-PCR. As proteínas 6K2 dos dois isolados foram expressas em plantas transgênicas, não tendo havido diferenças entre elas, sugere-se o estudo das demais proteínas. Esse estudo traz informações importantes na relação desse patógeno com a planta hospedeira e os resultados obtidos colaboram com os estudos de melhoramento de cultivares de alface resistente às diversas estirpes do LMV.

Palavras-chave: Alface. LMV. DAS-ELISA.

ABSTRACT

Lettuce mosaic virus (LMV), transmitted by seeds and aphids, is considered one of the most important viruses in lettuce crop, given that it causes considerable losses in the crop. Several genetic variants of LMV can occur under natural conditions, such as the strain that causes head closure in cv. Regina 579, which has been studied at the Department of Phytopathology (DFP) of the Universidade Federal de Lavras (UFLA), denominated LMV cf. In this work, the effect of this strain over 12 lettuce cultivars was compared to that of another strain, LMV AF198, using the following cultivars: Quatro Estações, Grand Rapids, Rubete, Everglades, Salinas 88, Winslow, Colorado, Regina, Raider Plus, Balsamo, Luiza and Great Lakes. The lettuce cultivars were mechanically inoculated with the two viral isolates, maintaining a few replicates as control. The plants were visually monitored for symptom assessment and, from the 14th day after inoculation, were weekly tested using the DAS-ELISA serological test to monitor infection development. The cultures with negative DAS-ELISA results, and those presenting different symptoms between the strains, were submitted to RNA extraction and RT-PCR. Simultaneously, specific primers were designed to amplify the P3 and 6K2 proteins. In previous studies, it has been suggested that these proteins be studied, as they are candidates for the induction of the atypical LMV cf. symptom. Among the symptoms observed, the cultivars presenting head closure when inoculated with MRL cf. were Regina 579 and Quatro Estações. In the LMV cf. strain, cvs. Rubete, Everglades, Salinas 88 and Luíza presented resistance, with negative DAS-ELISA results. The remaining cvs. Presented viral particles concentration, and were positive. In strain LMV AF198, only cvs. Everglades and Luíza maintained resistance, presenting negative result. Among the cvs. that showed positive results, Salinas 88 was highlighted given that, despite the lack of symptoms, presented viral particles concentration, with a positive DAS-ELISA result, even while resistant. When using RT-PCR, all cvs. analyzed were positive. In conclusion, there was difference between the two strains, which can be observed in the symptoms induced in cvs. and with the results obtained by DAS-ELISA and RT-PCR. The 6K2 proteins of both isolates were expressed in transgenic plants, with no differences between them, suggesting the study of the other proteins. This study provides important information on the relation between this pathogen and the host plant, and the results obtained contribute to the breeding studies of lettuce cultivars resistant to various LMV strains.

Keywords: Lettuce. LMV. DAS-ELISA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Expressão dos genes de <i>Lettuce mosaic virus</i> (LMV).....	15
Figura 2 -	Sintomas apresentados pelas 12 cultivares de alface, inoculadas com os dois isolados de LMV no período de inverno.	28
Figura 3 -	Cultivares do tipo lisa e crespa inoculadas com LMV cf.	29
Figura 4 -	Média das absorbâncias obtidas no teste DAS-ELISA em 12 cultivares inoculadas com os isolados LMV AF198 e LMV cf no período do verão.	30
Figura 5 -	Média das absorbâncias obtidas no teste DAS-ELISA em 12 cultivares inoculadas com os isolados LMV AF198 e LMV cf no período do inverno.....	31
Figura 6 -	Deteção do <i>Lettuce mosaic vírus</i> (LMV) por RT-PCR.....	33
Figura 7 -	Análise eletroforética das bandas amplificadas por RT-PCR em amostras de alface, inoculadas com o <i>Lettuce mosaic vírus</i> (LMVcf), submetidas a 3 números diferentes de ciclo.....	34
Figura 8 -	Análise eletroforética das bandas amplificadas por RT-PCR, em amostras de alface inoculadas com o <i>Lettuce mosaic vírus</i> (LMV AF198) submetidas a 3 números diferentes de ciclo.	35
Figura 9 -	Dendrograma construído com base na sequência de nucleotídeos (A) e na sequência de aminoácidos (B) do genoma completo do isolados de LMVcf. Os valores foram obtidos pelo programa MEGA e teste Neighbor-Joining, com 3.000 repetições.	37
Figura 10 -	Dendrograma construído com base na sequência de nucleotídeos (A) e aminoácidos (B) da NIa PRO do isolado LMVcf. Os valores foram obtidos pelo programa MEGA e teste Neighbor-Joining, com 3.000 repetições.	39
Figura 11 -	Dendrograma construído com base na sequência de nucleotídeos (A) e aminoácidos (B) da NIB de isolados de LMV. Os valores foram obtidos pelo programa MEGA e teste Neighbor-Joining, com 2.000 repetições.....	41
Figura 12 -	(A) Análise eletroforética da reação em cadeia da Polimerase (PCR) dos produtos de amplificação dos genes do LMV e LMV Cf com seus respectivos tamanhos. 1. Marcador 100pb, 2. LMV, 3. LMV Cf, 4. Plasmídeo controle (pdonor 221). (B) Construções gênicas. Análise eletroforética do DNA plasmidial extraído do clone de entrada onde foram clonados os genes do LMV e LMV Cf 1. Marcador 1Kb, 2. Plasmídeo controle (PDONR 221), 3. LMV, 4. LMV Cf. (C) Construções gênicas. Análise eletroforética do DNA plasmidial extraído do clone de expressão onde foram subclonados os genes do LMV e LMV Cf. 1. Marcador 1Kb, 2. Plasmídeo controle (PSITE 2 CA). 3. LMV. 4. LMV Cf.....	42

Figura 13 - Micrografias utilizando microscópio confocal da 6K2 do LMVcf e LMVAF198 fusionadas ao GFP no C-terminal e expressadas por agroinfiltração em folhas de *N. benthamiana* expressando RFP fusinadas a histona 2b.43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados para completar o genoma do LMV Cf:	22
Tabela 2 - Sequência de primers desenhados, ligados aos seus adaptadores para clonagem.....	23
Tabela 3- Sintomas induzidos pelos dois isolados de LMV estudados em 12 cultivares de alface, em dois períodos do ano.	27
Tabela 4 - Porcentagem de identidade entre as sequências de nucleotídeos (diagonal acima) e de aminoácidos (diagonal abaixo) entre o genoma completo do LMVcf e os isolados de LMV disponíveis no GenBank.	36
Tabela 5 - Porcentagem de identidade entre as sequências de nucleotídeos (diagonal acima) e de aminoácidos (diagonal abaixo) da NIa PRO do LMVcf e os isolados de LMV disponíveis no GenBank.	38
Tabela 6 - Porcentagem de identidade entre as sequências de nucleotídeos (diagonal acima) e aminoácidos (diagonal abaixo) da NIB do LMVcf e de isolados de LMV.	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	A Alface	14
2.2	<i>Lettuce mosaic virus</i> (LMV)	14
2.3	Sintomatologia e controle	16
2.4	Diagnose do <i>Lettuce mosaic virus</i>	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	Obtenção das plantas e manutenção do inóculo	19
3.2	Inoculação de duas estirpes do LMV em diferentes cultivares de alface	19
3.3	Extração do RNA viral	20
3.4	RT-PCR para diagnose do LMV nas cultivares de alface inoculadas	20
3.5	Amplificação e sequenciamento complementar do LMV-Cf	21
3.6	Clonagem da proteína 6K2 em vetor de expressão para estudos de localização da proteína em plantas de <i>N.benthamiana</i>	22
3.6.1	Reação de recombinação da Bp clonase - Clonagem em vetor pDONR221	23
3.6.2	Reação de recombinação da LR clonase - Fusão das proteínas de interesse ao GFP	24
3.6.3	Expressão de proteínas em plantas transgênicas	24
3.6.4	Procedimentos para agroinfiltração	25
3.7	Microscopia confocal de varredura a laser	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1	Sintomas observados nas cultivares de alface	26
4.2	DAS-ELISA	30
4.3	RT-PCR	32
4.4	Amplificação e sequenciamento complementar do LMV- Cf	36
4.5	Expressão das proteínas 6K2 dos dois isolados em plantas fluorescentes	41
5	CONCLUSÕES	45
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

A Alface (*Lactuca sativa* L.), folhosa pertencente à família *Asteracea*, é a hortaliça mais consumida no Brasil e no mundo, é a terceira hortaliça com maior volume de produção, ficando atrás somente da melancia e do tomate (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2016). Essa grande aceitação nas mesas brasileiras está associada à abundante variabilidade de cultivares registrada, uma vez que existe uma grande procura por produtos diversificados. Nos últimos anos, as cultivares de alface consumidas no país têm aumentado, as mais conhecidas são as lisas e as crespas (HENZ; SUINAGA, 2009).

Por ser um produto consumido *in natura* e de grande importância para o agronegócio brasileiro, é fundamental que se mantenha a sua qualidade, que pode ser afetada por diversos patógenos, como fungos, bactérias, nematoides e vírus, o que leva a perdas significativas de produção e qualidade. Dentre os patógenos mais importantes, os vírus se destacam por serem de difícil controle, rápida disseminação e indução de sintomas que inviabilizam a comercialização da planta. Além disso, o método de cultivo escalonado da alface, na qual existe uma sobreposição de ciclo das plantas, geralmente propicia a disseminação do vírus da cultura em final de ciclo para a cultura mais nova, com conseqüente introdução do inóculo numa fase em que a planta se encontra mais suscetível.

Apesar de a alface ser suscetível a diversas espécies de vírus, no Brasil o *Lettuce mosaic virus* (LMV) é considerado um dos patógenos mais importantes e de ampla ocorrência nas lavouras, está, portanto, associado a um grande número de relatos de perdas no campo (PAVAN et al., 2008). Esse vírus, descrito pela primeira vez na Flórida por Jagger (1921), pertence ao gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*, e, atualmente, é encontrado em todas as áreas em que se cultiva a alface no mundo. A sua transmissão no campo é feita por afídeos, de modo não persistente ou estiletar, o *Myzus persicae* é uma das espécies vetoras mais importantes. Pode também ser transmitido pelas sementes, em uma taxa que varia de 1,9 a 18% (DINANT; LOT, 1992; KRAUSE-SAKATE et al., 2002; GERMAN-RETANA; WALTER; LE GALL, 2008) o que faz com que ele possa ser disseminado a grandes distâncias via material propagativo, aumentando a sua importância como patógeno. Os sintomas variam com a espécie e a idade em que a planta for infectada, com o isolado viral e com as condições ambientais, são basicamente constituídos por mosaicos com diferentes severidades, deformação foliar e subdesenvolvimento da planta. Em alguns casos podem até ocorrer necroses severas.

O LMV pode apresentar diferentes variantes genéticas, denominados de patótipos ou estirpes (ADAMS et al., 2017). As estirpes de LMV já descritas foram classificadas em três principais grupos: LMV-Yar, LMV-Greek e LMV-RoW, dos quais o último contém o maior número de isolados e está agrupado nos dois subgrupos LMV - Most e LMV Common (FIRMINO et al., 2008; LIM et al., 2014). Entretanto, existe uma grande variabilidade nos isolados virais, de modo que o surgimento de novas estirpes tem sido um evento recorrente.

Um isolado de LMV coletado no Rio de Janeiro, denominado de LMV-Cf, por induzir um fechamento na cabeça de plantas da alface cv. Regina 579, que normalmente não apresentam essa característica quando infectadas com outros isolados desse vírus, foi descrito pela primeira vez por Oliveira et al. (2005). Desde então, este tem sido alvo de estudos no DFP/UFLA, de modo que mais de 90% de seu genoma tinha sido sequenciado por Lucas (2014). A análise desse fragmento genômico disponível revelou que a identidade de nucleotídeos e de aminoácidos das proteínas P3 e 6K2, com as de outros isolados de LMV disponíveis no GenBank foram, em média, menores do que o usualmente observado entre isolados desse vírus, indicando uma possível relação entre essa diversidade e os sintomas atípicos induzidos por este isolado. Assim, concluir o sequenciamento e investigar o papel dessas proteínas, na infecção viral, poderia trazer informações importantes sobre se essa divergência se encontra localizada, apenas, nas Proteínas P3 e 6K2 e se ela estaria ligada de algum modo à indução dos sintomas.

O objetivo deste trabalho foi continuar as investigações anteriores, terminando o sequenciamento dos 10% restantes do genoma do LMV-Cf e investigando as propriedades biológicas desse isolado, em comparação com as de um isolado típico do LMV, caracterizadas pela sintomatologia induzida por eles e a sua concentração em diferentes cultivares de alface. Paralelamente, as proteínas 6K2 dos dois isolados foram amplificadas, clonadas em vetor de expressão, fusionadas à proteína fluorescente GFP, e, posteriormente, expressadas em linhagens de plantas transgênicas de *Nicotiana benthamiana* para investigar se as diferenças de identidade observadas entre as proteínas do LMV-Cf e do LMV-AF198 seriam refletidas na localização dessas proteínas no ambiente celular *in vivo*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A Alface

A alface (*Lactuca sativa* L.), proveniente do mediterrâneo, é a folhosa mais consumida *in natura* e amplamente cultivada em todo o mundo (FILGUEIRA, 2003). Atualmente, após sucessivas seleções artificiais, numerosas cultivares mais produtivas, adaptadas a diferentes condições climáticas e de melhor qualidade para consumo já foram registradas. As cultivares são agrupadas por sua morfologia foliar e tipo de cabeça em cinco grupos diferentes: Repolhuda Lisa: as folhas são lisas, com textura macia e delicada a cabeça é típica e compacta; Repolhuda Crespa ou Americana: como o nome diz suas folhas são crespas, textura crocante e cabeça grande e compacta; Solta Lisa: O próprio nome já caracteriza o aspecto da folha e não ocorre formação de cabeça compacta; Solta Crespa: Embora as folhas sejam crespas a textura é macia, porém consistente, pode ter coloração verde ou roxa e não existe formação de cabeça e a Tipo Romana: com folhas alongadas, firmes e cabeça em forma de cone por suas folhas alongadas (HENZ; SUINAGA, 2009). Embora as cultivares mais conhecidas seja a lisa e a crespa, nos últimos anos, houve um aumento na procura por cultivares diferentes com textura foliar mais crocante e maior durabilidade nas prateleiras, como é o caso da americana. Um dos fatores do aumento de sua demanda está relacionado com o crescimento no ramo alimentício de *fast foods* (SALA; COSTA, 2012). Em 2016, a quantidade de alface ofertada no CEASAMINAS, na grande BH, foi superior a setenta mil quilos (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2017).

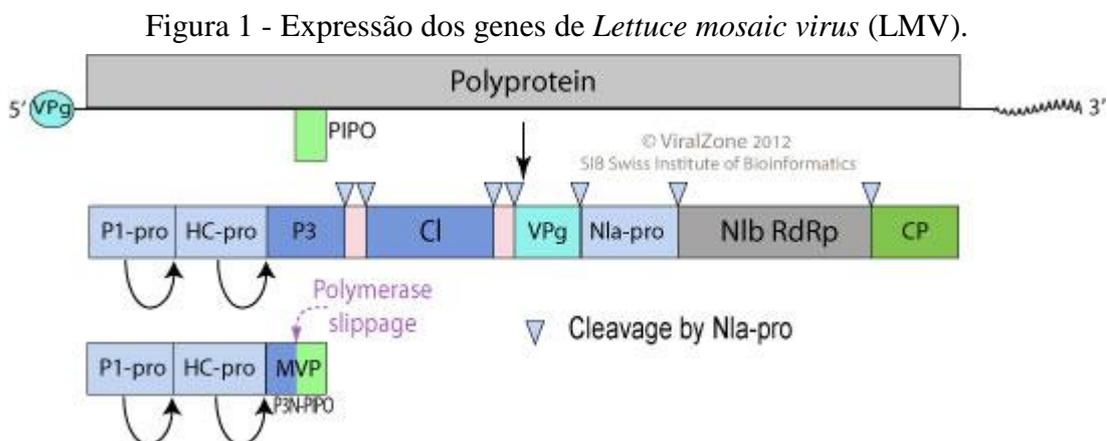
Além de sua importância na alimentação, principalmente por ser de baixa caloria e auxiliar na manutenção de uma dieta saudável, estudos relatam o seu alto potencial como uma cultura farmacêutica, contendo propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, antidepressiva e anticoagulante (ISMAIL; MIRZA, 2015).

2.2 *Lettuce mosaic virus* (LMV)

O LMV é pertencente ao gênero *Potyvirus*, da família *Potyviridae*, e sua estrutura é composta por partículas filamentosas e flexuosas, medindo, aproximadamente, 750nm de comprimento por 15nm de diâmetro. A maioria dos isolados possui 10.080 nucleotídeos, contendo a proteína codificada pelo vírus, denominada VPG, na extremidade 5' e cauda Poli A na extremidade 3'. Seu genoma é de RNA de fita simples, senso positiva. Possui uma

ampla gama de hospedeiros, abrangendo mais de 120 espécies vegetais, pertencentes a 17 famílias e 60 gêneros. Sua disseminação se dá através de sementes e por afídeos, de modo não persistente. Apesar de baixa, a taxa de transmissão pelas sementes é considerada de grande importância na sua introdução e disseminação no campo. Devido a sua variabilidade, o LMV foi classificado em três grupos: grupo I: cujos isolados infectam somente cultivares suscetíveis; grupo II: com isolados que infectam cultivar Ithaca, que carrega um gene de resistência *Mol*²; e grupo III: com isolados que induzem sintomas mais severos em todas as cultivares (ADAMS et al., 2017; GERMAN-RETANA; WALTER; LE GALL, 2008; KUROZAWA; PAVAN, 1997). Dentro desses grupos os isolados recebem classificações que colaboram na identificação das diferentes estirpes, de acordo com Pink, Lot e Johnson (1992) foram classificados os seguintes isolados, LMV-E, LMV-F, LMV-W, LMV-G e LMV-YAR. Já Krause-Sakate et al. (2002) classificou os isolados por diferentes localidades: isolados da Grécia: Gr1, Gr4, Gr5, Gr5b, Gr6, Gr8, Gr10, Gr17, Gr18, GrB, GrB7, GrC1, GrC4, GrD2, GrD5, GrE4, GrE6, GrH1, GrH7, GrI1, GrI4, GrJ1, GrJ5 e Knossos; Tunísia: Tn2, Tn3, Tn4, Tn9, Tn13, Tn19b, Tn19r, Tn21.4, TnC, TnD, TnOL2, TnOL3, TnRL1e TnSaR; França: 0, 1, 13, 9, Aud, Fr1, Fr2, Fr3 e Fr4; Brasil: AF198, AF199, Br6 e Br21; Egito: Eg1, Eg6 e Eg7; Austrália: A231 e A435; Senegal: Sn1 e Sn2; Dinamarca: Dg; Japão: DK; Espanha: E; República do Iêmen Yar e China Yajang.

O LMV, assim como os demais *Potyvirus*, codifica apenas uma poliproteína, que é, posteriormente, clivada dando origem às proteínas P1, HC-PRO, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa-PRO, NIb e CP (FIGURA 1).



Fonte: adaptado de Potyviridae... (2016).

Além de ter mais de uma função, essas proteínas podem também interagir umas com as outras, para exercer funções diversas. A P1 é a proteína menos conservada, e possui o tamanho bem variado. Possui atividade de protease e desempenha um importante papel na replicação do vírus, juntamente às proteínas HC-PRO, P3, CI, 6K2, VPg e NIa-PRO. A HC-PRO também atua na supressão do silenciamento gênico pós-transcricional, transmissão por vetores e no movimento célula-a-célula. A P3, além de atuar na replicação do vírus, pode atuar na seleção da gama de hospedeiros e na indução dos sintomas. A 6K1 não possui uma função conhecida. CI e NIB são as maiores responsáveis pela replicação, a CI tem atividades de helicase e a NIB de polimerase. A 6K2 mantém o complexo replicativo que fica ancorado na membrana plasmática do hospedeiro, enquanto que a VPg desempenha diversos papéis no ciclo de infecção viral, essencial para a replicação e tradução do vírus. A NIa-PRO é responsável pela clivagem da maioria dos sítios de clivagem da poliproteína. A CP é a proteína do capsídeo, tem papel na transmissão por afídeos, no movimento célula-a-célula e na amplificação do genoma. Estudos recentes têm mostrado a presença de uma nova ORF denominada PIPO, é expressa pela fusão P3-PIPO através de um frameshifting ribossomal, essa proteína tem importante papel no movimento intercelular do vírus (ADAMS et al., 2017; ZERBINI, 1998).

2.3 Sintomatologia e controle

Os sintomas característicos do LMV em cultivares de alface são mosaico, mosqueado, nanismo, clareamento das nervuras, distorção e amarelecimento foliar, pregueado da margem foliar, necrose e má formação da cabeça. A severidade dos sintomas pode variar de acordo com a cultivar, idade da planta infectada e estirpe de vírus. Quando se trata de grande descoloração das nervuras e grave necrose, esses sintomas podem levar a planta infectada à morte (GERMAN-RETANA; WALTER; LE GALL, 2008; MOU; RYDER, 2010).

Bos, Huijberts e Cuperus (1994) inocularam diversas estirpes de LMV em plantas hospedeiras, foi possível notar que os sintomas são bastante variáveis. Quando inoculados em *Chenopodium amaranticolor*, os sintomas foram lesões cloróticas locais, onde houve amarelecimento das folhas, posteriormente foi observado anel necrótico verde escuro e má formação foliar, na *Nicotiana benthamiana*, os sintomas foram mosaico e anéis cloróticos. Em *Cichorium intybus*, os sintomas foram tardios, com grandes anéis cloróticos, mosaico e

atrofia da planta. Em *Pisum sativum*, houve lesões necróticas locais, mosaico e redução do crescimento.

Dentre os meios de controle da doença, quando se trata de plantas cultivadas fora de ambiente protegido, está o preventivo, que seria um controle antes do plantio, a certificação de sementes livre de vírus e um período sem o plantio da alface para evitar, assim, o aumento do potencial de inóculo (BARRIÈRE et al., 2014; WISLER; DUFFUS, 2000).

A resistência genética é um dos principais meios de controle, são dois alelos recessivos, denominados de mol¹ e mol², associados à tolerância ou resistência em cultivares de alface. Quando ocorre tolerância, as plantas não apresentam sintomas, porém o vírus se replica nelas, já no caso de resistência as plantas não adquirem o acúmulo viral e não ocorre replicação (GERMAN-RETANA; WALTER; LE GALL, 2008; PAVAN et al., 2008).

2.4 Diagnose do *Lettuce mosaic virus*

Devido às cultivares de alface tolerante, diferentes estirpes virais e influência ambiental, como os fatores bióticos e abióticos, os métodos de diagnose do LMV, além do biológico, são de grande importância. Os métodos utilizados são DAS-ELISA e RT-PCR.

A técnica sorológica de ensaio imunológico DAS-ELISA descrita por Clark e Adams (1977) é baseada na interação antígeno-anticorpo e gera resultados por absorvância semiquantitativos e semiquantitativos. Shukla e Ward (1989) afirmam que as técnicas sorológicas eram as mais preferidas naquele momento entre os diferentes métodos utilizados para a detecção, identificação e classificação dos vírus. Para avaliar a infecção sistêmica e o acúmulo de RNA viral de LMV, Beserra Junior (2008) utilizou ambos os métodos. Pavan et al. (2008) afirma que os métodos de detecção de plantas infectadas pelo LMV são ELISA e PCR. Para testar a eficiência de resistência ao LMV de alfaves produzidas *in vitro*, Mazier et al. (2004) analisaram, primeiramente, a concentração viral semiquantitativa pelo DAS-ELISA e, posteriormente, expressou com GFP toda superfície foliar.

Os métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido desenvolvidos e aplicados como sistema de detecção de patógenos em diversos tecidos (DUARTE et al., 2016; PEYPELUT et al., 2004; THOMSON; DIETZGEN, 1995). Plantas assintomáticas podem apresentar infecção viral, essa técnica é muito utilizada para a quantificação da presença (qRT-PCR) e concentração de partículas virais bem como sua interação com o hospedeiro (ABDUL-CAREEM et al., 2006) e, juntamente ao teste DAS-ELISA, pode se identificar

possíveis plantas tolerantes e avaliar a dinâmica das diferentes estirpes nas diferentes cultivares de alface (FIRMINO et al., 2008; SHARMA et al., 2016).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das plantas e manutenção do inóculo

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, no laboratório de Virologia Molecular, e no Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais (CIV-MG), localizados no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

O material utilizado no presente trabalho foram sementes de diversas cultivares de alface, isolados das estirpes LMV-AF198 e LMV Cf e linhagens transgênicas de *N. benthamiana*. As cultivares de alface utilizadas foram: Grand Rapids e Colorado pertencentes ao grupo solta crespa; Rubete, Salinas 88, Winslow, Raider Plus, Bálsamo e Grandes Lagos pertencentes ao grupo repolhuda crespa ou americana; Regina, Luiza, Everglades, e Quatro Estações do grupo solta lisa. As sementes foram cedidas pelo professor Dr. Luiz Antonio Augusto Gomes do departamento de Agricultura da UFLA, exceto Quatro Estações e Grandes Lagos, que foram adquiridas comercialmente. Os isolados de LMV são mantidos em plantas de alface cv. Regina, em casa de vegetação e, sempre que necessário, inoculados novamente para a realização de estudos.

3.2 Inoculação de duas estirpes do LMV em diferentes cultivares de alface

As mudas de alface foram preparadas em sementeiras contendo substrato constituído por areia, esterco e terra; quinze dias após a germinação, as mudas foram transplantadas para vasos de 3 kg. Sete dias após o transplante, as plantas foram inoculadas mecanicamente com os isolados LMV-AF198 (tratamento 1) e LMVCf (tratamento 2). Nesse experimento, 12 cultivares de alface foram testadas, Grand Rapids, Rubete, Everglades, Salinas 88, Winslow, Colorado, Regina, Raider Plus, Bálsamo, Luiza, Quatro Estações e Grandes Lagos, utilizando quatro repetições de cada cultivar para cada tratamento e o mesmo número de plantas foram mantidas como controles negativos. O inóculo foi preparado macerando-se 1g de tecido infectado em 10mL de tampão fosfato de sódio 0,001M pH 7,0 contendo sulfito de sódio na mesma molaridade e como abrasivo foi utilizado carborundum (600 mesh). Cada macerado foi friccionado na face superior das folhas das diferentes cultivares testadas e, posteriormente, lavado com água para retirar o excesso de abrasivo. Foram mantidas para cada cultivar quatro plantas controle, as quais não foram inoculadas para posterior análise biológica dos sintomas.

Após duas semanas aproximadamente da inoculação, o material foi coletado e identificado para realização de testes sorológicos e moleculares, as folhas das plantas inoculadas, foram coletadas e submetidas ao teste DAS-ELISA, utilizando antissoro específico para acompanhamento da infecção, os testes sorológicos foram realizados a cada sete dias, durante um mês. As absorbâncias obtidas foram somadas e a média por semana calculada, utilizando o resultado das repetições. As médias de cada semana foram comparadas para observação da diferença na infecção de cada estirpe durante o ciclo das cultivares avaliadas. As amostras negativas no teste DAS-ELISA assim como as que mais se destacaram pela diferença nos sintomas foram coletadas e submetidas à extração do RNA viral para a realização do RT-PCR, conforme descrito a seguir.

3.3 Extração do RNA viral

O RNA total foi extraído de plantas de alface inoculadas com o LMV-Cf e LMV-AF198 que não foram positivas no teste DAS-ELISA, utilizando Qiagen Rneasy Plant minikit, segundo as instruções do fabricante, tanto para os testes de diagnose quanto para a amplificação de fragmentos para complementar o sequenciamento do vírus.

3.4 RT-PCR para diagnose do LMV nas cultivares de alface inoculadas

Para a realização do RT-PCR, foram selecionadas as cultivares que foram negativas no DAS-ELISA, cultivares que foram positivas, porém assintomáticas ou com sintomas brandos e manifestados no final do ciclo de vida da planta e cultivares ELISA positivo que apresentaram sintomas de fechamento de cabeça quando inoculadas com a estirpe LMV Cf.

A síntese do cDNA e a reação em cadeia polimerase (PCR) foram realizadas utilizando a enzima M-MLV transcriptase reverse (Sigma) e a enzima DNA polimerase Phusion high fidelity (Finnzymes) utilizando os primers para diagnose molecular LMV 9204F: 5' CAAAGGCAATCACACAG3' e LMV 9798R: 5'TTCTCTTCCTGGGTTG3' (DUARTE et al., 2016) seguindo as condições descritas no artigo.

Para analisar a diferença na concentração das partículas virais em cultivares que apresentaram sintomas diferenciados quando inoculados com as duas estirpes, o RNA total da planta foi extraído e quantificado. Todas as amostras foram diluídas para uma concentração de 100ng/μL e, em seguida, o cDNA foi sintetizado utilizando -se 0,5μl de RNA total, 0,5μL do primer LMV 9798R e 3,5μL de água ultrapura. A mistura foi incubada a 70°C por 10min

e, em seguida, colocada em gelo para posterior adição de 0,5µL transcriptase reversa e 1µL de tampão. Os tubos contendo os reagentes foram incubados a 37°C por 1 hora e, em seguida, armazenados em freezer -20°C para posterior utilização na PCR. Para PCR, utilizou-se 2µL de cDNA, 10µL de tampão, 6µL de MgCl₂, 2,5µL do primer LMV9204F, 2,5µL do primer LMV 9798R, 0,25µL de taq DNA polimerase e 24,75µL de água ultrapura. Após homogeneização a mistura foi incubada 95°C por 45 segundos, 48°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, repetido 35 ciclos. Para comparar a concentração de partículas em cada cultivar, a reação também foi interrompida nos ciclos 15, 20, 30 e 35. 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)

3.5 Amplificação e sequenciamento complementar do LMV-Cf

Em experimentos anteriores, Lucas (2014) sequenciou a maior parte do genoma do LMV-Cf, faltando apenas a proteína Nia e os 60 primeiros nucleotídeos da NIB polimerase. Portanto um par de primer baseado na sequência existente foi desenhado e utilizado para amplificar a região faltante (TABELA 1) por RT-PCR realizadas em duas etapas, utilizando M-MLV transcriptase reversa e GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, WI), de acordo com as instruções do fabricante. Os cDNAs foram sintetizados utilizando o primer reverso e a reação foi incubada a 42 °C, por 60 minutos, 95°C, por 5 minutos e resfriada em gelo por, pelo menos, 5 minutos. Para a PCR, as reações foram incubadas, a 95 °C, por 2 minutos, seguida por 30 ciclos, a 95 °C, por 40 segundos, 54°C, por 55 segundos e 72 °C, por 1 minuto, por 1 kb. Os produtos de RT- PCR foram analisados em gel de agarose 0,7% contrastado com *Gel Red Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium). O produto obtido foi purificado utilizando-se o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, Amersham Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante e enviado para sequenciamento na Genewiz, USA.

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados para completar o genoma do LMV Cf:

Nome do primer	Sequência	Posição nt	Região gene
LMV6671F	5' GCTAGGGTTGTTGCTCC 3'	NIa Vpg	6671 - 6687
LMV7622R	5' CCTTTTCCTCTTCGTGTG 3'	Nib	7605 - 7622
LMV6810F	5' CCAACGAATCGGACGGAATG 3'	NIa Pro	6810 - 6829
LMV7649R	5' AGGCTCCCATCAGTGG 3'	Nib	7633 - 7649
LMV8449F	5' GGCTATGACATACACGC 3'	Nib	8449 - 8465
LMV9098R	5' CCGCTGAGTTCTTTTGC 3'	CP	9082 - 9098

Fonte: Dados da autora (2017).

A análise das sequências obtidas foi realizada utilizando-se o NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e a identificação das regiões codificadoras foram realizadas com o programa Open Reading Frame (ORF) finder, disponível no National Center for Biotechnology Information - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). A identidade e similaridade de cada ORF foi realizada utilizando o programa CLUSTAL Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e o isolado de LMV será depositado no GenBank.

3.6 Clonagem da proteína 6K2 em vetor de expressão para estudos de localização da proteína em plantas de *N.benthamiana*

Para as proteínas 6k2 do LMVcf e LMV AF198 selecionadas para o estudo de localização, foi desenhado um par de primers específicos com os adaptadores para clonagem, utilizando o sistema Gateway (Invitrogen) e específicos para amplificar exatamente o gene referente a cada proteína (TABELA 2). A proteína alvo do estudo de localização foi selecionada por apresentar diferenças significativas entre as estirpes de LMV em trabalhos anteriores (LUCAS, 2014).

Tabela 2 - Sequência de primers desenhados, ligados aos seus adaptadores para clonagem.

Nome do primer	Sequência	Posição	Região gen nt
attB 6K2 LMV F1	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CRAAAGARGCTCTYAGTAA3'	6K2	6008 - 6027
attB 6K2 LMV Cf R	5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA TTGRTGTCTGAACTGCATCAG3'	6K2	6008 - 6027
attB 6K2 LMV Cf F2	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT ACGAAAGAGGCTCTCAGCAA3'	6K2	6147 - 6166

Fonte: Dados da autora (2017).

3.6.1 Reação de recombinação da Bp clonase - Clonagem em vetor pDONR221

Para a construção do vetor de expressão seguindo o sistema Gateway, o primeiro passo é a reação de recombinação da Bp clonase que constitui-se de: 5 µl do PCR (att-PCR), 2 µl do vetor pDONR221, 4 µl do tampão de reação 5x TE Buffer da BP clonase e 2 µl da enzima Bp clonase. Após incubação por 1 hora à temperatura ambiente, foram adicionados 2 µl de Proteinase K (2 µg/µl), e incubada a 37°C, por 10 minutos, antes da transformação em célula competente *E. coli* Omnimax (Invitrogen). Essa transformação seguiu o método de choque térmico adicionando-se, inicialmente, 5 µl da reação Bp clonase a 50 µl das células competentes e incubadas em gelo, durante 30 min. Em seguida, foram colocadas a 42°C por 45 segundos e transferidas para o gelo por 5 minutos, após esse período, foram adicionados 800 µl de meio LB líquido e incubado a 37°C por 1 h com agitação. Após esse período, as células foram plaqueadas em meio LB sólido suplementado com Kanamicina (50 µg/mL) e incubadas a 37°C durante 12 - 16h.

As colônias bacterianas transformadas foram submetidas à reação de RT-PCR, utilizando a enzima AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix (Applied Biosystems) e, posteriormente, sequenciadas, para confirmação da presença do fragmento desejado. As colônias que continham o fragmento genômico desejado foram multiplicadas em meio LB líquido a 37°C overnight. A extração do DNA plasmidial foi feita utilizando-se o kit GeneJet Plasmid (Thermo Scientific), seguindo as instruções do fabricante.

3.6.2 Reação de recombinação da LR clonase - Fusão das proteínas de interesse ao GFP

Em um tubo de 1,5 ml foram adicionados 5 µl de água ultrapura, 1,5 µl de entry clone (derivado da reação da PB clonase), 1,5 µl do pSITE-2CA (GFP) (CHAKRABARTY et al., 2007) e por fim, 1,5 µl da enzima LR clonase (Invitrogen). Após incubação por 1 hora à temperatura ambiente, foram adicionados 2 µl de Proteinase K (2 µg/µl), e incubada a 37°C, por 10 minutos, antes da transformação em célula competente *E. coli* Omnimax (Invitrogen). Essa transformação seguiu o método de choque térmico adicionando-se, inicialmente, 5 µl da reação Bp clonase a 50 µl das células competentes e incubadas em gelo, durante 30 min. Em seguida, foram colocadas a 42°C, por 45 segundos, e transferidas para o gelo por 5 minutos, após esse período foram adicionados 800 µl de meio LB líquido e incubado a 37°C, por 1 h, com agitação. Após esse período, as células foram plaqueadas em meio LB sólido suplementado com Kanamicina (50 µg/mL) e incubadas a 37°C, durante 12 - 16 h.

As colônias bacterianas transformadas foram submetidas à reação de RT-PCR, utilizando a enzima AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix (Applied Biosystems) e, posteriormente, sequenciadas, para confirmação da presença do fragmento desejado. As colônias que continham o fragmento genômico desejado foram multiplicadas em meio LB líquido a 37°C overnight. A extração do DNA plasmidial foi feita utilizando-se o kit GeneJet Plasmid (Thermo Scientific), seguindo as instruções do fabricante.

3.6.3 Expressão de proteínas em plantas transgênicas

Os vetores recombinantes foram, então, utilizados para transformar a *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando o método de “congelamento e descongelamento”: 5µl de plasmídeo (derivado da reação da LR clonase) foram incubados com 100 µl de suspensão de *Agrobacterium*, em 10 mM de CaCl₂. Essa mistura foi congelada em nitrogênio líquido por cinco segundos e submetida a choque térmico a 37° C, durante 5 minutos e, em seguida, incubadas a 28° C, durante 2 horas, seguida da adição e 1ml de meio LB líquido. As bactérias foram, então, precipitadas por centrifugação e plaqueadas em meio LB ágar, contendo antibióticos de seleção, estreptomicina (100 µg/ml), espectromicina (100 µg/ml) e rifampicina (100 µg/ml).

Para a determinação da localização das proteínas virais fusionadas à GFP, foram utilizadas plantas de *Nicotiana benthamiana* transgênicas, que expressam RFP fusionada à histona 2b e retículo endoplasmático, tornando-o fluorescente. Isso permitiu o monitoramento

da posição da proteína viral em relação ao núcleo e ER, aumentando, assim, a precisão da análise da localização das proteínas virais nas células.

3.6.4 Procedimentos para agroinfiltração

Plantas transgênicas de *Nicotiana benthamiana*, que expressam RFP no núcleo e no retículo endoplasmático (CHAKRABARTY et al., 2007), foram mantidas à temperatura média de 22° C com ciclo de 16 horas luz e 8 horas de escuro. Para cada proteína expressa, foram utilizadas três plantas e duas folhas de cada planta, infiltradas com colônias frescas de *A. tumefaciens* transformadas conforme descrito acima. Antes da infiltração, a concentração dessas colônias foi ajustada para um OD600 de 0.6-1.0 em tampão MES (10 mM de MgCl₂, 10 mM de MES, pH 5,9) contendo acetoseringona (150 mM), a suspensão bacteriana foi mantida à temperatura ambiente durante 2 - 3 h. As infiltrações foram realizadas no meio da folha, por suave pressão com uma seringa descartável de 1 ml na superfície inferior das folhas expandidas, com cerca de 2,5 cm de largura. Uma quantidade suficiente para a suspensão bacteriana infiltrar-se completamente nas folhas, até observar uma aparência de encharcamento. Em média, 1 - 4 pontos foram infiltrados, para o seu completo encharcamento. Depois da agroinfiltração, as plantas foram mantidas em laboratório sob luz fluorescente contínua, durante pelo menos 48 h, por até cinco dias. As folhas foram levadas em câmara úmida ao laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Lavras e examinadas em microscópio confocal de varredura a laser.

3.7 Microscopia confocal de varredura a laser

A microscopia confocal foi realizada utilizando o microscópio confocal de varredura a laser Olympus FV1000 com lasers de hélio/neon, multilinha de argônio e diodo sólido, localizado no departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. A proteína GFP foi excitada a 488 nm e a TagRFP a 543 nm. Pelo menos três imagens com boa resolução para cada proteína expressada serão geradas e capturadas em sequência utilizando o software Olympus FluoView. Antes da observação ao microscópio, seções de tecido de folha com 0,5 x 0,5 cm foram cortadas, colocadas em uma lâmina de vidro, sobre uma gota de água destilada e cobertas com uma lamínula. As Micrografias foram obtidas usando lentes 40X/0.9NA com objetiva de imersão em água.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sintomas observados nas cultivares de alface

As plantas de alface inoculadas com ambos os isolados, de maneira geral, apresentaram sintomas mais evidentes no experimento conduzido durante o inverno (TABELA 3), pois no verão alguns sintomas observados no inverno não ocorreram. Sabe-se que a temperatura é um dos fatores que exercem grande influência na expressão de sintomas induzidos por vírus em plantas (CHUNG; AZEVEDO FILHO; COLARICCIO, 2007).

Quando os sintomas induzidos pela LMV Cf foram comparados com os induzidos pelo LMV AF198, ficou clara a diferença entre eles. De maneira geral, as plantas inoculadas com a estirpe LMV Cf apresentaram sintomas mais intensos e mais evidentes (FIGURA 2), e o fechamento da cabeça, sintoma atípico induzido por essa estirpe, foi mais visível no experimento conduzido no inverno.

Além da cv. Regina 579, que apresentou fechamento de cabeça nos dois experimentos, as cultivares Quatro Estações e Everglades foram as únicas que reagiram com o fechamento da cabeça, porém isso ocorreu apenas no inverno. Notou-se, portanto, que a mesma cultivar, inoculada com o mesmo isolado de LMV, pode apresentar sintomas variáveis quando analisadas em épocas diferentes do ano, pois o aparecimento de sintomas nas plantas está diretamente ligado a fatores como temperatura e luminosidade. Borges (2006) também observou fato semelhante, quando inoculou os isolados LMV-II, LMV-IV, *Lettuce mottle virus* (LeMoV) e Tospovírus em diversas progênes de alface, utilizando trips e pulgões. Os sintomas por ele observados foram mosqueado, distorção e amarelecimento foliar, clareamento de nervuras, mosaico, redução do crescimento, má formação ou distorção da cabeça, necrose, mancha necrótica e bronzeamento foliar, com intensidades variando de acordo com a estirpe e a cultivar de alface.

Tabela 3- Sintomas induzidos pelos dois isolados de LMV estudados em 12 cultivares de alface, em dois períodos do ano.

Cultivares	1° EXPERIMENTO (Verão)		2° EXPERIMENTO (Inverno)	
	Sintomas* LMV AF 198	Sintomas LMV Cf	Sintomas LMV AF 198	Sintomas LMV Cf
Balsamo	AF	MO	N, NE	AF, NE, DF
Colorado	N	N, MFC	N	SS
Everglades	SS	SS	SS	SS
Grandes Lagos	MFC, DF, EM	MO, MFC	EM, AF, DF, N	SS
Grandes Rapids	CN, EM	CN, EM	MO, EM, N	MO, N, EM
Luiza	SS	SS	MO	EM
Quatro Estações	DF, N, MFC	NE, MFC, DF, N	EM, DF, FC, MFC	NE, FC, EM, DF, N, MO
Raider Plus	NE	EM, AF, N	EM, DF, N	N, DF
Regina	MO, NE	MO	MO, MFC, EM	MO, MFC, FC, EM
Rubete	N, AF	SS	DF, CN, AF, N	SS
Salinas 88	SS	SS	SS	SS
Winslow	EM, DF, AF, NE	SS	DF, EM, NE	AF, NE, DF

Fonte: Dados da autora (2017).

*AF = amarelecimento foliar; CN = clareamento de nervuras; DF = deformação foliar; EM = embolhamento; FC=fechamento da cabeça; MFC = má formação da cabeça; MO = mosaico; MP= morte da planta; N = nanismo; NE = necrose; SS=sem sintomas.

Os sintomas mais comuns observados em quase todas as cultivares foram mosaico sistêmico, diminuição do crescimento, redução e deformação da área foliar, que são característicos dessa virose em plantas de alface (FIGURA 2). Sintomas mais severos como deformação e redução do número de folhas e deformação ou ausência de formação de cabeça foram encontrados nas cultivares americanas Raider Plus, Grand Rapids e Rubete, quando inoculadas com o LMVcf, que, normalmente, apresentam cabeça fechada. A cultivar Colorado foi bastante afetada pelas duas estirpes de LMV e, praticamente, não se desenvolveu após a inoculação, mas no inverno todas as plantas inoculadas com o LMVcf morreram na segunda semana após inoculação. Foi observado, também, que algumas cultivares, como Luiza e Salinas 88 não apresentaram sintomas visíveis quando inoculadas com ambas as estirpes, indicando a presença de algum gene de resistência (CHUNG; AZEVEDO FILHO; COLARICCIO, 2007; STANGARLIN, 1995). Entretanto, outros isolados já foram encontrados quebrando a resistência da cv. Salinas 88. Chung (2005), avaliando a reação de

diferentes linhagens de alface ao LMV, observou que o patótipo IV induz sintomas de deformação foliar em plantas dessa cultivar.

Figura 2 - Sintomas apresentados pelas 12 cultivares de alface, inoculadas com os dois isolados de LMV no período de inverno.



Legenda: LMV - Plantas inoculadas com o isolado LMV AF-198; LMV cf - Plantas inoculadas com o isolado LMV - Cf e CN - Plantas sadias, denominadas controle negativo.

Fonte: Dados da autora (2017).

Como se pode observar, quando os dois isolados do LMV estudados foram inoculados nas cultivares de alface, notou-se diferença nos sintomas tanto entre os isolados como entre as cultivares. Isso indica uma clara diferença na interação vírus planta em cada patossistema e, também, a presença de resistência e suscetibilidade distintas entre algumas cultivares. Essas diferenças têm sido identificadas por outros autores como Revers et al. (1997) que, após inocularem isolados de LMV em diversas cultivares de alface, não identificaram a presença do mosaico típico do LMV, mas apenas clareamento de nervuras, manchas amarelas e

enfazamento em cultivares que possuíam algum tipo de resistência. Observaram ainda que, com base na absorbância obtida em testes ELISA, a multiplicação de dois dos isolados empregados por eles, o LMV-9 e o LMV-1, ocorreu na cvs. Malika, que contém o gene *mol*¹ e Itaca com o gene *mol*², respectivamente. Entretanto, os mesmos isolados não se replicaram nas cvs, Salinas 88 e Vanguard 75, ambas contendo gene *mol*².

Outras 5 cultivares tipo lisa e crespa foram acrescentadas nas inoculações feitas no período do inverno, para atender a demanda do setor de melhoramento de plantas da UFLA. Os sintomas observados nessas cultivares foi, principalmente, o mosaico, diminuição da área foliar, deformação, nanismo, porém a formação de cabeça não foi observada em todas as cultivares testadas (FIGURA 3), indicando que nem todas as cultivares de alface do tipo lisa reagem com esse sintoma. Essa interação diferenciada do LMVcf com as cultivares testadas pode ser usada no futuro como indicadores para a caracterização desse isolado.

Figura 3 - Cultivares do tipo lisa e crespa inoculadas com LMV cf.



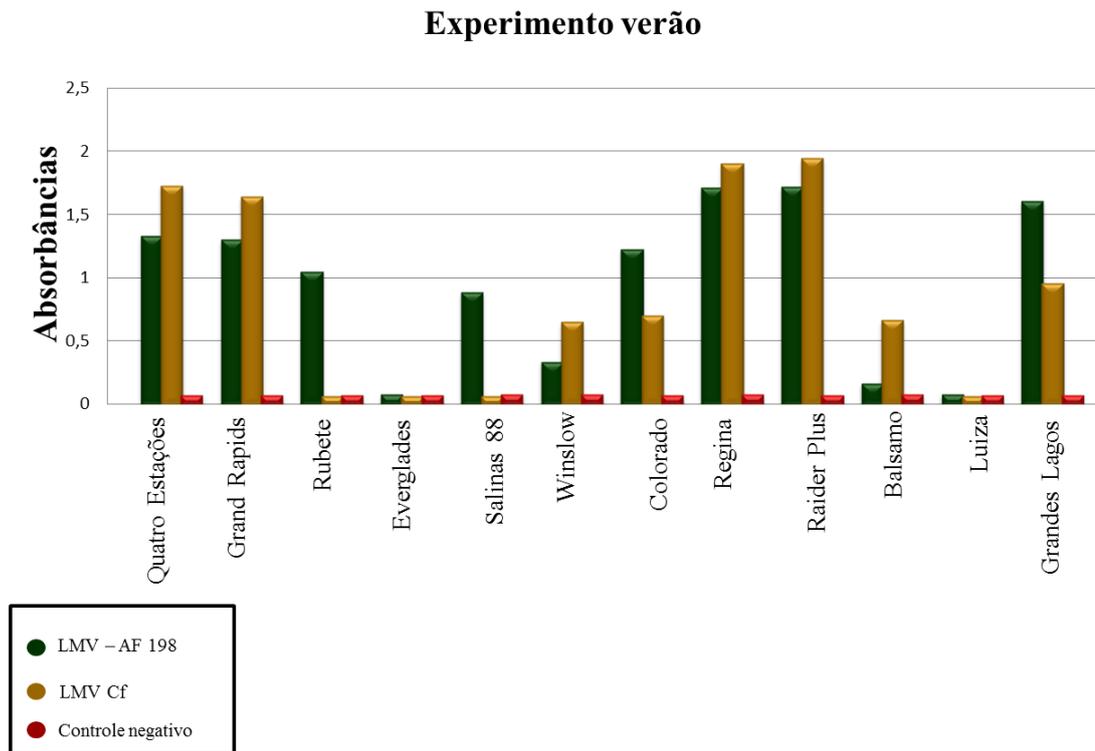
Fonte: Dados da autora (2017)

O fato de as diferentes cultivares reagirem com sintomas distintos tornam a diagnose visual desse vírus bastante difícil ou, às vezes, impossível, no caso das cultivares tolerantes que, apesar de não apresentarem sintomas podem conter altas concentrações de vírus. Como já observado para outros *potyvirus* como o *Potato vírus Y* (PVY), que possui estirpes que não induzem sintomas visíveis em certas cultivares de batata, essa planta é uma fonte de inóculo não detectável, tornando-se uma disseminadora silenciosa no campo (FIGUEIRA, 2000). Além disso, pode produzir sementes portadoras de vírus, o que é ainda mais importante no processo de introdução e disseminação do inóculo no campo. Isso aponta para a necessidade de se conhecer um pouco mais sobre a reação de plantas a isolados de LMV para controlar a disseminação desse patógeno no campo e analisar plantas candidatas a produção de sementes, para propagação, por métodos sorológicos e moleculares.

4.2 DAS-ELISA

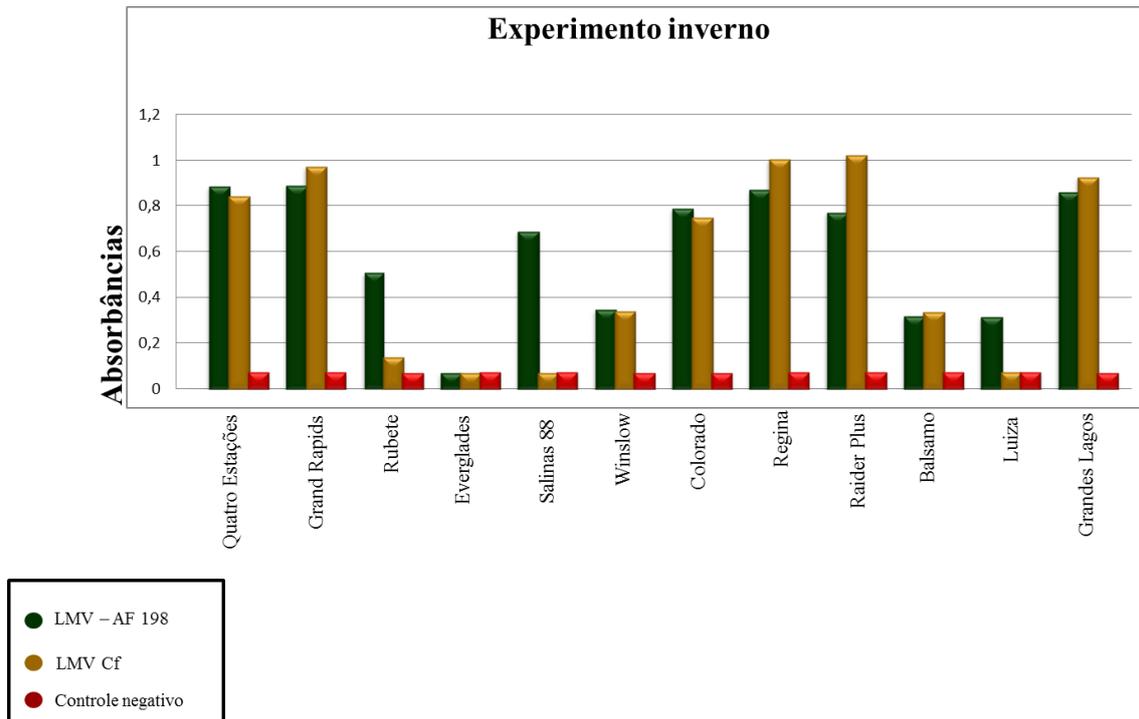
Os valores médios de absorvância obtidos nas 4 repetições, quando as cultivares foram analisadas pelo teste DAS-ELISA, estão apresentados nas figuras 4 e 5. Comparando-se as absorvâncias obtidas entre as doze cultivares no experimento realizado no verão, em 5 delas as absorvâncias obtidas a partir das plantas inoculadas com LMVcf foram maiores: Quatro Estações, Grand Rapid, Winslow, Regina 579 e Raider Plus. As absorvâncias das plantas inoculadas com LMV AF198 foram maiores em 4 cultivares: Colorado e Grandes Lagos, Rubete e Salinas 88, essas duas últimas foram negativas quando inoculadas com LMVcf. As absorvâncias obtidas nos testes realizados com as cultivares Everglades e Luiza foram negativas nas plantas inoculadas com ambos os isolados e as obtidas nas plantas infectadas com Regina e Rider Plus foram altas e semelhantes entre si.

Figura 4 - Média das absorvâncias obtidas no teste DAS-ELISA em 12 cultivares inoculadas com os isolados LMV AF198 e LMV cf no período do verão.



Fonte: Dados da autora (2017).

Figura 5 - Média das absorvâncias obtidas no teste DAS-ELISA em 12 cultivares inoculadas com os isolados LMV AF198 e LMV cf no período do inverno.



Fonte: Dados da autora (2017).

No experimento realizado no inverno, os valores das absorvâncias obtidas foram, de um modo geral, menores do que as observadas no verão. De certa forma, essa diminuição na absorvância já era esperada, uma vez que em baixas temperaturas as plantas se desenvolvem mais lentamente e quase sempre os vírus, de um modo geral, têm mais dificuldade para se replicar. Nessa época, nem todas as plantas mostraram o mesmo resultado que no verão, pois as cultivares que apresentaram absorvâncias maiores quando infectadas com o LMVcf foram a Grand Rapids, Regina, Raider Plus e Grande Lagos.

As cvs. Quatro estações e Winslow, que apresentaram maior absorvância no verão, mostraram absorvâncias iguais ou menores no inverno, enquanto que a Grandes Lagos apresentou absorvância bem inferior no verão e superior no inverno. O comportamento das cultivares, inoculadas com LMV AF198, Colorado, Rubete, Everglades e Salinas 88, continuou semelhante ao do experimento anterior e apenas a cultivar Quatro Estações apresentou absorvância maior, ao contrário do observado no experimento anterior. A cultivar Luiza, que foi negativa nos testes sorológicos realizados com as plantas inoculadas no verão, mostrou-se positiva em plantas inoculadas com LMV AF198, continuando negativa nas plantas inoculadas com LMVcf.

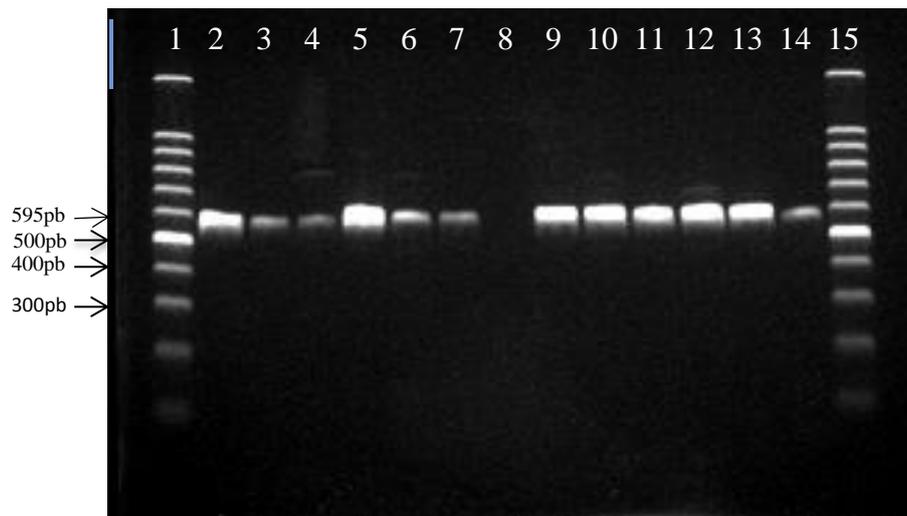
O DAS-ELISA é a técnica mais utilizada para detecção de fitovírus, mas a sua sensibilidade é em torno de 1ng de vírus, o que é bem menor do que a de outras técnicas moleculares como, por exemplo, a RT-PCR que é em torno de 0,1 pg a 1fg de vírus (FIGUEIRA, 1999; HADIDI et al., 1993). Assim, quando o vírus ocorre na planta em concentrações acima de 1ng pode ser detectado por ambas as técnicas (BANANEJ et al., 2013), mas em concentrações menores, o resultado pode gerar um falso negativo ao se empregar o teste sorológico, de modo que seria mais indicado o RT-PCR. Isso poderia ocorrer nas plantas que apresentam uma certa resistência como as cultivares Everglades, Salinas 88 e Luiza.

4.3 RT-PCR

Com base nos resultados obtidos nos testes biológicos e DAS-ELISA, foram escolhidas para o RT-PCR: as cultivares Regina 579 e Quatro estações como controles positivos; cvs. Salinas 88 e Rubete, que foram ELISA positivas para o isolado LMV AF198 e negativas para o LMV cf nas duas épocas e assintomáticas em qualquer uma das duas épocas; cv. Luiza que foi ELISA negativa para ambas os isolados, no verão, e ELISA positiva, com sintomas, para o LMV AF198, no inverno, e Everglades que foi negativa para ambos os isolados, em ambas as épocas dos experimentos.

Conforme observado na Figura 6, o fragmento com 595pb localizado no gene da capa proteica do LMV foi amplificado para todas as plantas testadas, independentemente de terem sido ELISA positivas ou não, com ou sem sintomas. Isso indica que as plantas de alface não são imunes, ou seja, permitem a multiplicação do LMV em seus tecidos, embora com diferentes intensidades.

Figura 6 - Detecção do *Lettuce mosaic vírus* (LMV) por RT-PCR.



Legenda: 1. Marcador 100pb; 2. Regina com LMV Cf; 3. Salinas com LMV Cf; 4. Luiza com LMV Cf; 5. Quatro Estações com LMV Cf; 6. Rubete com LMV Cf; 7. Everglades com LMV Cf; 8. Controle negativo; 9. Regina com LMV AF198; 10. Salinas com LMV AF198; 11. Luiza com LMV AF198; 12. Quatro Estações com LMV AF198; 13. Rubete LMV com LMV AF198; 14. Everglades com LMV AF198 e 15. Marcador 100pb.

Fonte: Dados da autora (2017).

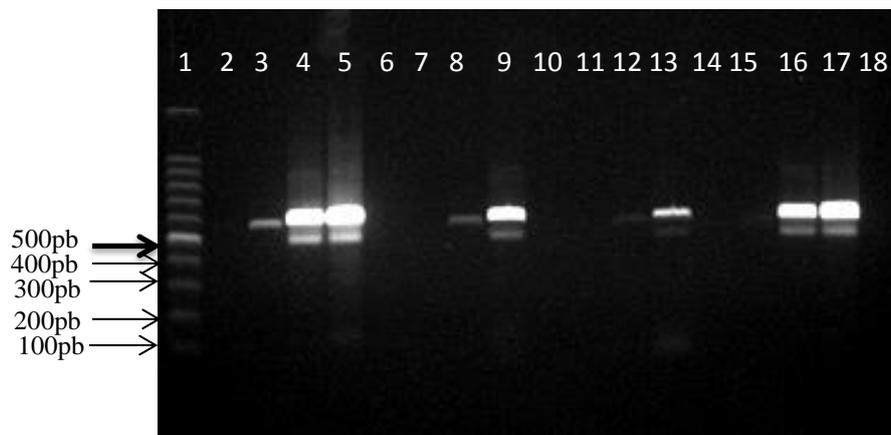
Na Figura 7, pode-se observar a análise eletroforética dos fragmentos amplificados nos testes em que se procurou investigar a concentração das partículas virais nas amostras para as quais foram realizados os testes de RT-PCR em plantas inoculadas com o LMV cf. Nota-se que, no ciclo 15, não foi amplificada nenhuma banda nas reações realizadas com as cultivares Regina, Salinas 88, Luiza e Quatro Estações. No ciclo 20, apenas a cultivar Regina apresentou uma banda bem fraca e, no ciclo 30, as cultivares Regina e Quatro Estações apresentaram bandas intensas, enquanto que as cultivares Salinas 88 e Luiza apresentaram bandas muito fracas. Ao final da reação, no ciclo 35, a maioria das cultivares foram positivas, apresentando bandas intensas, com exceção da cultivar Luiza que apresentou uma banda bem fraca.

Na Figura 8, encontra-se a análise eletroforética dos produtos de RT-PCR realizado nas mesmas cultivares inoculadas com LMV AF198. No ciclo 15, todas as cultivares foram negativas, não apresentando banda correspondente ao fragmento de interesse. No ciclo 20, somente a cultivar Luiza permaneceu negativa, enquanto que as demais apresentaram banda fraca e nos ciclos 30 e 35 todas as cultivares apresentaram banda intensa.

Com base nesses resultados obtidos, pode-se concluir que as plantas que foram negativas no DAS-ELISA, realmente, apresentavam uma baixa concentração de vírus nos seus tecidos, pois foram as que levaram mais tempo para amplificar o cDNA viral, em relação às demais amostras analisadas. As cultivares Regina e Quatro Estações, que apresentaram

maiores absorvâncias no DAS-ELISA, também mostraram maior concentração na RT-PCR, pois tiveram a banda alvo amplificada já no ciclo 20. As cultivares Salinas 88 e Luiza, que apresentaram resultado negativo no DAS-ELISA para a estirpe LMV Cf e positivo para a cv. LMV AF198, na RT-PCR mostrou resultado positivo para as duas estirpes, porém com bandas menos robustas e início da amplificação mais tardia.

Figura 7 - Análise eletroforética das bandas amplificadas por RT-PCR em amostras de alface, inoculadas com o *Lettuce mosaic vírus* (LMVcf), submetidas a 3 números diferentes de ciclo.



Legenda: 1. Marcador 100pb; 2. Regina ciclo 15; 3. Regina ciclo 20; 4. Regina ciclo 30; 5. Regina ciclo 35; 6. Salinas ciclo 15; 7. Salinas ciclo 20; 8. Salinas ciclo 30; 9. Salinas ciclo 35; 10. Luiza ciclo 15; 11. Luiza ciclo 20; 12. Luiza ciclo 30; 13. Luiza ciclo 35; 14. Quatro Estações ciclo 15; 15. Quatro Estações ciclo 20; 16. Quatro Estações ciclo 30; 17. Quatro Estações ciclo 35 e 18. Controle negativo.
Fonte: Dados da autora (2017).

Figura 8 - Análise eletroforética das bandas amplificadas por RT-PCR, em amostras de alface inoculadas com o *Lettuce mosaic vírus* (LMV AF198) submetidas a 3 números diferentes de ciclo.



Legenda: 1. Marcador 100pb; 2. Regina ciclo 15; 3. Regina ciclo 20; 4. Regina ciclo 30; 5. Regina ciclo 35; 6. Salinas ciclo 15; 7. Salinas ciclo 20; 8. Salinas ciclo 30; 9. Salinas ciclo 35; 10. Luiza ciclo 15; 11. Luiza ciclo 20; 12. Luiza ciclo 30; 13. Luiza ciclo 35; 14. Quatro Estações ciclo 15; 15. Quatro Estações ciclo 20; 16. Quatro Estações ciclo 30; 17. Quatro Estações ciclo 35 e 18. Controle negativo.
Fonte: Dados da autora (2017).

Analisando os resultados das diferentes cultivares inoculados com as diferentes estirpes de LMV pelo DAS-ELISA, não foi possível associar a concentração das partículas detectadas no teste com os sintomas observados nas plantas, porém com a RT-PCR, foi possível visualizar mais claramente que as plantas que apresentaram sintomas mais drásticos e visíveis possuíam uma concentração maior de partículas na planta, enquanto que as plantas que não apresentaram sintomas ou foram até mesmo negativa no DAS-ELISA apresentaram bandas visíveis somente a partir dos ciclos finais da RT-PCR. Além disso, após análise dos géis, observou-se claramente a diferença de concentração entre as estirpes LMVcf e LMVAF198, pois na cultivar salinas 88 o LMVcf está bem menos concentrado, tendo sido detectado apenas a partir do ciclo 20, ao passo que o LMVAF198 foi detectado no ciclo 15. Por outro lado, na cultivar Luiza, que foi ELISA negativa quando inoculada com os dois isolados de LMV no verão e com o LMVcf no inverno, diferentemente do LMVAF198, uma banda bem menos robusta que a verificada para as outras cultivares, foi amplificada apenas a partir do ciclo 30.

Esse resultado mostra a importância da utilização de mais de uma técnica para diagnose de vírus, quando se quer detectar baixas concentrações de vírus na planta. O teste sorológico DAS-ELISA é muito eficaz e utilizado, porém este necessita de um maior número de partículas virais para que as mesmas sejam detectadas, não possuindo a sensibilidade dos

testes moleculares, conforme já comentado anteriormente. A alta sensibilidade do RT-PCR, que o permite detectar até 1fg de vírus, deve ser levado em consideração nos programas de melhoramento genético para produção de cultivares de alface resistente ao LMV, para evitar interpretações equivocadas sobre a resistência/imunidade da planta (ABDULLAH et al., 2001; JACKWOOD; KWON; HILT, 1992; SHANG et al., 2011).

4.4 Amplificação e sequenciamento complementar do LMV-Cf

A maior parte do genoma do LMVcf já foi amplificada e analisada anteriormente por Lucas (2014). Os primers desenhados para completar o sequenciamento dessa estirpe permitiram completar seu genoma com 10.068 nucleotídeos, excluindo a cauda poli-A.

Quando a sequência de nucleotídeos do genoma completo foi comparada aos isolados de LMVcf disponíveis no banco de dados, o isolado com maior similaridade foi 95% com o isolado KJ161179 proveniente do Chile e a menor similaridade foi de 84% com o isolado KF268956 da França (TABELA 4). Entre os isolados do banco de dados, a variação foi similar, de 84% quando KF268956 foi comparado com os demais e 97% entre os isolados KJ161179 e o KJ161186.

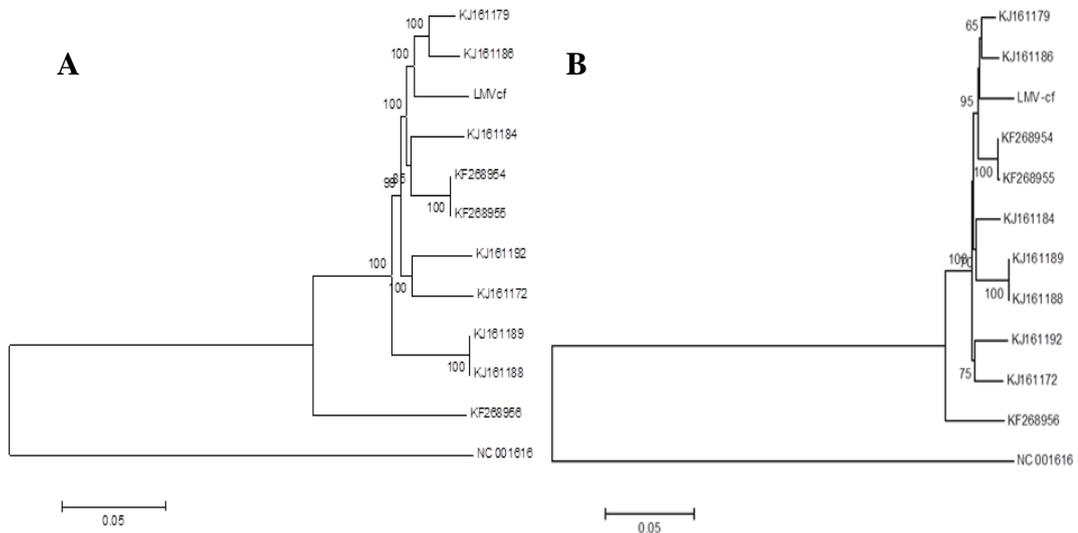
Tabela 4 - Porcentagem de identidade entre as sequências de nucleotídeos (diagonal acima) e de aminoácidos (diagonal abaixo) entre o genoma completo do LMVcf e os isolados de LMV disponíveis no GenBank.

Nº	Isolados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	LMV-Cf	-	84	92	92	93	92	95	95	94	94	93
2	KF268956	91	-	84	84	84	84	85	85	85	85	85
3	KJ161189	95	92	-	99	91	91	92	92	93	92	92
4	KJ161188	95	92	99	-	92	91	92	92	93	92	92
5	KJ161192	95	92	95	95	-	93	93	93	93	93	93
6	KJ161172	95	92	95	95	96	-	93	93	93	93	93
7	KJ161179	97	93	96	96	96	96	-	97	95	95	94
8	KJ161186	96	92	96	96	96	96	97	-	95	95	94
9	KF268954	96	92	96	96	96	96	98	97	-	99	95
10	KF268955	96	92	96	96	96	96	97	97	99	-	95
11	KJ161184	96	92	96	96	96	96	97	96	97	97	-

Fonte: Dados da autora (2017).

Os dendogramas, construídos com base na sequência de nucleotídeos (FIGURA 9) e na de aminoácidos, mostraram que a estirpe LMVcf se localizou em um clado separado dos demais isolados de LMV do banco de dados empregados para comparação, com uma maior proximidade com os isolados KJ161179 do Chile e KJ191188 da Tunísia. Resultado semelhante foi constatado por Lucas 2014, confirmando a singularidade do genoma do LMVcf.

Figura 9 - Dendrograma construído com base na sequência de nucleotídeos (A) e na sequência de aminoácidos (B) do genoma completo do isolados de LMVcf. Os valores foram obtidos pelo programa MEGA e teste Neighbor-Joining, com 3.000 repetições.



Fonte: Dados da autora (2017).

A sequência da proteína NIa PRO que se encontrava com o sequenciamento incompleto (LUCAS, 2014) foi complementada nesse trabalho, mostrando possuir 729 nucleotídeos com início no nucleotídeo 6733 e término no nucleotídeo 7462.

Quando comparada com os isolados de LMV do GenBank, apresentou a maior identidade de nucleotídeos (92%) com os isolados KJ161192 da Tunísia, KF268954 e KF268955 do Brasil. A menor identidade (83%) ocorreu com o isolado com o KF268956 da França (TABELA 5).

Tabela 5 - Porcentagem de identidade entre as sequências de nucleotídeos (diagonal acima) e de aminoácidos (diagonal abaixo) da NIa PRO do LMVcf e os isolados de LMV disponíveis no GenBank.

Nº	Isolados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	LMV-Cf	-	83	90	90	92	90	91	90	92	92	91
2	KF268956	91	-	89	89	86	87	88	86	87	87	87
3	KJ161189	93	97	-	99	93	94	94	93	95	95	94
4	KJ161188	92	97	99	-	93	94	94	93	95	95	94
5	KJ161192	92	97	97	96	-	92	93	91	93	93	93
6	KJ161172	93	97	99	99	97	-	94	94	94	94	93
7	KJ161179	93	97	99	98	97	99	-	98	95	95	94
8	KJ161186	92	97	98	98	96	99	99	-	94	94	93
9	KF268954	92	97	99	99	96	99	98	98	-	99	97
10	KF268955	92	97	99	99	96	99	98	98	100	-	97
11	KJ161184	92	97	99	99	97	99	98	98	99	99	-

Fonte: Dados da autora (2017).

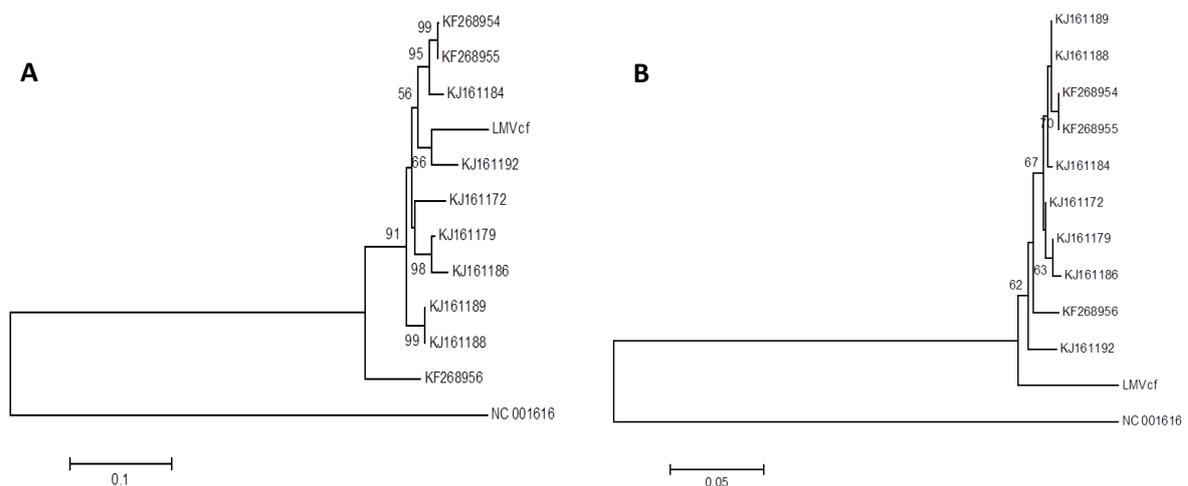
A NIaPro é uma proteinase que, além de estar envolvida no processamento do C-terminal da poliproteína, está associada à formação da inclusão nuclear produzida pelos potyvirus (ADAMS; ANTONIW; BEAUDOIN, 2005; KNUHTSEN; HIEBERT; PURCIFULL, 1974). Características funcionais dessa proteína têm sido exaustivamente analisadas e muitos estudos têm mostrado que existem variações na eficiência dos sítios de clivagem de diferentes NIaPros, que influenciam, diretamente, na regulação da maturação das proteínas dos potyvirus e parecem estar envolvidas no controle do processo de infecção nas plantas, regulando expressão dos genes (ANINDYA; SAVITHRI, 2004; REVERS; GARCÍA, 2015). Além disso, a NIaPro tem função de DNase, de modo que as variações na sequência dessa proteína são importantes e podem estar relacionadas com a expressão diferencial dos sintomas apresentados pelas plantas infectadas com as diversas estirpes de LMV.

Analisando a sequência de aminoácidos da NIaPro do LMVcf, a identidade variou de 91 a 93%, a menor identidade ocorreu com o isolado da França KF268956 e a maior com os isolados KJ161189 da Tunísia, KJ161172 da França e o KJ161179 do Chile. Percebe-se que não houve concordância com o que foi observado anteriormente na identidade dos nucleotídeos. Observou-se que a grande variabilidade de nucleotídeos não gerou a mesma porcentagem de variação nos aminoácidos, indicando uma substituição sinônima ou silenciosa

(NEI; GOJOBORI, 1986), entretanto, pequenas alterações pontuais na sequência de aminoácidos de uma proteína pode modificar sua função (SUGAWARA et al., 2013).

Em ambos os dendrogramas construídos com base na sequência de nucleotídeos e de aminoácidos da Nia PRO (FIGURA 10A e B), o LMVcf ficou agrupado em um clado separado, com maior proximidade do isolado KJ161192 da Tunísia. Por ser uma proteína associada com proteínas do hospedeiro envolvidas em respostas a stresse biótico e abiótico, metabolismo, fotossíntese e conectadas ao fitohormônio etileno (MARTÍNEZ et al., 2016), essa proteína torna-se também uma candidata para posteriores ensaios visando a estabelecer uma correlação com os sintomas expressados pela planta infectada.

Figura 10 - Dendrograma construído com base na sequência de nucleotídeos (A) e aminoácidos (B) da Nia PRO do isolado LMVcf. Os valores foram obtidos pelo programa MEGA e teste Neighbor-Joining, com 3.000 repetições.



Fonte: Dados da autora (2017).

A Nib também não tinha sido sequenciada e analisada nos trabalhos anteriores. Trata-se de uma proteína, que a exemplo da proteína NIa, está associada à formação de inclusões nucleares (KASSANIS, 1939; KNUHTSEN; HIEBERT; PURCIFULL, 1974), podendo também ser uma candidata a causar alterações nas expressões de sintomas pela planta hospedeiro. Tem também a função de polimerase dependente de RNA, com provável associação com as proteínas 6K2 e NIaPro durante a replicação viral, o que a torna indispensável para a replicação viral (DUFRESNE et al., 2008; HONG; HUNT, 1996).

Quando a sequência de nucleotídeos dessa proteína foi comparada com os isolados do GenBank empregados para comparação, apresentou identidades entre 83% (com os isolados KF268956 da França) e 95% com o isolado KJ161179 do Chile e KJ161186 da França

(TABELA 6). Da mesma forma que o observado para a NIa PRO, a variação da sequência de aminoácidos foi menor, entre 95% (com KF268956 da França) e 99% com os KJ161179 do Chile e KJ 161186 da França).

Tabela 6 - Porcentagem de identidade entre as sequências de nucleotídeos (diagonal acima) e aminoácidos (diagonal abaixo) da NIb do LMVcf e de isolados de LMV.

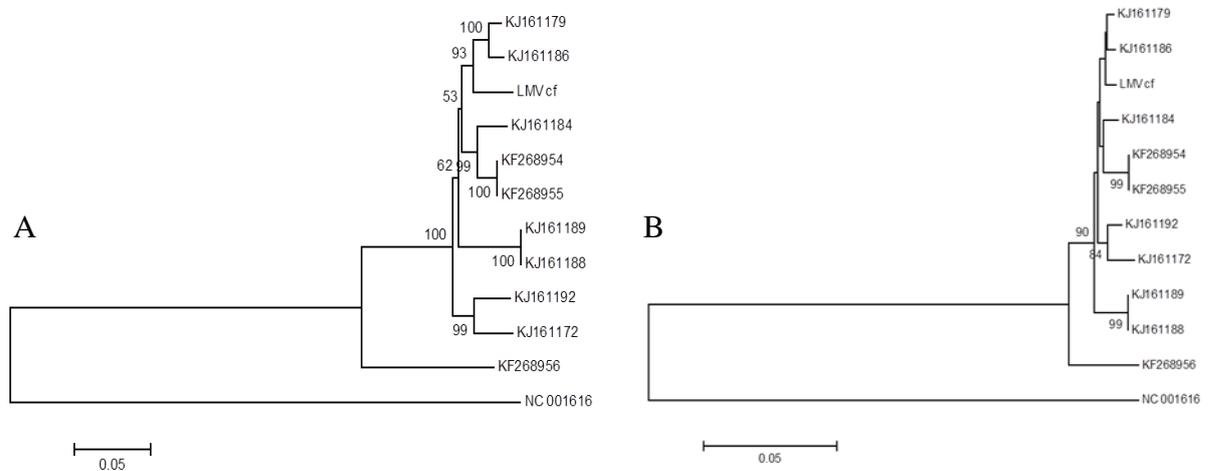
Nº	Isolados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	LMV-Cf	-	83	92	92	92	92	95	95	94	94	93
2	KF268956	95	-	83	83	83	83	84	84	83	83	84
3	KJ161189	97	95	-	100	92	91	93	93	93	93	93
4	KJ161188	97	95	100	-	92	91	93	93	93	93	93
5	KJ161192	98	95	97	97	-	95	93	93	93	93	92
6	KJ161172	98	94	97	97	98	-	93	93	94	94	92
7	KJ161179	99	96	98	98	98	97	-	98	95	95	94
8	KJ161186	99	96	97	97	98	97	99	-	95	95	94
9	KF268954	98	95	97	97	97	97	98	98	-	100	96
10	KF268955	98	95	97	97	97	97	98	98	100	-	96
11	KJ161184	98	95	98	98	98	97	98	98	98	98	-

Fonte: Dados da autora (2017).

Os dendrogramas construídos com base na sequência de nucleotídeos e de aminoácidos (FIGURA 11A e B) também mostram LMVcf agrupado, separadamente, e com a mesma proximidade com os isolados KJ161179 e KJ161186, do Chile e da França, respectivamente, observada, anteriormente, nos dendrogramas construídos com base nos nucleotídeos e aminoácidos do genoma completo do LMVcf. Estudos que vêm buscando identificar regiões conservadas entre diversos potyvirus para desenho de primers que poderiam ser utilizados para amplificação de espécies do gênero apontam a NIb como a região mais conservada entre os potyvirus, com uma variância de nucleotídeo média (N score) de 0.55 (ZHENG et al., 2010).

Considerando-se que o LMV é um vírus transmissível pelas sementes, esse isolado pode ter chegado ao Brasil, provenientes de países como a Tunísia e o Chile, via sementes contaminadas, o que justifica a presença desse isolado nas lavouras brasileiras.

Figura 11 - Dendrograma construído com base na sequência de nucleotídeos (A) e aminoácidos (B) da NIB de isolados de LMV. Os valores foram obtidos pelo programa MEGA e teste Neighbor-Joining, com 2.000 repetições.



Fonte: Dados da autora (2017).

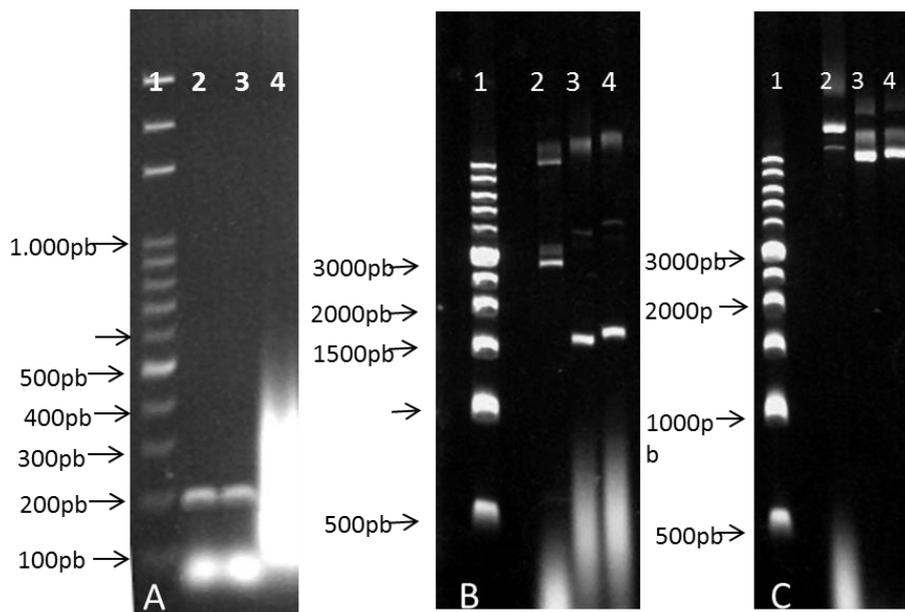
4.5 Expressão das proteínas 6K2 dos dois isolados em plantas fluorescentes

A proteína 6K2 dos potyvirus está associada a processos de rearranjos de membrana para formação de compartimentos para a replicação e movimento intracelular (BEAUCHEMIN; LALIBERTE, 2007; COTTON et al., 2009; GRANGEON et al., 2012), além disso, também está envolvida na indução de sintomas sistêmicos possuindo na região N-terminal uma região importante para o sucesso da infecção e expressão de sintomas em plantas (SPETZ; VALKOMEN, 2004).

Lucas (2014), analisando a sequência da 6K2 do LMVcf, enfatizou que esta era a proteína que mais apresentou variação na sequência de nucleotídeos e aminoácidos, quando comparada com os demais isolados do banco de dados e sugeriu que esta poderia estar associada a indução do sintoma atípico de fechamento de cabeça em alface cv. Regina 579.

Os primers desenhados para amplificação da região codificadora da 6K2 amplificaram um fragmento de 140 pb (FIGURA 12) correspondendo ao tamanho da sequência esperado. Os fragmentos purificados foram inseridos no plasmídeo pDonor221 e a clonagem tanto no vetor de entrada quanto no de expressão foram confirmadas através de gel de eletroforese comparando os tamanhos de banda esperados (figuras da confirmação da clonagem). Além da confirmação por eletroforese, os fragmentos foram enviados para sequenciamento.

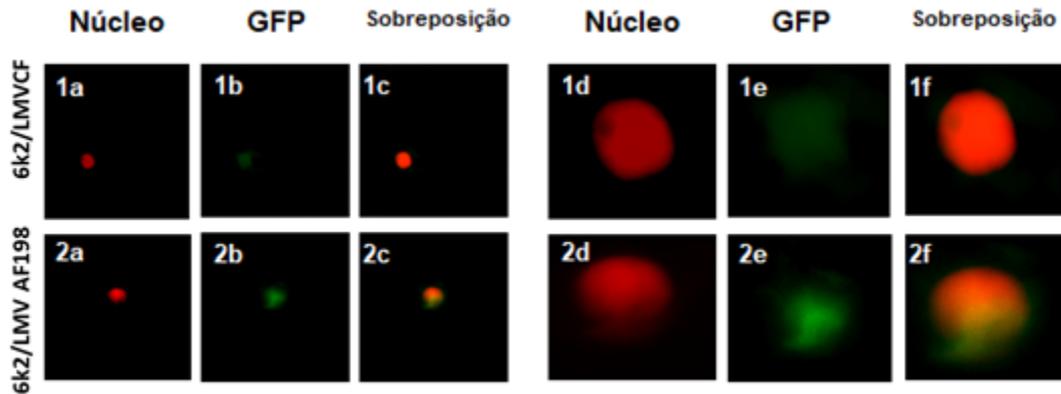
Figura 12 - **(A)** Análise eletroforética da reação em cadeia da Polimerase (PCR) dos produtos de amplificação dos genes do LMV e LMV Cf com seus respectivos tamanhos. 1. Marcador 100pb, 2. LMV, 3. LMV Cf, 4. Plasmídeo controle (pdonor 221). **(B)** Construções gênicas. Análise eletroforética do DNA plasmidial extraído do clone de entrada onde foram clonados os genes do LMV e LMV Cf. 1. Marcador 1Kb, 2. Plasmídeo controle (PDONR 221), 3. LMV, 4. LMV Cf. **(C)** Construções gênicas. Análise eletroforética do DNA plasmidial extraído do clone de expressão onde foram subclonados os genes do LMV e LMV Cf. 1. Marcador 1Kb, 2. Plasmídeo controle (PSITE 2 CA). 3. LMV. 4. LMV Cf.



Fonte: Dados da autora (2017).

Quando as plantas de *Nicotiana benthamiana* transgênicas, que expressam RFP fusionada à histona 2b, foram agroinfiltradas com o plasmídeo de expressão pSITE-2CA, contendo a 6K2 do LMV AF198 ou LMVcf, marcada com GFP na região C-terminal, foi possível observar que 6K2 está localizada no núcleo (FIGURA 13).

Figura 13 - Micrografias utilizando microscópio confocal da 6K2 do LMVcf e LMVAF198 fusionadas ao GFP no C-terminal e expressadas por agroinfiltração em folhas de *N. benthamiana* expressando RFP fusinadas a histona 2b.



Legenda: **1a-d.** Núcleo marcado com RFP. **1b-e.** 6k2 do LMVcf localizada no núcleo. **1c-f.** Sobreposição das imagens enfatizando a 6k2 do LMVcf no núcleo. **2a-d.** Núcleo marcado com RFP. **2b-e.** 6k2 do LMVAF198 localizada no núcleo. **2c-f.** Sobreposição das imagens enfatizando a 6k2 do LMVAF198 no núcleo.

Fonte: Dados da autora (2017).

As imagens obtidas mostram que as proteínas 6K2 das duas estirpes do LMV se encontram no núcleo, porém para os potyvirus como o *Tobacco etch virus* (TEV) e *Turnip mosaic virus* (TuMV) já foi confirmado que a 6K2 associada à VPg-N1aPro formam as vesículas distribuídas nas membranas do retículo endoplasmático que são sítios de replicação viral (COTTON et al., 2009; LEONARD et al., 2004; SCHAAD; JENSEN; CARRINGTON, 1997).

Nenhum relato de 6K2 ligada a processos da infecção viral que acontecem no núcleo foi encontrado, todos os papéis dessa proteína estão associados a movimento no citoplasma ou em membranas celulares; assim, é importante que mais estudos sejam realizados para confirmação desse resultado. Um ponto importante para a confirmação do resultado é avaliar a posição na qual a proteína fluorescente deve ser fundida, se no terminal C- ou N- da proteína alvo. Fusões no N-terminal têm potencial de interferir em marcações de proteínas no retículo endoplasmático, mitocôndria e plastídios, já fusões no C-terminal podem causar alterações na localização da proteína alvo, podendo causar erros de interpretação nos estudos de localização (TIAN et al., 2009).

As proteínas fluorescentes expressadas em frame com proteínas de interesse são importantes no estudo de vírus de plantas, uma vez que a natureza intracelular dos vírus reforça a necessidade de compreender a interação com o hospedeiro das suas proteínas e ácidos nucleicos e, ainda, o papel de cada proteína na replicação, movimento, encapsulação e

supressão de defesas das células do hospedeiro. Continuar o estudo da proteína 6K2 de isolados de LMV e, também, de outras proteínas que apresentam variação na sequência de aminoácidos é importante para elucidar essa diferença na indução de sintomas, observada frequentemente no campo. Entender essas diferenças geram informações importantes que podem ser diretamente aplicadas nos programas de melhoramento.

5 CONCLUSÕES

- a) Notou-se uma clara diferença entre a interação dos isolados de LMV e as cultivares de alface inoculadas, evidenciada pela reação sintomatológica das plantas aos isolados;
- b) Apesar de não terem sido detectados em plantas assintomáticas por sorologia, todas as plantas inoculadas reagiram positivamente quando testadas por RT-PCR indicando a presença do vírus;
- c) A análise do genoma completo do LMV-Cf não mostrou diferenças significativas quando esse foi comparado com outros isolados do Genbank, indicando que a interação diferencial desse isolado com a planta hospedeira deve estar ligada a alguma substituição pontual de poucos aminoácidos;
- d) Quando expressadas nas plantas, a proteína 6K2, de ambos os isolados estudados, se localizou no núcleo, não mostrando diferença em sua localização.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-CAREEM, M. F. et al. Development of a real-time PCR assay using SYBR Green chemistry for monitoring Marek's disease virus genome load in feather tips. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 133, n. 1, p. 34-40, Apr. 2006.
- ABDULLAH, I. et al. Investigation on seed transmission of cucumber mosaic virus in cowpea. **African Crop Science Journal**, Kampala, v. 9, n. 4, p. 677-684, 2001.
- ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; BEAUDOIN, F. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 471-487, July 2005.
- ADAMS, W. S. J. et al. **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses**. Amsterdam: Elsevier, 2017.
- ANINDYA, R.; SAVITHRI, H. S. Potyviral NIa proteinase, a proteinase with novel deoxyribonuclease activity. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 31, p. 32159-32169, July 2004.
- BANANEJ, K. et al. Molecular and serological identification of cucumber leaf spot virus in Iran. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 162, n. 3, p. 205-208, Mar. 2013.
- BARRIÈRE, V. et al. Lettuce cropping with less pesticides: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Les Ulis, v. 34, n. 1, p. 175-198, Jan. 2014.
- BEAUCHEMIN, C.; LALIBERTE, J. F. The poly(A) binding protein is internalized in virus-induced vesicles or redistributed to the nucleolus during turnip mosaic virus infection. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 81, n. 20, p. 10905-10913, Oct. 2007.
- BESERRA JUNIOR, J. E. A. **Determinantes virais associados às diferentes propriedades biológicas de dois isolados de Lettuce mosaic virus (LMV): cinética da infecção viral e infecção dos tecidos embrionários**. 2008. 78 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.
- BORGES, L. M. **Controle de viroses em alface por meio de métodos integrados de manejo da cultura**. 2006. 118 p. Tese (Doutorado em Agronomia Horticultura) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.
- BOS, L.; HUIJBERTS, N.; CUPERUS, C. Further observations on variation of lettuce mosaic virus in relation to lettuce (*Lactuca sativa*), and a discussion of resistance terminology. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 100, n. 5, p. 293-314, Oct. 1994.
- CHAKRABARTY, R. et al. PSITE vectors for stable integration or transient expression of autofluorescent protein fusions in plants: probing *Nicotiana benthamiana*-virus interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, Saint Paul, v. 20, n. 7, p. 740-750, July 2007.

CHUNG, R. M.; AZEVEDO FILHO, J. A. de; COLARICCIO, A. Avaliação da reação de genótipos de alface (*Lactuca sativa* L.) ao *Lettuce mosaic virus* (LMV). **Bragantina**, Campinas, v. 66, n. 8, p. 61-68, 2007.

CHUNG, R. M. **Reação de linhagens e cultivares de alface ao *Lettuce mosaic virus* (Patotipo IV)**. 2005. 43 p. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal) - Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2005.

CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked-immunosorbent-assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, London, v. 34, n. 3, p. 475-483, Mar. 1977.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **CONAB corporativa**. Brasília: Conab, 2016. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 5 abr. 2016.

_____. **CONAB corporativa**. Brasília: Conab, 2017. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 2 out. 2017.

COTTON, S. et al. Turnip mosaic virus RNA replication complex vesicles are mobile, align with microfilaments, and are each derived from a single viral genome. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 83, n. 20, p. 10460-10471, Oct. 2009.

DINANT, S.; LOT, H. Lettuce mosaic virus. **Plant Pathology**, Oxford, v. 41, n. 5 p. 528-542, Oct. 1992.

DUARTE, P. de S. G. et al. Establishment of a bank of positive controls for diagnosis of quarantine viruses and viroids in Brazil through PCR and RT-PCR. **Crop Protection**, Guildford, v. 86, p. 31-41, Aug. 2016.

DUFRESNE, P. J. et al. Heat shock 70 protein interaction with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase within virus-induced membrane vesicles. **Virology**, New York, v. 374, n. 1, p. 217-227, Apr. 2008.

FIGUEIRA, A. R. **Manejo de doenças viróticas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 99 p.

_____. **Viroses da batata: situação atual e perspectivas futuras. Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 197, p. 86-96, mar./abr. 1999.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2. ed. rev. ampl. Viçosa: Ed. UFV, 2003. 412 p.

FIRMINO, A. C. et al. 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, abr./jun. 2008.

GERMAN-RETANA, S.; WALTER, J.; LE GALL, O. *Lettuce mosaic virus*: from pathogen diversity to host interactors. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 127-136, Mar. 2008.

GRANGEON, R. et al. Impact on the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus of Turnip mosaic virus infection. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 86, n. 17, p. 9255-9265, Sept. 2012.

HADID, A. et al. Detection of potato leafroll and strawberry mild yellow-edge luteoviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, p. 595-601, June 1993.

HENZ, G. P.; SUINAGA, F. **Tipos de alface cultivados no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2009. 7 p. (Comunicado Técnico, 75).

HONG, Y.; HUNT, A. G. RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. **Virology**, New York, v. 226, n. 1, p. 146-151, Dec. 1996.

ISMAIL, H.; MIRZA, B. Evaluation of analgesic, anti-inflammatory, anti-depressant and anti-coagulant properties of *Lactuca sativa* (CV. Grand Rapids) plant tissues and cell suspension in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 15, p. 199, June 2015.

JACKWOOD, M. W.; KWON, H. M.; HILT, D. A. Infectious bronchitis virus detection in allantoic fluid using the polymerase chain reaction and a DNA probe. **Avian Diseases**, Ithaca, v. 36, n. 2, p. 403-409, Apr./June 1992.

JAGGER, I. C. A transmissible mosaic disease of lettuce. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 20, n. 10, p. 737-741, 1921.

KASSANIS, B. Intracellular inclusions in virus infected plants. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v. 26, n. 4, p. 705-709, Nov. 1939.

KNUHTSEN, H.; HIEBERT, E.; PURCIFULL, D. E. Partial purification and some properties of tobacco etch virus induced intranuclear inclusions. **Virology**, New York, v. 61, n. 1, p. 200-209, Sep. 1974.

KRAUSE-SAKATE, R. et al. Molecular and biological characterization of *Lettuce mosaic virus* isolates reveals a distinct and widespread type of resistance-breaking isolate: LMV-Most. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, n. 5, p. 563-572, May 2002.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças das solanáceas (beringela, jiló, pimentão e pimenta), In: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 665-675.

LEONARD, S. et al. Interaction of VPg-Pro of Turnip mosaic virus with the translation initiation factor 4E and the poly(A)-binding protein in planta. **Journal of General Virology**, London, v. 85, n. 4, p. 1055-1063, Apr. 2004.

LIM, S. et al. Characteristics of a Lettuce mosaic virus isolate infecting lettuce in Korea. **Plant Pathology Journal**, Suwon, v. 30, n. 2, p. 183-187, June 2014.

LUCAS, M. A. **Sequenciamento genômico parcial de um isolado atípico do Lettuce mosaic virus (LMV)**. 2014. 72 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

MARTÍNEZ, F. et al. Interaction network of tobacco etch potyvirus NIa protein with the host proteome during infection. **BMC Genomics**, London, v. 17, p. 87, Feb. 2016.

MAZIER, M. et al. A simple and efficient method for testing *Lettuce mosaic virus* resistance in in vitro cultivated lettuce. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 116, n. 2, p. 123-131, Mar. 2004.

MOU, B.; RYDER, E. J. A green leaf lettuce breeding line with resistance to leafminer and lettuce mosaic virus. **HortScience**, Alexandria, v. 45, n. 4, p. 666-667, Apr. 2010.

NEI, M.; GOJOBORI, T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 3, n. 5, p. 418-426, Sept. 1986.

OLIVEIRA, F. A. et al. Identificação e caracterização de um isolado do vírus do mosaico do alface (*Lettuce mosaic virus* - LMV). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 31, n. 4, p. 297-304, 2005.

PAVAN, M. A. et al. Virus diseases of lettuce in Brazil. **Plant Viruses**, Warwick, v. 2, n. 1, p. 35-41, Nov. 2008.

PEYPELUT, M. et al. Specific detection of Lettuce mosaic virus isolates belonging to the "Most" type. **Journal of Virological**, Amsterdam, v. 121, n. 1, p. 119-124, Oct. 2004.

PINK, D. A. C.; LOT, H.; JOHNSON, R. Novel pathotypes of lettuce mosaic virus breakdown of a durable resistance. **Euphytica**, Dordrecht, v. 63, p. 169-174, 1992.

POTYVIRIDAE. **ViralZone**, Lausana, 2016. Disponível em: <http://viralzoneexpasy.org/all_by_species/50.html>. Acesso em: 15 jan. 2017.

REVERS, F. et al. Biological and molecular variability of lettuce mosaic virus isolates. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 4, p. 397-403, Apr. 1997.

REVERS, F.; GARCÍA, J. A. Molecular biology of potyviruses. In: MARAMOROSCH, K.; METTENLEITER, T. **Advances in virus research**. New York: Academic Press, 2015. v. 92, Chap. 3, p. 101-199.

SALA, F. C.; COSTA, C. P. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 30, n. 2, p. 187-194, abr./jun. 2012.

SCHAAD, M. C.; JENSEN, P. E.; CARRINGTON, J. C. Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. **The EMBO Journal**, Eynsham, v. 16, n. 13, p. 4049-4059, July 1997.

SHANG, H. et al. Monoclonal antibody-based serological methods for detection of Cucumber green mottle mosaic virus. **Virology Journal**, London, v. 8, p. 228, May 2011.

SHARMA, A. et al. Contributions of the prion protein sequence, strain, and environment to the species barrier. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 291, p. 1277-1288, Nov. 2016.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W. Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. **Archives of Virology**, Wien, v. 106, n. 3/4, p. 171-200, 1989.

SPETZ, C.; VALKONEN, J. P. T. Potyviral 6K2 protein long-distance movement and symptom-induction functions are independent and host-specific. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, Saint Paul, v. 17, p. 502-510, 2004.

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

SUGAWARA, K. et al. A replicase of Potato virus X acts as the resistance-breaking determinant for JAX1-mediated resistance. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, Saint Paul, v. 26, n. 9, p. 1106-1112, Sept. 2013.

THOMSON, D.; DIETZGEN, R. G. Detection of DNA and RNA plant viruses by PCR and RT-PCR using a rapid virus release protocol without tissue homogenization. **Journal Virology Methods**, Amsterdam, v. 54, n. 2/3, p. 85-95, Aug. 1995.

TIAN, L. et al. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. **Nature Methods**, New York, v. 6, n. 12, p. 875-881, Dec. 2009.

WISLER, G. C.; DUFFUS, J. E. A century of plant virus management in the Salinas Valley of California, "East of Eden". **Virus Research**, Amsterdam, v. 71, n. 1/2, p. 161-169, Nov. 2000.

ZERBINI, F. M. **FIP 630 - Virologia vegetal**. Viçosa: Ed. UFV, 1998. p. 22-25. Notas de Aula.

ZHENG, L. et al. A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. **Plant Pathology**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 211-220, Apr. 2010.