

Luciana Márcia Espinha de Sant'Ana

Caracterização de um Isolado do Vírus
do Mosaico do Pepino Obtido de
Catharantus Roseus



1910000913



LUCIANA MÁRCIA ESPINHA DE SANT'ANA

**CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO DO VÍRUS
DO MOSAICO DO PEPINO OBTIDO DE**
Catharantus roseus



Dissertação apresentada para
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biológicas-Genética.

Orientador: Prof. Dr. José Osmar Gaspar

São José do Rio Preto - SP

1999

LUCIANA MÁRCIA ESPINHA DE SANT'ANA

**CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO DO VÍRUS
DO MOSAICO DO PEPINO OBTIDO DE
*Catharantus roseus.***

Dissertação apresentada para obtenção do
Grau de Mestre em Genética no Curso de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas, Área de
Concentração em Genética, do Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista - UNESP.

já enviado

Orientador: Prof. Dr. José Osmar Gaspar



913/00

**São José do Rio Preto
1999**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fitovirologia, departamento de Botânica, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (IBILCE), Universidade Estadual Paulista (UNESP), com auxílio-bolsa CNPQ.



Dedico este trabalho

*A António Espinha e Helena
Maria Rogério Espinha, pelo amor,
educação e incentivo ao crescimento em
todos os aspectos da vida.*

*À minha querida irmã
Susana, pela ajuda, por me fazer lembrar
que posso contar com uma pessoa única
como você.*

*Ao meu querido Francisco,
que soube ser paciente e compreensivo, me
auxiliando nas decisões difíceis.*



Ao meu orientador, Prof. Dr. José Osmar Gaspar, que desde o primeiro ano de faculdade, me orientou e muito me ensinou estando sempre disponível, demonstrando verdadeira dedicação ao trabalho e além disso, grande amigo. Sou imensamente grata.



AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho, expresso agora, a minha gratidão, ao permanente apoio e incentivo das pessoas que convivem comigo, tornando o ambiente o mais agradável. A conclusão deste trabalho somente foi possível graças à colaboração, direta ou indireta, de todos aqueles que de diferentes formas estiveram nele envolvidos.

É com especial carinho que agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. José Osmar Gaspar, pela incansável orientação, por todos os momentos de auxílio, constantemente preocupado com minha formação científica, pelo companheirismo e dedicação constantes, sem os quais este trabalho não seria possível.

À Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, pelos ensinamentos na graduação e pós-graduação, pelo apoio e cooperação nos momentos mais importantes e pela cuidadosa análise da pró-forma e sugestões.

Ao Prof. Dr. Jorge Vega (UNICAMP) pela acurada análise da pró-forma e valiosas sugestões que contribuíram para aprimorar esta tese.

Ao Prof. Dr. James Robert Coleman, do Departamento de Botânica, por sua colaboração na elaboração do "Summary".

À Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, Profa. Dra. Ana Elizabete Silva, pela colaboração inestimável e atenção nos problemas burocráticos.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação, pelos preciosos ensinamentos durante o desenvolvimento do Curso de Mestrado, onde pude contar com a colaboração de todos, em especial às Professoras Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo e Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva.

À Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, UNESP, pelo fornecimento dos recursos materiais.

Aos Professores Dr. Roberto da Silva e Dra. Eleni Gomes pela presteza e solicitude na utilização das dependências do laboratório de



Microbiologia e Bioquímica, assim como os Professores do Departamento de Física na utilização das dependências dos Laboratórios.

Às Professoras Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto e Nívea Dulce Comforti Froes pelo acesso ao laboratório e equipamentos.

Ao Professor Dr. Jorge A.M. Rezende (ESALQ) e Dra. Antonia R. Figueira (UFLA), pela doação dos isolados de Maracujá e Banana, respectivamente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela concessão da Bolsa de Mestrado.

Às chefias e professores dos Departamentos de Botânica, Biologia, Zoologia, Química, Física, pela facilidade de acesso e uso de equipamentos e material, pelo ensino transmitido e estímulo, que possibilitaram o ingresso no Curso de Pós-Graduação.

A todos os funcionários e técnicos dos Departamentos de Biologia, Botânica, Zoologia e Física, Biblioteca, Pólo Computacional e Seção de Pós-Graduação, principalmente à Maria Helena Carabolante, Ademir de Oliveira Veshi, Izabelino Fávaro, Josué Rodrigues dos Santos, João Rodrigues dos Santos, Rosana Silistino de Souza, Jorge Freytag Buchid, Nanci Queiroz de A. Pereira e Oscar José Marques, pela presteza nas diversas tarefas que desempenham.

À todos os colegas do Curso de Pós-Graduação, pelo incentivo constante, amizade e auxílio, especialmente à Juliana Polachini de Castro, amiga de todas as horas, à Patrícia Caetano de Souza, à Paula H. V. Bosso, à Rosa M. V. Bosso e ao Marcos H. R. Estécio .

Às minhas queridas amigas de trabalho do Laboratório de Fitovirologia, Priscila Belintani, Andréia Estela Moreira e Ana Cláudia Maritan, pela amizade e apoio constante e convivência agradável, obrigada, pois pude contar com vocês em todos os momentos.

Ao colega de trabalho Roberto Ruller, pela amizade e disponibilidade nos ensinamentos das técnicas de clonagem.

À minha querida irmã Susana, por seu companheirismo, apoio e dedicação recebidos em todas as ocasiões.

Aos meus pais Antonio e Helena, por todo o carinho, exemplo, amor e esforços realizados para a minha formação profissional.

Ao meu querido sobrinho Neto, que a cada sorriso nos contagia.

Ao meu esposo Francisco, pelo amor, compreensão, paciência e estímulos irrestritos.

Muito Obrigada.

Agradeço...

À DEUS...

... que, incomparável e inconfundível na Sua infinita bondade, compreendeu os meus anseios e me deu a necessária coragem para atingir o meu objetivo, ofereço o meu porvir e peço forças para sempre agir com eficiência em meu trabalho e acerto em minhas decisões.

*"Aventurar-se causa
ansiedade, mas deixar de arriscar-se
é perder a si mesmo.... E aventurar-se
no sentido mais elevado é
precisamente tomar consciência de si
próprio".*

Kierkegaard

ÍNDICE

I. Introdução	01
II. Revisão de Literatura	03
1. Propriedades Biológicas	03
2. Propriedades do vírion (partícula viral)	07
3. Organização do Genoma	08
4. Subgrupos	13
5. Citopatologia	14
III. Materiais e Métodos	18
Vírus e plantas.....	18
Purificação	18
Espectrofotometria	19
Microscopia eletrônica do vírus purificado	19
Extração de proteínas	19
Eletroforese	20
“Western blot”	20
Extração do RNA viral	21
Produção de sonda não radioativa	21
Especificidade da sonda	22
Extração de RNA total de folhas	22
Gel desnaturante de agarose	22
“Northern blot”	23
Hibridização	23
Detecção dos híbridos	23
Extração de RNA de fita dupla	24
Amplificação por transcriptase reversa/reação em cadeia pela polimerase	24
Digestão dos produtos do PCR por enzimas de restrição	25
Eletroforese em gel nativo de agarose	25
Produção de sonda a partir do PCR	26



Preparação do tecido vegetal para análise ultraestrutural	26
Preparação do tecido para imunomarcação	27
Imunolocalização <i>in situ</i> da proteína capsidial	27
IV. Resultados	29
Hospedeiras e sintomatologia	29
Obtenção do vírus purificado	30
Massa molecular da proteína capsidial	30
Detecção do CMV em extratos de folha	30
Análise do RNA viral	30
Produção de sondas não radioativas	31
Especificidade da sonda	31
Identificação de RNAs associados ao CMV em extratos de folha infectada.	31
Extração e identificação de RNAs de fita dupla associados ao CMV	31
Amplificação por RT/PCR	32
Análise dos fragmentos por RFLP	32
Citopatologia e imunolocalização da proteína capsidial do CMV.....	33
V. Discussão	53
VI. Conclusões	62
VII. Resumo	63
VIII. Summary	65
IX. Literatura citada	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sintomatologia induzida pelo vírus do mosaico do pepino	34
Figura 2. Eletroforese das frações obtidas antes e após a filtração em gel de Sephacryl S-1000	35
Figura 3. Aparelhagem utilizada para filtração em gel Sephacryl S-1000.....	36
Figura 4. Espectro de absorção do vírus do mosaico do pepino purificado.....	37
Figura 5. Partículas do CMV-Cr observadas ao microscópio eletrônico de transmissão.....	38
Figura 6. Determinação da massa molecular da proteína capsidial do CMV...	39
Figura 7. Perfil eletroforético de extrato de planta sadia, planta infectada, CMV purificado e "Western blot" e reação imunológica de um gel similar...	40
Figura 8. Análise do RNA viral	41
Figura 9. Determinação da especificidade da sonda.....	42
Figura 10. Análise por "Northern blot" de RNAs do CMV	43
Figura 11. Análise por "Northern blot" com sonda específica para o CMV.....	44
Figura 12. Perfil eletroforético dos dsRNAs	45
Figura 13. Amplificação dos cDNAs da região da capa proteica através de RT-PCR.....	46
Figura 14. Análise dos produtos amplificados digeridos por endonucleases de restrição Eco RI e Bam HI	47
Figura 15. Análise dos produtos amplificados digeridos pela endonuclease de restrição Msp I	48
Figura 16. Micrografia eletrônica de célula de fumo infectada pelo CMV-Cr...	49
Figura 17. Micrografias eletrônicas de células de folha de fumo infectadas pelo CMV-Cr	50
Figura 18. Imunomarcagem de proteínas da capa proteica viral em tecido foliar de planta de fumo infectada pelo CMV-Cr	51
Figura 19. Controle de reação de célula de folha de fumo infectada pelo CMV-Cr	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS UTILIZADAS

Bam HI	endonuclease de restrição
BIO	Biotina
<i>C. roseus</i>	<i>Catharantus roseus</i>
cDNA	DNA complementar
CMV	Vírus do mosaico do pepino
CMV-Cr	Vírus do mosaico do pepino isolado de <i>Catharantus roseus</i>
Da	Daltons
DI RNAs	"Defective interfering RNAs"
DIG	Digoxigenina
dsRNA	RNA de fita dupla
DTL	Subgrupo do CMV = subgrupo II
Eco RI	endonuclease de restrição
IgG	Imunoglobulina
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltons
M	Molar
Msp I	endonuclease de restrição
ORF	"Open read frame"
Pb	pares de bases
PCR	"Polimerase chain reaction"
PSV	"Peanut stunt cucumovirus"
RFLP	"Restriction fragment lenght polimorfism"
RT	transcrição reversa
TAV	"Tomato aspermy virus"
TMV	"Tobacco mosaic virus"
ToRS	Subgrupo do CMV = subgrupo I
<i>V. minor</i>	<i>Vinca minor</i>

I. INTRODUÇÃO

O vírus do mosaico do pepino ("Cucumber Mosaic Virus", CMV) é a espécie tipo do gênero *Cucumovirus* (Francki *et al.*, 1979), pertencente à família *Bromoviridae* e a doença causada por este vírus, em pepino, foi primeiramente descrita por Silby (1903) e posteriormente demonstrada ser de natureza virótica por Doolittle (1916) e Jagger (1916).

O CMV é encontrado na maioria dos países, predominantemente em zonas temperadas, ocorrendo também em países tropicais (Kaper & Waterworth, 1981). O CMV tem uma extensa gama de hospedeiras em todo o mundo, distribuído desde plantas herbáceas até arbustivas. Num levantamento publicado por Douine e colaboradores (1979), o número de hospedeiras do CMV era de 775 espécies distribuídas em 365 gêneros de 85 famílias, sendo que este número vêm aumentando e deve estar atualmente em torno de 1000 espécies.

No Brasil, a ocorrência do CMV foi primeiramente descrita em São Paulo (Silberschmidt & Nóbrega, 1941), ocasionando mosaico, necrose e morte de bananeira. Posteriormente, o vírus do mosaico do pepino foi identificado como agente causador de doença em hospedeiras de importância econômica como, tomate, leguminosas, cereais, ornamentais, melão, batata-doce, pimenta-do-reino, maracujá, etc.

Entre as hospedeiras do CMV inclui-se *Catharantus roseus* (L) G. Don. (*Vinca rosea*), vulgarmente conhecida como boa-noite, maria-sem-vergonha e vinca, uma ornamental, pantropical, apreciada em jardins e praças públicas em pequenas cidades do interior por florescer o ano inteiro e nada exigir em matéria de trato. Encerra, nas folhas e raízes, cerca de 60 alcalóides, seis dos quais sabe-se que detêm o crescimento de vários tumores malignos e o progresso de processos leucêmicos, citando-se a vimblastina e vincristina que chegaram à meta de aplicação clínica (Rizzini & Mors, 1976). Em outros países, a planta é amplamente reputada como hipoglicemiante, afirmando-se curar o diabetes. Embora tal fama seja sem dúvida exagerada, o uso de extratos de *Catharantus* para este fim tem algum



mérito, pois há evidência experimental para certa ação hipoglicemiante de seis dos seus alcalóides (Rizzini & Mors, 1976).

Em São José do Rio Preto, região noroeste paulista, é comum encontrarem-se plantas de *C. roseus* exibindo sintomas de mosaico e distorção foliar (Espinha *et al.*, 1994). O fato de plantas de *C. roseus* infectadas pelo CMV terem sido encontradas anteriormente também em outras regiões do Estado de São Paulo, constitui indicativo de que o vírus pode ter uma distribuição geográfica bem mais ampla nessa hospedeira, constituindo-se em importante fonte de inóculo para outras culturas de significância econômica. Assim, uma melhor caracterização do CMV torna-se de interesse.

O presente trabalho tem como objetivo geral a caracterização do vírus do mosaico do pepino isolado de *C. roseus* (doravante denominado CMV-Cr). Constituem objetivos específicos a purificação das partículas virais; a determinação da massa molecular capsidial; a extração, identificação e análise dos RNAs genômicos e subgenômicos; a determinação da presença ou ausência de RNA satélite; a extração e análise de RNAs de fita dupla; a produção de sonda não radioativa; a imunolocalização subcelular da proteína capsidial através de microscopia eletrônica de transmissão e a determinação do subgrupo ao qual pertence o isolado do CMV, pelas técnicas de RT-PCR/RFLP.



II. REVISÃO DE LITERATURA

1. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

O gênero cucumovirus contém três espécies distintas: "cucumber mosaic virus" (CMV), "peanut stunt cucumovirus" (PSV) e "tomato aspermy virus" (TAV) (Kaper & Waterworth, 1981). Esses vírus mostram similaridades na morfologia da partícula, transmissão por vetor e organização genômica, embora possam ser diferenciados sorologicamente, pela gama de hospedeiras, pelo peso molecular e pela sequência do ácido nucléico (Kaper & Waterworth, 1981; Diaz-Ruiz & Kaper, 1983).

O CMV possui uma grande gama de hospedeiras naturais, sendo a patologia ocasionada por este vírus muito variável. Apesar do mosaico ser o sintoma mais comum ocasionado pelo CMV (Doolittle, 1916; McLean *et al.*, 1962 apud Palukaitis *et al.*, 1992; Kahn & Scott, 1964; Demski, 1969 apud Palukaitis *et al.*, 1992; Bird *et al.*, 1971; Gracia & Feldman, 1977), a severidade da doença pode variar desde nenhum sintoma óbvio em algumas hospedeiras até a morte de outras (McKinney, 1953; Panjan, 1966 apud Palukaitis *et al.*, 1992; Marrou & Putz, 1973 apud Palukaitis *et al.*, 1992; Marrou & Duteil, 1974).

No Brasil, a primeira citação da ocorrência do CMV foi em São Paulo (Silberschmidt & Nóbrega, 1941) ocasionando mosaico, necrose e até morte da bananeira. A ocorrência do vírus do mosaico do pepino em bananeira foi também relatada nos Estados do Rio de Janeiro, Pernambuco e Ceará (Ribeiro *et al.*, 1975; Medeiros, 1963). Infecção natural de bananeira cultivar "Prata" foi relatada no Estado de Minas Gerais, causando sintomas de clorose e ondulações nas bordas (Zambolim *et al.*, 1994).

Em Fortaleza, foram coletadas amostras foliares infectadas pelo CMV de *Justicia sp.*, conhecida vulgarmente pela denominação de "anador", apresentando manchas e anéis concêntricos amarelo-esbranquiçados (Araípe & Lima, 1993).



Plantas de ervilha no Estado do Mato Grosso do Sul, apresentando sintomas de encurtamento de entre-nós e deformação foliar, mostraram-se infectadas com o CMV (Dusi *et al.*, 1992).

O maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg.) também é susceptível a infecção natural pelo CMV. O registro foi feito em São Paulo (Cereda, 1983; Colariccio *et al.*, 1984) e na Bahia (Chagas *et al.*, 1984) ocasionando nas plantas afetadas, manchas cloróticas nas hastes, frutos deformados e pequenos, pontuações e anéis de coloração amarelo intenso nas folhas.

O vírus ocorre naturalmente também em olerícolas como melão (*Cucumis melo* L.) e maxixe (*Cucumis anguria* L.), descrito em São Paulo (Lin *et al.*, 1980), ocasionando sintomas de mosaico e malformação foliar.

Em pepino (*Cucumis sativus* L.), o vírus foi identificado em São Paulo (Costa *et al.*, 1972) e no Paraná (Lima Neto *et al.*, 1983).

A ocorrência do vírus infectando tomate e alface foi registrada no Estado de São Paulo (Costa, 1983) ocasionando no tomate, folha do tipo "cordão de sapato" e na alface, mosaico.

O vírus foi registrado, também, no Estado de São Paulo em *Asclepias curassavica* L. ocasionando bandas cloróticas anelares (Silberschmidt, 1955) sendo identificado pela reação em plantas indicadoras.

Infecção natural do CMV em *Salvia splendens* no Estado de São Paulo, ocasionando nanismo, mosaico e deformação foliar foi relatada por Kudamatsu *et al.* (1981).

Alamanda (*Alamanda cathartica* L.) "Nobilis" apresentando manchas foliares anelares foi citada por Rodrigues *et al.* (1984), em Brasília (Goiás), como naturalmente infectada pelo CMV.

Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) apresentando sintomas de mosaico foi citado por Silberschmidt (1963) no Paraná, como planta infectada naturalmente com o CMV. Outra leguminosa susceptível ao vírus é o caupi (*Vigna unguiculata* Walp.), sendo a infecção natural desta, registrada no Ceará (Lima & Santos, 1985), em infecção dupla com "Cowpea Aphid-Borne Mosaic Virus", apresentando sintoma de mosaico e necrose sistêmica. A infecção natural nesta hospedeira também foi

registrada em Goiás (Lin *et al.*, 1981), Piauí (Lin *et al.*, 1982) e no Rio Grande do Norte (Lin & Símplicio, apud Lin, 1982). Nestes casos, os sintomas na planta se apresentavam na forma de clareamento de nervura, mosqueado e nanismo.

O milho (*Zea mays* L.) foi citado por Costa & Kitajima (1972), no Estado de São Paulo, como planta infectada pelo CMV apresentando estrias cloróticas alongadas incluindo ou não a nervura, nanismo e mosaico.

Costa & Robbs (1971) citaram a ocorrência do vírus no Estado do Rio de Janeiro, afetando a baunilha (*Vanilla phanifolia* Andreuws) a qual apresentava como sintomatologia a morte dos ponteiros da planta.

Jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) apresentando sintomas de mosaico (Kitajima *et al.*, 1980), *Euphorbia splendens* Bojer (Silberschmidt & Flores, 1962) e melão São Caetano (*Momordica balsamina* L.) citado por Barradas e colaboradores (1979), têm sido descritos como plantas naturalmente infectadas pelo CMV.

Fumo (*Nicotiana tabacum* L.) infectado naturalmente com o CMV foi encontrado em Sergipe e Santa Catarina (apud Brioso, 1986) apresentando sintoma de mosaico.

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) foi registrada como susceptível ao vírus, nos Estados do Pará (Caner, 1969; Costa *et al.*, 1970; Kitajima *et al.*, 1980) e São Paulo (Caner & Ikeda, 1972), apresentando sintomas de redução do sistema radicular, encurtamento dos entre-nós, mosaico, nanismo, cachos pequenos e mal formação de grãos. A virose foi confirmada em *Piper nigrum*, no Espírito Santo, por Maciel-Zambolim e colaboradores (1981) mediante a verificação dos sintomas em indicadoras, microscopia eletrônica e testes sorológicos. A caracterização parcial do vírus isolado de *Piper nigrum* foi relatada por Maciel-Zambolim e colaboradores (1990).

Commelina benghalensis, *C. erecta* e *Tradescantia elongata* (Commelinaceae), foram relatadas como hospedeiras naturais do CMV em diferentes regiões do Estado de São Paulo (Duarte *et al.*, 1994).

Algumas plantas ornamentais, também têm sido registradas como naturalmente susceptíveis ao CMV. Dentre essas, podem-se citar as infecções



ocorridas no Estado de São Paulo em *Alostromeria sp.*, *Gladiolus sp* e *Vinca rosea* L. (Costa, 1983). Em São José do Rio Preto (São Paulo), plantas de *Catharantus roseus* exibindo sintomas de infecção viral caracterizados por mosaico e distorção foliar mostraram-se infectadas pelo CMV (Espinha *et al.*, 1994).

A orquídea (*Dendrobium nobile* Lindl.) foi citada por Nóbrega (1947), como hospedeira natural do CMV, no Estado de São Paulo, apresentando sintomas de nanismo, clorose generalizada, redução do tamanho foliar, encurtamento do entre-nó e nas folhas mais novas mosaico, manchas cloróticas e riscas brancas deprimidas.

Uma característica notável da epidemiologia do CMV é que este vírus é transmitido por numerosas espécies de afídios. Fritzsche e colaboradores (1972) apud Palukaitis (1992), listaram cerca de 75 espécies que transmitem o CMV. Kennedy e colaboradores (1962) listaram mais de 60 espécies, especialmente *Aphis gossypii* e *Myzus persicae*, como vetores do CMV, transmitindo-o de maneira não persistente. Assim, os afídios podem adquirir o vírus de plantas infectadas e inoculá-los em plantas sadias, em menos de 1 minuto, isto é, não há um período de latência ou espera antes que o vírus possa ser transmitido.

Em relação à transmissão mecânica, este vírus é facilmente transmitido mecanicamente para uma grande variedade de hospedeiras (Francki, 1985). Dependendo da planta e do isolado do vírus, pode ser acrescentado ao inóculo vários aditivos para facilitar a transmissão. Um tampão comum utilizado para a transmissão em hospedeiras herbáceas é o tampão fosfato 0,025 M, pH 7,2, contendo 0,02 M DIECA, como recomendado por Kaper e Waterworth (1981).

O CMV pode também ser transmitido via semente em cerca de 20 espécies (Phatak, 1974; Neergaard, 1977). A taxa de transmissão pela semente pode variar, sendo correspondente à 0.2% em tomate, 7% em abóbora e feijão, de 4 a 28% em caupi e de 0.3% (Provvidenti, 1976) a 30% entre variedades de feijão (Marchoux *et al.*, 1977).

A transmissão do CMV através de fungos, nematóides e por contato de planta com planta, não é conhecida (Kaper & Waterworth, 1981).

2. PROPRIEDADES DO VÍRION (PARTÍCULA VIRAL)

Estruturalmente, o CMV é um vírus icosaédrico, estabilizado quase exclusivamente por interações entre seus RNAs e componentes proteicos (Kaper & Geelen, 1971).

As partículas do CMV são isométricas, com 28 a 30 nm de diâmetro (Finch *et al.*, 1967), cuja capa proteica envolve RNA de fita única de polaridade positiva, sendo que as partículas contêm cerca de 18% de RNA (Kaper & Re, 1974). O capsídio consiste de 180 subunidades proteicas idênticas (Finch *et al.*, 1967) com massa molecular de aproximadamente 24,500 Da (van Regenmortel *et al.*, 1972; Habili & Francki, 1974).

O capsídio do CMV possui diâmetros externos e internos de 29 e 16.5 nm, respectivamente, como determinado por Jacrot e colaboradores (1977). A partícula possui um centro electron-denso de 12 nm de diâmetro (Francki *et al.*, 1966; Finch *et al.*, 1967; Tolin, 1977). A estabilidade das partículas virais depende das interações eletrostáticas entre proteína e RNA, como indicado pela rápida desintegração em baixas quantidades de duodecil sulfato de sódio ou altas concentrações de sais cloretos neutros (Francki *et al.*, 1966; Kaper & Geelen, 1971). Ribonucleases podem penetrar em capsídios intactos e degradar os RNAs (Francki, 1968; Kaper & Geelen, 1971; Habili & Francki, 1974). Este fato pode explicar o aparecimento de partículas com os centros vazios (Jacrot *et al.*, 1977). As partículas do CMV agregam-se na presença de Mg^{2+} , sendo o fenômeno revertido pelo EDTA (Takanami & Tomaru, 1969; Habili & Francki, 1974; Havranek, 1978).

O peso das partículas é estimado entre 5.0 e 6.7×10^6 Da (Francki *et al.*, 1979), sendo o coeficiente de sedimentação de $s = 98.6 - 1.04 C$, onde C é a concentração do vírus em miligramas/mililitros (Francki *et al.*, 1966). As partículas purificadas migram como único componente durante eletroforese em poliacrilamida (Lot & Kaper, 1976; Hanada, 1984). O coeficiente de extinção a 260 nm é 5.0 numa concentração de 1mg/ml e caminho óptico de 1 cm (Francki *et al.*, 1966). As partículas possuem ponto isoelétrico de 4.75 (Ehara & Mink, 1984 apud Palukaitis *et al.*, 1992). Técnicas de dicroísmo circular e espectro de absorção em luz ultra-

violeta indicaram que a transição estrutural do CMV ocorre quando o pH é aumentado de 5 para 7 (Savithri *et al.*, 1984).

Gera e colaboradores (1979) ressaltaram a importância da capa proteica na determinação da transmissão do CMV pelos afídios. A capa proteica pode ser importante para facilitar a aderência dos vírions ao aparelho bucal dos afídios. Algumas interações ocorrem entre a capa proteica da partícula viral e o estilete do afídio, resultando na ligação do vírus. A especificidade da ligação é determinada pela sequência ou estrutura da capa proteica.

Alguns aminoácidos da capa proteica envolvidos na transmissão foram identificados por análises comparativas da sequência de aminoácidos e estudos de transmissão de vírus (Shintaku, 1991, apud Palukaitis *et al.*, 1992). Estes dados apontam o envolvimento de dois domínios, os aminoácidos 129 e 168, da capa proteica na transmissão por afídios.

3. ORGANIZAÇÃO DO GENOMA

O genoma do vírus do mosaico do pepino é constituído por três segmentos de RNA de fita única e polaridade positiva, os quais são todos necessários para que ocorra infecção (Peden & Symons, 1973; Lot *et al.*, 1974). Esses RNAs são designados RNAs 1, 2 e 3 em ordem decrescente de tamanho molecular (3,4 kb, 3,0kb e 2,2 kb) (Peden & Symons, 1973). Um quarto RNA (RNA 4, 1kb) é um RNA subgenômico para a proteína capsidial, formado a partir do RNA 3 (Peden & Symons, 1973; Lot *et al.*, 1974). Em adição a esses quatro RNAs, muitas estirpes do CMV possuem também pequenos RNAs (aproximadamente 335 nucleotídeos) conhecidos como RNAs satélites (Kaper *et al.*, 1976). Estes RNAs satélites não são parte do genoma viral, mas são específica e completamente dependentes do CMV para sua replicação e formação de capsídio (Mossop & Francki, 1978). Os quatro RNAs e, o RNA satélite quando presente, estão distribuídos segundo Kaper (1975), em três partículas de peso molecular similares, assim discriminadas: "Partícula 1" – RNA 1; "Partícula 2"- RNA 2 e, RNA satélite quando presente; "Partícula 3" – RNA 3 e RNA 4.

Os quatro RNAs do CMV são de polaridade positiva, cada um deles sendo traduzido *in vitro* para produzir uma proteína diferente (Schwinghamer & Symons, 1977). Todos os RNAs contêm uma região conservada na extremidade 3', com cerca de 200 nucleotídeos, que não é traduzida, e uma estrutura "cap" na extremidade 5' (Gould & Symons, 1977; 1978).

A determinação da sequência completa dos nucleotídeos para três estirpes do CMV foi realizada por diferentes autores (Rizzo & Palukaitis, 1989; Owen *et al.*, 1990). Por outro lado, Cuozzo e colaboradores (1988) e Quemada e colaboradores (1989) determinaram a sequência parcial de nucleotídeos dos RNAs individuais de muitas outras estirpes do CMV. O tamanho total do genoma é de 8.621 kb (Gould & Symons, 1977), sendo a composição de bases de 24% G; 23% A; 23% C e 30% U (Brunt *et al.*, 1997).

O RNA 1 contém 3.357-3.389 nucleotídeos e possui uma única "open reading frame" (ORF) que codifica para uma proteína de massa molecular de aproximadamente 111.000 Da, designada também proteína 1a ou 111K (Palukaitis *et al.*, 1992). O nível de homologia da sequência de aminoácidos entre as proteínas 1a codificadas pelas estirpes Fny e Q do CMV, é mais alto (85%) que o nível de sequência de homologia (76%) entre os RNAs 1 de cada estirpe (revisado por Palukaitis *et al.*, 1992). Dentro da ORF do RNA 1 de ambas as estirpes, há uma maior conservação dos nucleotídeos e da sequência de aminoácidos nas regiões terminais do que nas regiões centrais (revisado por Palukaitis *et al.*, 1992). As extremidades 5' e 3' das regiões não codificadoras do RNA 1 das estirpes Fny e Q são 81% e 64% homólogas, respectivamente. Entretanto, o terminal 3' de 180 nucleotídeos de ambos os RNAs podem formar estruturas secundárias muito similares (Rizzo & Palukaitis, 1989), sugerindo que a estrutura secundária é mais importante para interações envolvendo regiões 3' não codificadoras, enquanto a sequência específica de RNA é mais importante no terminal 5'.

O RNA 2 contém 3.035-3.050 nucleotídeos sendo que sua ORF codifica para uma proteína de massa molecular de 94.000-97.000 Da, designada como proteína 2a (Palukaitis *et al.*, 1992). O nível de homologia da sequência de aminoácidos entre as proteínas 2a codificadas pelas estirpes do CMV Fny e Q que

é de 73% é similar à homologia da sequência de nucleotídeos (71%) entre os RNAs correspondentes (Palukaitis *et al.*, 1992). A distribuição da homologia da sequência de nucleotídeos dentro das regiões codificadoras das estirpes Fny e Q do CMV é um pouco diferente da encontrada no RNA 1. Há um nível mais alto de homologia na sequência de nucleotídeos na parte central da ORF (77%) do que no terminal 5' (68%) e 3' (66%) da ORF (Palukaitis *et al.*, 1992).

Muitas pesquisas realizadas apontam a homologia da sequência entre as proteínas 1a de muitos tricornavirus e a proteína 126K do vírus do mosaico do tabacco ("Tobacco mosaic virus" – TMV) (Cornelissen & Bol, 1984; Haseloff *et al.*, 1984; Rezain *et al.*, 1985). Também tem sido notado a homologia similar entre as proteínas 2a dos tricornavirus e a proteína 183K do TMV (Cornelissen & Bol, 1984; Haseloff *et al.*, 1984; Rezaian *et al.*, 1984). Por comparação com as proteínas codificadas pelos RNAs genômicos dos picornavirus e alfavirus, várias funções bioquímicas foram associadas às proteínas 1a e 2a dos tricornavirus (Alquist *et al.*, 1985; Argos, 1988; Habili & Symons, 1989). A proteína 1a do CMV contém uma sequência conservada comum à proteína ligante à nucleotídeos (sequência dos aminoácidos 712-725 da proteína 1a do Fny-CMV). A região carboxi-terminal da proteína 1a contém seis motivos conservados encontrados em helicases de DNA e RNA (Hodgman, 1988), sugerindo este papel funcional para esta proteína.

A proteína 2a contém a sequência de aminoácidos conservada Gly-Asp-Asp, (sendo altamente conservada na região central nos aminoácidos 610-612 da proteína 2a da estirpe Fny do CMV), associada com replicases virais (Palukaitis *et al.*, 1992). Estudos com o CMV indicaram que as proteínas 1a e 2a estão presentes em células infectadas, mas em níveis muito baixos, e com anticorpos apropriados, elas podem ser detectadas em associação com o complexo de replicação (Van Pelt-Heerschap *et al.*, 1987; Quadts *et al.*, 1988; Hayes & Buck, 1990; Quadts & Jaspars, 1990).

Recentemente foi identificado um novo gene do CMV (gene 2b), o qual é codificado pelo RNA 2 do vírus do mosaico do pepino, onde a sequência codificadora sobrepõe os 69 códons terminais da ORF 2a codificante da RNA polimerase. O gene 2b codifica uma proteína de 11.3 kDa, a qual parece interagir

especificamente com um "fator" ou "fatores" da hospedeira (Ding *et al.*, 1995). Estes autores sugerem uma função de movimento do vírus à longa distância na planta. Esta proteína está presente na fração insolúvel do extrato proteico de plantas infectadas e não é detectável em partículas virais purificadas (Ding *et al.*, 1995).

O RNA 3 possui 2.197-2.216 nucleotídeos e contém duas ORFs. A ORF próxima à extremidade 5' codifica uma proteína denominada 3a de massa molecular aproximada de 30.000 Da e a ORF terminal 3' codifica uma proteína denominada CP de massa molecular aproximada de 24.000 Da. A proteína 3a é o produto da tradução do RNA 3, enquanto que a proteína 24 kDa (ou proteína capsidial) não é expressa a partir do RNA 3, mas é traduzida do RNA 4 subgenômico (Schwinghamer & Symons, 1977; Gould & Symons, 1978).

A sequência de aminoácidos da capa proteica do CMV das estirpes D (Cuozzo *et al.*, 1988), y (Nitta *et al.*, 1988), Q (Davies & Symons, 1988) C e WL (Quemada *et al.*, 1989), O (Hayakawa *et al.*, 1989) e Fny e M (Owen *et al.*, 1990) foi obtida através de sequenciamento do RNA 3. A capa proteica de cada uma dessas estirpes contém 218 aminoácidos. A análise computacional das sequências de aminoácidos sugere que a capa proteica das estirpes do CMV que pertencem ao mesmo subgrupo é conservada (Quemada *et al.*, 1989; Owen *et al.*, 1990). A sequência de aminoácido da capa proteica é 94-99% homóloga entre as estirpes do mesmo subgrupo e 80-83% entre os subgrupos (Quemada *et al.*, 1989). A maioria das mudanças são substituições de aminoácidos com propriedades químicas similares. Embora os dois subgrupos do CMV mostrem considerável diversidade de sequência, eles são geneticamente compatíveis e podem, portanto, ser considerados como estirpes do mesmo vírus.

Mais recentemente, uma maior complexidade em relação à estrutura genômica do CMV foi documentada. Dois RNAs adicionais (4A e 5) foram encontrados em associação com a estirpe Q do CMV. O RNA 4A, como já especificado acima, é um RNA subgenômico derivado do terminal 3' do RNA 2 contendo 682 nucleotídeos (Ding *et al.*, 1994). O RNA 5 é uma população mista conservada derivada, respectivamente, do terminal 3' de 307 e 304 nucleotídeos

dos RNAs 2 e 3 do CMV-Q, sendo que o RNA 5 não foi detectado em todas as estirpes do CMV testadas (Blanchard *et al.*, 1996).

“Defective interfering RNAs”, ou seja, DI RNAs que são, RNAs derivados do genoma do vírus por deleções internas ou complexos de rearranjos de sequências genômicas, já foram caracterizados para a maioria dos grupos de vírus de RNAs animais (Holland, 1990) e muitos grupos de vírus de RNA de plantas, incluindo tombusvirus (Burgyan *et al.*, 1989), carmovirus (Li *et al.*, 1989), furovirus (Bouzoubaa *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1994), potexvirus (White *et al.*, 1991), bromovirus (Romero *et al.*, 1993) e também para a estirpe Fny do vírus do mosaico do pepino (Graves & Roossinck, 1995).

Dois RNAs defectivos designados DRNA 3 α e DRNA 3 β estão associados com a estirpe Fny do CMV mas não com a estirpe Sny, depois de várias passagens do vírus em plantas de fumo (Graves & Roossinck, 1995).

A presença de um DI RNA pode ter efeitos nos sintomas produzidos pelo vírus “helper” (CMV), variando desde a atenuação dos sintomas até o agravamento ou nenhum efeito (Burgyan *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1994; Hillman *et al.*, 1987; Romero *et al.*, 1993). A presença de DI RNAs não provocou efeito aparente na acumulação do vírus “helper” ou nos sintomas provocados pela estirpe Fny do CMV (Graves & Roossinck, 1995).

Em adição aos RNAs genômicos e subgenômicos do CMV, muitos isolados contém RNA satélite, ou seja, um RNA que não é requerido pelo CMV para sua infecção e replicação, mas requer o CMV para sua replicação e formação de partículas (Mossop & Francki, 1978). A presença de RNA satélite pode afetar o nível de replicação e os sintomas induzidos pelo CMV.

Diversos RNAs satélites associados ao CMV já foram isolados e caracterizados, sendo que muitos deles atenuam os sintomas da doença induzida pelo CMV e reduzem a concentração do vírus na maioria das plantas hospedeiras (Mossop & Francki, 1978; Gonsalves *et al.*, 1982). Entretanto, em infecções de tomate pelo CMV e RNAs satélites, alguns satélites atenuam os sintomas induzidos pelo vírus (satélites atenuantes ou não necróticos), enquanto outros induzem uma necrose letal (satélites necróticos) (Kaper & Waterworth, 1977; Mossop & Francki,

1979; Kaper *et al.*, 1986). Alguns desses satélites atenuantes têm sido, inclusive, utilizados em programas de controle de doenças causadas pelo CMV em tomateiro e pimentão (Tien *et al.*, 1987; Galitelli *et al.*, 1991; Montasser *et al.*, 1991).

Pouco se sabe sobre a distribuição de RNAs satélites em tecidos infectados, mas um estudo realizado em plantas de fumo sugeriu que os níveis de RNA satélite são mais altos que os níveis de vírus em folhas velhas, folhas secas, raízes, assim como em sépalas e pétalas das flores (Habibi & Kaper, 1981).

4. SUBGRUPOS

O CMV apresenta um grande número de estirpes, isto é, isolados que mostram diferenças em relação aos sintomas induzidos e/ou gama de hospedeiras. Estes isolados podem ser divididos em dois subgrupos sorológicos definidos como DTL e ToRS por Devergne & Cardin (1973). Esta divisão fornece valiosas informações sobre a localização geográfica e sintomas produzidos pelos isolados do CMV. Por exemplo, membros do sorogrupo DTL geralmente induzem sintomas mais severos e ocorrem predominantemente nos trópicos e subtropicais, enquanto isolados do sorogrupo ToRS são prevalentes em regiões temperadas (Haase *et al.*, 1989).

A diferenciação dos isolados do CMV foi baseada primeiramente em estudos sorológicos, os quais consomem muito tempo e podem fornecer resultados inconclusivos. Por estas razões, outros métodos alternativos, incluindo análise de hibridização (Piazzola *et al.*, 1979) e mapeamento peptídico das proteínas capsidiais do CMV (Edwards & Gonsalves, 1983) foram desenvolvidos. A desvantagem das técnicas de hibridização e mapeamento peptídico é que estas requerem, respectivamente, grandes quantidades de RNAs e proteínas capsidiais (Rizos *et al.*, 1992).

Rizos e colaboradores (1992), desenvolveram um método simples e alternativo para diferenciar isolados do CMV em subgrupos, sendo que este método não requer uso de reagentes específicos como anti-soro. Este método é baseado



na transcrição reversa e na reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), onde é utilizado nanogramas de RNA viral como molde para o processo de RT-PCR.

Optou-se em referir aos subgrupos como subgrupo I (=ToRS) e II (=DTL) (Owen & Palukaitis, 1988).

A sequência de nucleotídeos da ORF do gene da capa proteica é a região mais conservada da molécula do RNA 4, mas demonstra uma variação específica entre os subgrupos. A sequência completa do RNA 4 para os isolados do subgrupo II contém um único sítio de restrição para a enzima Eco RI, o qual está ausente na sequência do RNA 4 dos isolados do subgrupo I (Anderson *et al.*, 1995). Isto pode ser usado como base no método de RT-PCR, seguido de digestões utilizando enzimas de restrição para classificar isolados do CMV (Wiley *et al.*, 1993).

5. CITOPATOLOGIA

Quando células epidérmicas e do mesófilo de plantas infectadas com o CMV são vistas ao microscópio de luz após serem coradas apropriadamente, pode-se observar a presença de corpos de inclusão amorfos e/ou cristalinos. Estes corpos são resistentes ao tratamento com detergente (Triton X-100), indicando que estes não contêm quantidades substanciais de material membranoso. Estes corpos são corados positivamente para proteína e RNA (Christie & Edwardson, 1977; Edwardson & Christie, 1979).

Inclusões angulares vistas ao microscópio de luz correspondem a cristais virais (Christie & Edwardson, 1977; Edwardson & Christie, 1979), geralmente encontrados no citoplasma (Russo & Martelli, 1973; Honda & Matsui, 1974) e no vacúolo (Gerola *et al.*, 1965; Honda & Matsui, 1968, 1974; Russo & Martelli, 1973; Honda *et al.*, 1974; Ehara & Misawa, 1975; Ehara *et al.*, 1976; Tolin, 1977; Hatta & Francki, 1979). Os cristais do CMV são extremamente variáveis em tamanho e forma e as partículas arranjadas num padrão quadrado ou hexagonal, indicando uma possível estrutura cúbica (Honda & Matsui, 1968).

O CMV tem sido estudado em cortes de tecidos infectados fixados por processos padrões (Misawa & Ehara, 1966; Honda & Matsui, 1968; Lawson &

Hearon, 1970; Ehara & Misawa, 1973, 1975). Os fixadores mais comuns são glutaraldeído e tetróxido de ósmio e a resina Epon é largamente utilizada para emblocar o material.

Em plantas inoculadas artificialmente, as infecções causadas pelo CMV, geralmente resultam em severas modificações citológicas em áreas de tecidos sintomáticos (Francki, *et al.*, 1985). Essas mudanças envolvem o citoplasma, cuja organização estrutural pode ser alterada por intensa vacuolização (Gerola *et al.*, 1965; Russo & Martelli, 1973).

O aumento do desenvolvimento de membranas citoplasmáticas é outra característica comum de células invadidas pelo CMV (Gerola *et al.*, 1965; Honda & Matsui, 1968, 1974). O acúmulo de membranas pode desenvolver-se da proliferação do retículo endoplasmático, da presença de plasmalemossomos, do desenvolvimento de grandes corpos originados de membranas de formas tubulares ou arrançadas de forma concêntrica formando estruturas mielínicas. Estes corpos membranosos estão localizados no citoplasma ou, mais frequentemente, próximos aos vacúolos centrais ou secundários (Francki, 1985).

Os corpos membranosos não são uma característica específica de células infectadas, estando também presentes em tecidos sadios (Gerola *et al.*, 1965; Ehara, 1979). Entretanto, nos tecidos invadidos pelo CMV, os corpos membranosos são maiores, estruturalmente mais complexos e ocorrem com maior frequência. De fato, Honda e Matsui (1968), concluíram que o CMV pode ser o agente causador do aumento da quantidade dessas estruturas, uma vez que os corpos membranosos parecem estar ausentes em células de fumo infectadas pelo "tobacco mosaic virus" (TMV), mas aparecem em grande quantidade em amostras infectadas duplamente pelo TMV e CMV ou somente pelo CMV.

A origem dos corpos membranosos pode ser da membrana plasmática (Ehara, 1979), mas sua função, se alguma, é controversa. Gerola e colaboradores (1965), consideram a proliferação de membranas como um produto da desorganização celular, induzido por diferentes agentes, incluindo vírus. Ehara (1979) propõe um papel ativo para os corpos membranosos de destoxificação das

células através da colocação nos vacúolos de metabólitos não desejáveis derivados dos vírus.

Vesículas associadas aos tonoplastos também foram detectadas em células infectadas pelo CMV por Hatta e Francki (1981). Essas vesículas são corpos membranosos redondos ou ovóides envoltos por uma única membrana, medindo cerca de 100 nm de diâmetro e conectadas com os tonoplastos pelos quais elas penetram no vacúolo (Francki, 1985). Algumas dessas vesículas contêm material amorfo fortemente corado, mas muitas possuem finas fibrilas, as quais são sensíveis a digestão pela ribonuclease sob condições de incubação contendo baixa quantidade de sal (Francki, 1985). Baseado nesta evidência, Hatta e Francki (1981), concluíram que as fibrilas consistiam de dsRNA e que as vesículas seriam sítios de síntese de RNA viral.

Os cloroplastos são uma das principais organelas afetadas pelo CMV, sofrendo alteração na diferenciação ou disrupção da estrutura interna (Gerola *et al.*, 1965; Misawa & Ehara, 1966; Honda & Matsui, 1968, 1974; Favali & Conti, 1970; Russo & Martelli, 1973; Ehara & Misawa, 1975; Kraev *et al.*, 1975).

Tem sido relatado, que partículas do CMV, exceto quando arranjadas em agregados ordenados, não são facilmente distinguidas nas células, onde podem ser confundidas com ribossomos (Matsui & Yamaguchi, 1966; Honda & Matsui, 1974). Técnicas têm sido desenvolvidas para facilitar a visualização das partículas através da destruição de ribossomos citoplasmáticos. Uma destas técnicas foi desenvolvida por Honda e Matsui (1974), onde discos de folhas infectadas permanecem incubados em tampão fosfato por 24 horas à 25°C sob condições de iluminação constante antes do processo de fixação. Resultados similares foram obtidos por Hatta e Francki (1979), através de uma técnica baseada no tratamento de amostras de tecidos fixadas com glutaraldeído com ribonuclease pancreática. Este método tem a vantagem de preservar estruturas celulares, as quais são danificadas pelo tratamento descrito por Honda e Matsui (1974).

Em outros casos, entretanto, o pré-tratamento de tecidos infectados pelo CMV não é essencial para a visualização de partículas virais intracelulares, devido ao fato de que as partículas individuais são geralmente detectadas pelo seu

tamanho, opacidade aos elétrons e pela sua aparência em geral, mesmo que elas estejam dispersas aleatoriamente no citoplasma (Lawson & Hearon, 1970; Russo & Martelli, 1973; Tolin, 1977).

As partículas do CMV estão presentes no parênquima e tecidos condutores de hospedeiras invadidas sistemicamente (Lyons & Allen, 1969). As partículas intracelulares são distribuídas aleatoriamente no citoplasma, mas geralmente formam agregados em várias formas. Agregados de vírus também são encontrados no vacúolo (Russo *et al.*, 1982; DiFranco *et al.*, 1983).

Alguns autores (Lawson & Hearon, 1970; Francki *et al.*, 1985; Martelli, 1980), observaram partículas passando através dos plasmodesmos em células infectadas pelo CMV.

O núcleo parece ser pouco afetado pelo CMV (Francki, 1985). Somente em dois exemplos, modificações nucleares induzidas pelo CMV foram relatadas em células do mesófilo de fumo (Honda & Matsui, 1974) e em protoplastos (Honda *et al.*, 1974) consistindo, em ambos os casos, de alteração na heterocromatina. A relação do CMV com o núcleo é controversa. Honda e Matsui (1974) relataram que mais de 70% dos núcleos de células de fumo infectadas continham partículas virais e essas partículas também foram detectadas nos núcleos de células de *Nicotiana clevelandii* infectadas com a estirpe T do CMV (Francki *et al.*, 1985). Francki e colaboradores (1985), propuseram que a síntese de RNA e a formação de partículas deve ocorrer no citoplasma e que o núcleo seja mais provavelmente um local de acúmulo de partículas do que de produção. Entretanto, foi observado que núcleos visivelmente modificados de protoplastos de fumo infectados pelo CMV continham agregados de partículas virais associadas ao nucléolo, indicando que as partículas do CMV poderiam ser produzidas no núcleo. (Honda *et al.*, 1974).

III. MATERIAIS E MÉTODOS

Vírus e Plantas

O isolado do vírus do mosaico do pepino usado neste estudo foi obtido de folhas de *Catharantus roseus* (CMV-Cr) mostrando sintomas de mosaico e distorção foliar. O inóculo foi preparado através de maceração de folhas em tampão fosfato de potássio 0,02 M pH 7,4, contendo sulfito de sódio 0,02 M. O homogeneizado foi manualmente aplicado na folha de *Chenopodium quinoa* utilizando Celite como abrasivo. Uma única lesão local clorótica em folha de *C. quinoa* foi isolada, macerada em tampão e inoculada em fumo. Extratos de folhas desta planta foram então usados como fonte de inóculo para determinação de hospedeiras do CMV-Cr. As plantas inoculadas foram: *Chenopodium quinoa* Willd., *Gomphrena globosa* L., *Catharantus roseus* G. Don., *Cucurbita pepo* L., *Nicotiana tabacum* L., *Cucumis sativus* L., *Vigna unguiculata* Walp., *Phaseolus vulgaris* L. "carioca", *Phaseolus vulgaris* L. "rajado", *Phaseolus vulgaris* L. "jalo", *Brassica oleraceae* L. var. *acephala* e *Raphanus sativus* L. As plantas que não apresentaram sintomas foram submetidas à retroinoculação, cujas folhas foram utilizadas como inóculo para plantas de *C. quinoa*.

Purificação

O vírus do mosaico do pepino (CMV-Cr) foi purificado seguindo-se, em parte, o protocolo descrito por Lot *et al.* (1972). Folhas de fumo foram trituradas em liquidificador com 1 volume (peso/vol) de tampão citrato de sódio 0,5 M pH 6,5 contendo EDTA 0,01 M e 2-mercaptoetanol 0,1%. Após filtração em quatro camadas de gaze, o suco foi misturado com 1 volume (vol/vol) de clorofórmio, agitado fortemente por 10 minutos e as fases foram separadas por centrifugação a 12.000g por 10 minutos. O vírus foi precipitado da fase tamponada pela adição de polietilenoglicol a 10% e agitação à 4°C por 60 minutos. Após centrifugação a 12.000g por 10 minutos, o "pellet" foi ressuspenso em pequeno volume de tampão borato de sódio 0,005 M pH 9,0 contendo EDTA 0,005 M, agitado por 60 minutos à

4°C, centrifugado a 16.000g por 10 minutos e o sobrenadante usado para filtração em gel.

A filtração em gel (Gaspar *et al.*, 1995) foi feita em coluna (75cm X 1.5mm) de Sephacryl S-1000 (Pharmacia LKB Biotechnology, NJ, USA) estabilizada com tampão fosfato 0,01 M pH 7,2 contendo NaCl 0,15 M (PBS) com fluxo de corrida de 1ml/minuto. A coluna foi acoplada a um monitor de UV (Econo EM-1, Bio-Rad) e o padrão de absorção, a 254 nm, obtido em um registrador (Econo 1325, Bio-Rad). Frações de 3 ml foram manualmente coletadas e aquelas pertencentes ao pico de absorção foram juntadas e concentradas por filtração através de membranas (Sigma Chemical) com limite de exclusão de 300 kDa. A fração resultante é doravante denominada "vírus purificado".

Espectrofotometria

O espectro de absorção do CMV-Cr purificado foi determinado no comprimento de onda luz ultravioleta. A concentração do vírus foi aferida pela absorção a 260 nm de uma solução diluída 1:100, assumindo um coeficiente de extinção de 5.0 (Francki *et al.*, 1966).

Microscopia eletrônica do vírus purificado

Uma alíquota da preparação purificada do vírus foi aplicada sobre telinhas de microscopia eletrônica cobertas com Butvar (Sigma) e reforçadas com carbono. A contrastação negativa foi feita com acetato de uranila 1% por 1-2 minutos (Harris & Horne, 1991) e observadas em um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 906.

Extração de proteínas

Extratos de proteínas de plantas de *C. roseus* sadias e infectadas pelo CMV-Cr, foram preparadas pela homogeneização de folhas em tampão Tris.HCl 0,05 M pH 7,5 contendo sacarose 0,4 M, MgCl₂ 0,005 M, KCl 0,01 M e glicerol 20% (vol/vol) (Bradley & Zaitlin, 1971). Os extratos foram centrifugados a 16.000g durante 5 minutos e incubados com 5 volumes de acetona -20°C por 20 horas. O

precipitado contendo proteínas foi coletado por centrifugação a 16.000g por 20 minutos e ressuspenso em tampão de amostra para eletroforese.

Eletroforese

A eletroforese foi feita em gel desnaturante de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970). As proteínas foram desnaturadas por fervura a 100°C por 3 minutos em tampão de amostra Tris.HCl 0,1 M pH 6,8 contendo SDS 2%, glicerol 10%, DTT 0,1 M e azul de bromofenol 0,001 M. A eletroforese foi conduzida em um aparelho Mini Protean II (Bio-Rad) com gel de 7 cm X 8 cm a 200 V (voltagem constante) por 45 minutos. Os géis foram fixados em mistura contendo metanol, água e ácido acético (50:50:10) por 60 minutos, corados com azul de Comassie 0,25% nessa mesma mistura por 60 minutos e descorados com metanol e água (1:1) por 18 horas.

“Western blotting”

Após separação em SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para filtro de nitrocelulose (Towbin & Gordon, 1984) em um eletrotransferidor (“Mini Trans-Blot” ;Bio-Rad) operando sob voltagem constante (100 V) por 60 minutos. O tampão de transferência utilizado foi o Tris-Glicina (Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M, pH 8,3) contendo metanol 20%. A detecção da proteína capsidial no filtro de nitrocelulose foi feita primeiro incubando o filtro em tampão PBS contendo Tween-20 0,3% (PBS-T) e BSA 3% por 60 minutos. Em seguida, o filtro foi incubado por 60 minutos com o anti-soro para a proteína capsidial do CMV (gentilmente doado pelo Dr. Peter Palukaitis, USA) diluído 1:1000 com tampão PBS-T contendo BSA 0,3%. Seguiram-se lavagens com PBS-T e incubação por 60 minutos com anti-IgG de coelho (feito em cabra) conjugado com fosfatase alcalina. Após lavagens com PBS, o filtro foi incubado por 20 minutos com mistura de BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro-blue tetrazolium).



Extração do RNA viral

Tanto a água como as soluções utilizadas foram tratadas com dietil pirocarbonato de sódio (DEPC) para eliminação de RNases. As vidrarias foram mantidas à 200°C por 3 horas.

À suspensão viral foi acrescentado SDS na concentração final de 1% e a solução foi aquecida por 2 minutos à 55°C. Em seguida, a suspensão foi misturada com igual volume de fenol (equilibrado com tampão citrato de sódio 0,1 M pH 4,3), agitada manualmente por 30 segundos e, então, centrifugada para separação das fases. A fase aquosa foi novamente extraída com clorofórmio e, após centrifugação, o ácido nucleico presente na fase aquosa foi precipitado pela adição de 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e dois volumes de etanol e manutenção por 30 minutos à -70°C. Após centrifugação a 12.000g por 15 minutos, o "pellet" foi secado à 37°C por 10 minutos e, então, ressuscitado em água tratada com DEPC (dietil pirocarbonato de sódio) (Farrel, 1993).

O RNA viral foi submetido a eletroforese em gel nativo de agarose 1% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) pH 8,3. Para determinação do tamanho molecular utilizou-se gel desnaturante de agarose 1% contendo formaldeído 0,66 M. O marcador de peso molecular utilizado foi o "RNA Ladder 0,24 – 9,5 Kb" (Gibco –BRL).

Produção de sonda não radioativa

O sistema utilizado para produção de sonda radioativa baseia-se na marcação do cDNA por incorporação ao acaso do nucleotídeo dUTP conjugado com o esteróide digoxigenina (DIG-dUTP).

Para a produção do DNA complementar (cDNA) ao RNA viral, foi utilizado o protocolo descrito a seguir. O volume de reação é de 20 µl e consiste de: 50 mM Tris.Cl (pH 8,3); 75 mM KCl; 10 mM DTT; 3 mM MgCl₂; 0,1 mM cada dGTP, dATP, dCTP; 0,065 mM dTTP; 0,035mM Dig-dUTP; 10 µg/ml hexanucleotídeos; 2 ui Inibidor de RNase; 1-3 µg RNA viral; 50 ui Transcriptase Reversa de "Avian



Myeloblastosis Virus". A incubação foi feita por 3 horas à 42°C. A sonda produzida é estável à -20°C por até 12 meses.

Especificidade da sonda

A especificidade da sonda foi demonstrada através da utilização da técnica de "dot blott". Um µl de RNA, previamente desnaturado por aquecimento à 55°C por 15 minutos e imediato resfriamento em gelo/álcool, foi aplicado em membrana de nylon e então fixado por exposição à radiação ultravioleta a 50 mJoule. A membrana de nylon foi então pré-hibridizada conforme descrito no item "hibridização".

Extração de RNA total de folhas

Duzentos e cinquenta miligramas de folha foram congeladas com nitrogênio líquido, trituradas a pó e, então, maceradas com 1,0 ml de Trizol (Gibco-BRL). Após incubação por 5 minutos em temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos, 0,2 ml de clorofórmio foi adicionado e a suspensão foi incubada por mais 15 minutos em temperatura ambiente. Após centrifugação 12.000g por 15 minutos à 5°C, a fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo. O RNA foi precipitado pela adição de 0,5 ml de isopropanol e incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. Após centrifugação a 12.000g por 15 minutos, o RNA precipitado foi lavado com 1 ml de álcool 75%, centrifugado a 7.500g por 5 minutos à 5°C, secado à 37°C por 10 minutos e, então, ressuspendido em água tratada com DEPC.

Gel Desnaturante de Agarose

A eletroforese foi feita em gel de agarose 1 % em tampão MOPS (ácido propanesulfônico 3-[N-morfolino] 0,02 M pH 7,0; acetato de sódio 0,005 M; EDTA 0,001 M) e formaldeído a 0,66 M. As amostras foram diluídas em tampão de amostra contendo formamida, formaldeído e MOPS. O tampão de corrida utilizado foi o MOPS. Antes de serem aplicadas ao gel, as amostras foram submetidas à



desnaturação à 55°C por 15 minutos e colocadas no gelo imediatamente. A voltagem utilizada para eletroforese foi de 100 volts por aproximadamente 1 hora.

Antes do gel ser submetido à transferência, este foi lavado 2 vezes (10 minutos cada) em água tratada com DEPC. Em seguida, o gel foi incubado por 20 minutos em NaOH 0,05 N, e 2 vezes (15 minutos cada) em SSC 20X (SSC 1X= NaCl 0,15 M; citrato de sódio 0,015 M pH 7,0). Após essas incubações, os ácidos nucleicos foram transferidos para a membrana de nylon.

“Northern blotting”

A transferência dos ácidos nucleicos do gel desnaturante de agarose para a membrana de nylon foi feita usando-se um eletrotransferidor “Vacuum Blotter” (Bio-Rad-Modelo 785), operando sob pressão de 5 mm Hg, durante 90 minutos. O tampão de transferência utilizado foi SSC 10X.

Após a transferência, o gel foi corado com brometo de etídio para certificação de que o RNA tivesse sido transferido. A membrana de nylon foi submetida a lavagem em SSC 6X durante 5 minutos e, então, os ácidos nucleicos foram fixados por exposição à radiação ultravioleta a 50 mJoule.

Hibridização

Após ter sido fixada, a membrana foi submetida à pré-hibridização à 42°C durante 3 horas em tampão contendo SSC 5X, solução bloqueadora (“blocking reagent”, Boehringer Mannheim) a 1%, N-Lauroyl sarcosina a 0,1%, SDS a 0,02% e formamida a 50%.

Seguiu-se a hibridização também à 42°C por 20 horas no mesmo tampão contendo a sonda para o CMV, previamente desnaturada por aquecimento em banho-maria por 10 minutos e imediato resfriamento em gelo/álcool.

Após a incubação, a membrana foi lavada em SSC 2X contendo SDS 0,1% por 2 vezes de cinco minutos cada à temperatura ambiente e em SSC 0,1X contendo SDS 0,1% por 2 vezes de quinze minutos à 68°C. Em seguida foi feita a detecção dos híbridos DNA:cDNA ou RNA:cDNA.



Detecção dos Híbridos

A membrana de náilon foi incubada primeiramente em tampão 1 (ácido maleico 0,1 M; NaCl 0,15 M pH 7,5) por um minuto. Em seguida, foi colocada no tampão 2 (solução bloqueadora a 1% dissolvida no tampão 1) por 1 hora. A membrana foi, então, incubada por 1 hora com solução de tampão 2 contendo anti-DIG-PA (anti-soro monoclonal anti-digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina) diluído 1:10.000. Lavagens de 2 vezes de 15 minutos no tampão 1 deram prosseguimento ao processo. Em seguida, a membrana foi equilibrada por 2 minutos em tampão 3 (Tris-HCl 0,1 M pH 9,5; $MgCl_2$ 0,005 M e NaCl 0,1 M), para posterior reação com mistura BCIP/NBT durante 20 minutos.

Extração de RNA de fita dupla (ds RNA)

O método para extração de ds RNA foi basicamente o descrito por Morris & Dodds (1979). O método é baseado na afinidade das moléculas de ds RNA com celulose CF-11 na presença de etanol. Em linhas gerais, sete gramas de folhas infectadas foram congeladas em nitrogênio líquido e trituradas a pó em cadinho de porcelana e extraído com STE 2X (STE 1X = NaCl 0,1 M; Tris-Cl 0,05 M; EDTA 0,001 M pH 7,0), SDS 10%, fenol saturado com STE e bentonite. Esta solução ficou sob agitação durante trinta minutos. Após centrifugação, a fase aquosa foi submetida à passagem em coluna de celulose CF-11 (Whatman) com etanol 16,5%. Então, o ds RNA foi eluído com STE 1X livre de etanol e precipitado com 1/10 volume de acetato de sódio 3 M pH 5,5 e dois volumes e meio de etanol 100%. Após incubação à $-20^{\circ}C$ por 16 horas e centrifugação a 8.000g por trinta minutos, o "pellet" foi ressuspendido em STE 1X.

Amplificação por Transcriptase Reversa/Reação em Cadeia pela Polimerase

Para a produção do DNA complementar (cDNA) ao RNA viral, o volume de reação foi de 25 μ l e consistiu de: 50mM Tris.HCl (pH 8,3); 75 mM KCl; 10 mM DTT; 3mM $MgCl_2$; 0,1mM cada dGTP, dATP, dCTP, dTTP; 2 μ l de hexanucleotídeos ("primers") 2 unidades de inibidor de RNase; 1-3 μ g de RNA viral; 200 unidades de transcriptase reversa Superscript (Gibco). O RNA viral e a mistura



de hexanucleotídeos foram desnaturados à 95°C antes dos demais componentes serem adicionados. A incubação foi feita por 2 horas à 37°C.

Dois "primers" específicos para o CMV foram sintetizados, baseado na comparação de sequências de cDNA conhecidas da capa proteica do CMV. O "primer" 1 "anti-sense" 5'-GCCGTAAGCTGGATGGACAA-3' correspondentes às bases 1996 a 2015 do RNA 3 do CMV-Q. O "primer" 2 "sense" 5'-TATGATAAGAAGCTTGTTCGCG-3' corresponde aos nucleotídeos 1514 a 1536 do RNA 3 do CMV-Q. O comprimento esperado do fragmento de DNA amplificado é de 499 a 502 pb para isolados do CMV do subgrupo II e 486 a 488 pb para isolados do CMV do subgrupo I.

Os componentes para 50 µl de reação foram: tampão PCR 1X (concentração final: KCl 50mM, MgCl 1,5 mM, Tris-HCl 10 mM), cDNA 2 µl, Taq DNA polimerase 1,25 unidades, dNTPs 0,2 mM de cada e "primers" 0,1 µM de cada. A amplificação foi feita em um ciclador (MJ Research) utilizando-se o seguinte programa: 80°C por 2 minutos sendo, então, a taq DNA polimerase adicionada aos outros componentes da reação (Chou *et al.*, 1992), seguindo-se a desnaturação à 94°C durante 4 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificação (94°C, 1 minuto; 45°C, 1 minuto; 72°C, 2 minutos, proporcionando, respectivamente, a desnaturação, o anelamento dos "primers" e a extensão), seguido de 5 minutos de extensão final à 72°C.

Digestão dos Produtos do PCR por enzimas de restrição

Os fragmentos amplificados por PCR foram digeridos pelas endonucleases de restrição Eco RI, Bam HI e Msp I (Gibco-BRL), utilizando-se 18 µl de fragmentos amplificados, 2 µl de tampão apropriado (10X) e 1 µl da enzima. Todas as digestões foram efetuadas à 37°C durante 2 horas. Os produtos da digestão foram analisados através de gel de agarose 2% e o tamanho dos fragmentos estimados por comparação com marcador de 100 pb (100bp DNA Ladder, Gibco-BRL).



Eletroforese em gel nativo de agarose

Os ácidos nucleicos foram fracionados em gel de agarose 2% em tampão TAE (Tris 0,04M, acetato de sódio 0,02M e EDTA 0,0001M, pH 8,3). Os géis foram submetidos à 80 V por cerca de 70 minutos e corados com brometo de etídio (0,1 µg/ml) por 30 minutos. Os ácidos nucleicos foram visualizados através de um transluminador de luz ultravioleta e fotografados usando câmera Polaroid tipo DS 34.

Produção de sonda a partir do PCR

O sistema utilizado para produção de sonda não radioativa através de PCR baseia-se na incorporação de dCTP conjugado com biotina (BIO-dCTP). Para a produção da sonda a partir do DNA complementar foi utilizado o protocolo descrito para PCR, sendo o volume de reação de 25 µl consistindo de: 50 mM Tris.Cl (pH 8,3); 75 mM KCl; 10 mM DTT; 5 mM MgCl₂; 1 mM dCTP (biotina); 1mM dCTP; 2mM dATP; 2mM dGTP; 2mM dTTP; oligonucleotídeos sintetizados ("primers" 1 e 2) 2,5 µl de cada; 1-3 µg de cDNA; 2,5 unidades de Taq DNA polimerase. Os componentes foram fervidos antes que a Taq DNA polimerase fosse adicionada. Após a amplificação, o cDNA da reação foi precipitado à -20°C com cloreto de lítio 0,1 M e etanol 100% durante 16 horas, centrifugado e ressuspendido em 25 µl de água.

Preparação do tecido vegetal para análise ultraestrutural

Pequenos pedaços de folhas de fumo sistemicamente infectadas pelo CMV-Cr foram fixadas por 1 hora sob vácuo e 2 horas à 4°C em glutaraldeído 3% e paraformaldeído 4% tamponados em cacodilato de sódio 0,1M pH 7,0 (Karnovsky, 1965).

Após fixação, o material foi lavado durante 2 horas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,0 e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão, à 4°C, durante aproximadamente 14 horas. Lavagens com água destilada (3 vezes de 10 minutos e 1 vez de 60 minutos) precederam a

contrastação dos espécimes com acetato de uranila 2 % em tampão maleato de sódio 0,05 M pH 6,0 durante 2 horas (Karnovsky, 1967).

Em seguida, o material foi lavado em água destilada (3 vezes de 10 minutos) e desidratado em gradiente crescente de etanol: 30% - 30 minutos, 50% - 30 minutos, 70% - 30 minutos, 100% 2 vezes de 30 minutos e 1 vez de 60 minutos.

A inclusão do material foi feita em resina epoxy de baixa viscosidade conforme recomendado por Spurr (1969). Como solvente para essa resina utilizou-se etanol na proporção (resina:etanol) 1:1 por 2 vezes de 1 hora, colocando-se após, resina pura (1 vez de 3 horas e 1 vez de aproximadamente 14 horas). Posteriormente, o material foi emblocado, permanecendo 24 horas à 70°C.

Cortes ultrafinos (aproximadamente 50 nm) foram feitos com navalhas de diamante em um ultramicrotomo Leica UCT e montados em telinhas de cobre, previamente revestidas com uma película de Butvar reforçada com carbono. Posteriormente, os cortes foram contrastados com citrato de chumbo (Millonig, 1961) e observados em um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 906 operando a 80 KV.

Preparação do tecido para imunomarcção

Pequenos pedaços de folhas jovens de fumo mostrando sintomas de mosaico foram fixados em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2, contendo paraformaldeído 4% e glutaraldeído 0,5% durante 2 horas sob vácuo. Os pedaços de tecidos foram, então, lavados em tampão cacodilato 0,1 M 3 vezes de 30 minutos cada à 4°C e, então, pós-fixados com ósmio reduzido, consistindo na mistura de 1% de OsO_4 , 1,5% de ferrocianeto de potássio em tampão cacodilato 0,1 M (Tamaki & Yamashina, 1994). Seguiu-se a desidratação em uma série de concentração crescente de etanol, começando em 30% à 4°C e seguido com 50, 70 e 100% à -20°C. A infiltração com resina acrílica LR White foi feita como descrito por Hills e colaboradores (1987). O tecido infiltrado foi incluído em cápsulas de polietileno e polimerizado à 60°C por 24 horas.



Imunolocalização *in situ* da proteína capsidial

Secções ultrafinas (50 nm) de tecido foram feitas com navalha de diamante em um ultramicrotomo Leica UCT e montadas em telinhas de níquel cobertas com Butvar (Sigma) e carbono. As telinhas contendo os cortes foram incubadas em gotas de metaperiodato de sódio 4% durante 45 minutos a fim de retirar o O_5O_4 . Posteriormente, as telinhas foram lavadas com água 3 vezes de 5 minutos cada. As telinhas foram, então, colocadas sobre uma gota de PBS contendo BSA 1% durante 1 hora à temperatura ambiente para bloquear reações inespecíficas e, então, incubadas com anti-soro para proteína capsidial do CMV, diluído (1:1000) em PBS contendo 0,01% de BSA durante 2 horas. Após a incubação, as telinhas foram lavadas em gotas de PBS contendo BSA 0,01% (3 vezes de 10 minutos cada) e, então, incubadas por 1 hora à temperatura ambiente sobre gotas de anti IgG de coelho (obtido em cabra) conjugado com ouro coloidal (10 nm) (Sigma) diluído em PBS, BSA 0,01% (1:100). Após lavagens com tampão, como descrito acima, e água destilada, as telinhas foram secadas e contrastadas por 2-3 minutos com solução aquosa de acetato de uranila 2% e posteriormente contrastadas com citrato de chumbo (Millonig, 1961). As secções foram observadas em um microscópio eletrônico Zeiss EM 906.

Como controle negativo utilizou-se telinhas tratadas com soro normal e anti-soro não homólogo.

IV. RESULTADOS

Hospedeiras e Sintomatologia

O vírus do mosaico do pepino isolado de *C. roseus* induziu os seguintes sintomas nas plantas testes inoculadas:

Família Chenopodiacea <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	Lesão local clorótica na folha inoculada
Família Solanacea <i>Datura metel</i> L.	Lesão local clorótica na folha inoculada
<i>Nicotiana tabacum</i> L. "TNN"	Infecção sistêmica; mosaico; deformação foliar
<i>Nicotiana benthamiana</i> L.	Encarquilhamento; clorose
Família Cucurbitacea <i>Cucurbita pepo</i> L. "Caserta"	Lesão local clorótica na folha inoculada; toma-se mosaico sistêmico; necrose do ponteiro
<i>Cucumis sativus</i> L.	Lesão local clorótica na folha inoculada – mosqueado fraco sistêmico
Família Leguminosacea <i>Phaseolus vulgaris</i> L. "Carioca"	Não apresentou sintoma
<i>Phaseolus vulgaris</i> L. "Jalo"	Não apresentou sintoma
<i>Phaseolus vulgaris</i> L. "Rajado"	Não apresentou sintoma
<i>Vigna unguiculata</i> Walp	Não apresentou sintoma
Família Crucifera <i>Brassica oleraceae</i> L. var. acephala	Não apresentou sintoma
<i>Raphanus sativus</i> L.	Não apresentou sintoma
Família Amarantacea <i>Gomphrena globosa</i> L.	Deformação foliar; clorose

A figura 1 mostra os sintomas provocados pelo CMV-Cr em *Catharantus roseus* G. Don. (A), *Cucumis sativus* L., (B), *Cucurbita pepo* L. "Caserta" (C), *Nicotiana tabacum* L. "TNN" (D), *Chenopodium quinoa* Willd.(E) e *Gomphrena globosa* L. (F).

Obtenção do vírus purificado

A figura 2 mostra o perfil eletroforético de proteínas das amostras obtidas antes e após a filtração em gel de Sephacryl s-1000. O aparelho utilizado é demonstrado na figura 3. O espectro de absorção em luz ultravioleta (Figura 4) foi típico de nucleoproteína com pico máximo a 258 nm. A concentração do vírus purificado foi de 11 mg/Kg de folhas infectadas. A figura 5 mostra partículas do CMV-Cr contrastadas negativamente e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão.

Massa molecular da proteína do capsídeo

Em gel desnaturante de SDS-PAGE ficou evidenciada a presença da proteína capsidial do CMV-Cr como um componente único (Figura 6) com massa molecular estimada de 27 kDa, conforme determinação comparativa com proteínas de massa molecular conhecida.

Deteção do CMV em extratos de folha

O perfil eletroforético de extratos de folhas de planta sadia e infectada pelo CMV-Cr mostra-se similar, sem evidenciar a presença da proteína capsidial no extrato de folha infectada (Figura 7 (1)). Entretanto, este polipeptídeo pôde ser identificado por "Western blot" usando anti-soro específico para a proteína capsidial do CMV (Figura 7 (2)).

Análise do RNA viral

A eletroforese em gel de agarose do RNA extraído de partículas do CMV revelou 4 bandas com tamanho de 3.4 Kb, 3.0 Kb, 2.2 Kb, e 1.0 Kb (Figura 8).

Não foi observado nenhum RNA de baixo peso molecular que pudesse corresponder a um RNA satélite.

Produção de sondas não radioativas

Foi produzida uma sonda molecular não radioativa específica para o CMV e que reconhece todos os RNAs do vírus. Também, através de reação por PCR, uma outra sonda foi produzida e que reconhece somente os RNAs 3 e 4 do CMV onde está localizado o gene para a capa proteica viral (Figura 10).

Especificidade da sonda

A sonda produzida para o RNA viral hibridizou especificamente com o RNA genômico extraído do CMV-Cr. Nenhuma hibridização ocorreu com RNAs totais extraídos de plantas não infectadas (Figura 9).

Identificação de RNAs associados ao CMV em extratos de folha infectada

Através de "Northern blot" e hibridização com sonda específica para os RNAs do CMV, foi possível detectar todos os três RNAs genômicos, bem como o RNA subgenômico codificador da proteína capsidial (Figura 11, coluna 3) em extratos de RNAs totais de planta de fumo infectada pelo CMV-Cr. Nos extratos de RNAs totais de planta infectada observa-se duas bandas adicionais correspondentes a RNAs de tamanhos 1.93 Kb e 1.5 Kb, os quais não são observados em preparações virais purificadas (coluna 1). Nenhuma reação ocorreu com RNAs totais extraídos de planta sadia (coluna 2).

Extração e identificação de RNAs de fita dupla associados ao CMV

Os RNAs de fita dupla foram extraídos e analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 12). A identificação de que os RNAs eram de fita dupla, vem do fato de que os dsRNAs terem sido tratados (e não digeridos) com DNase I e Nuclease S1 ao final do processo de extração. Quatro espécies de RNAs foram detectadas em plantas de fumo infectadas pelo CMV-Cr, cujos tamanhos moleculares foram determinados por comparação com os tamanhos moleculares de



fragmentos de DNA (DNA do fago lambda digerido com Hind III). Quando o dsRNA foi desnaturado e aplicado em gel desnaturante de agarose-formaldeído, os valores obtidos foram similares àqueles dos RNAs extraídos das partículas virais. Assim, os valores estimados para os dsRNAs foram: RNA1: 3.9 Kpb; RNA 2: 3.3 Kpb; RNA 3: 2.5 Kpb e RNA 4: 1.0 Kpb. Nenhum RNA de fita dupla foi obtido a partir de folhas de fumo sadio. A análise eletroforética dos dsRNAs do CMV-Cr, mostrou também a ausência de RNAs de baixo peso molecular que pudesse corresponder a RNAs satélite, semelhante ao demonstrado na análise dos RNAs extraídos de partículas virais purificadas.

Amplificação por RT/PCR

A amplificação em cadeia da polimerase dos três isolados analisados, sendo os isolados de maracujá e banana utilizados apenas para efeito comparativo, produziu um único fragmento com tamanho esperado de 486 a 488 pb (Figura 13 A). Esses fragmentos, analisados por "Northern Blot", hibridizaram especificamente com a sonda não radioativa que reconhece os RNAs 3 e 4 do CMV (Figura 13 B).

Análise dos fragmentos por RFLP

Os produtos do PCR das amostras do CMV isolados de *Catharantus roseus*, *Passiflora sp* (maracujá) e *Musa sp* (banana), não foram digeridos pelas enzimas Eco RI (Figura 14 A) e Bam HI (Figura 14 B) e quando digeridos pela enzima Msp I (Figura 15 A), ao isolados obtidos de *Catharantus roseus* e *Passiflora sp* (maracujá) produziram dois fragmentos de aproximadamente 337 e 151 pb e o isolado obtido de *Musa sp* (banana) produziu além dos dois fragmentos, um outro com cerca de 197 pb. Os fragmentos de 337 e 151 pb obtidos após a digestão pela Msp I foram reconhecidos através de "Southern Blot" reagindo com sonda específica para os RNAs 3 e 4 do CMV, sendo que o fragmento de 197 pb do isolado de banana não foi reconhecido pela sonda (Figura 15 B).

Citopatologia e Imunolocalização da proteína capsidial do CMV

A mais proeminente alteração verificada em células de folha de fumo infectados pelo CMV foi a intensa vacuolização no citoplasma (Figura 16). Dentro desses vacúolos foram observados cristais de diversos tamanhos (Figura 17 A) e acúmulo de substâncias de natureza amorfa (Figura 17 B). Partículas isométricas semelhantes a vírus foram também encontradas em associação com membranas do dictiossomos (Figura 17 C). Corpos mielínicos foram raramente encontrados em associação com a plasmalema sendo pouco mais frequentes em associação com o tonoplasto (Figura 17 D).

A imunomarcacão de secções de folhas de fumo infectadas pelo CMV-Cr com anticorpos específicos para a proteína capsidial mostrou intensa marcação no citoplasma (Figura 18 A), nos cristais encontrados nos vacúolos (Figura 18 B) e na substância de natureza amorfa (Figura 18 C). Quase nenhuma marcação foi verificada nos cloroplastos, mitocôndrias e núcleos (Figura 18 A).

Secções incubadas com soro normal ou anti-soro não homólogo não mostraram nenhuma marcação (Figura 19).



Figura 1. Sintomatologia induzida pelo vírus do mosaico do pepino em (A) *Catharantus roseus* G. Don., [ramo sadio (esquerda); ramo infectado (direita)], (B) *Cucumis sativus* L., (C) *Cucurbita pepo* L. "Caserta", (D) *Nicotiana tabacum* L. "TNN", (E) *Chenopodium quinoa* Willd., (F) *Gomphrena globosa* L.



Figura 2. Eletroforese em gel de SDS-PAGE a 12% das frações obtidas antes **(A)** e após **(B)** a filtração em gel de Sephadryl S-1000. As bandas identificadas com asterisco correspondem à proteína capsidial do CMV. Marcadores de massa molecular: Miosina (200 kDa), Fosforilase B (97,4 kDa), BSA (68 kDa), Ovoalbumina (43 kDa), Anidrase carbônica (29 kDa), Lactoglobulina (18,4 kDa) e Lisozima (14,3 kDa).

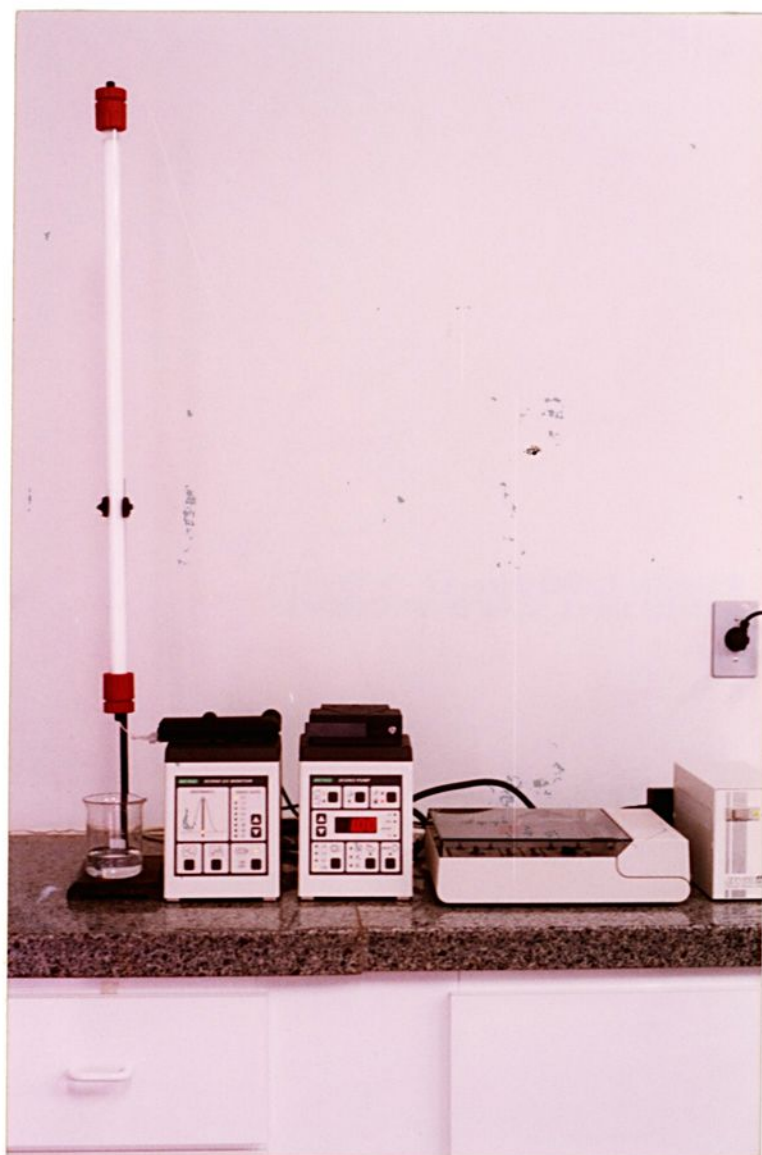


Figura 3. Aparelhagem utilizada para filtração em gel Sephacryl S-1000.

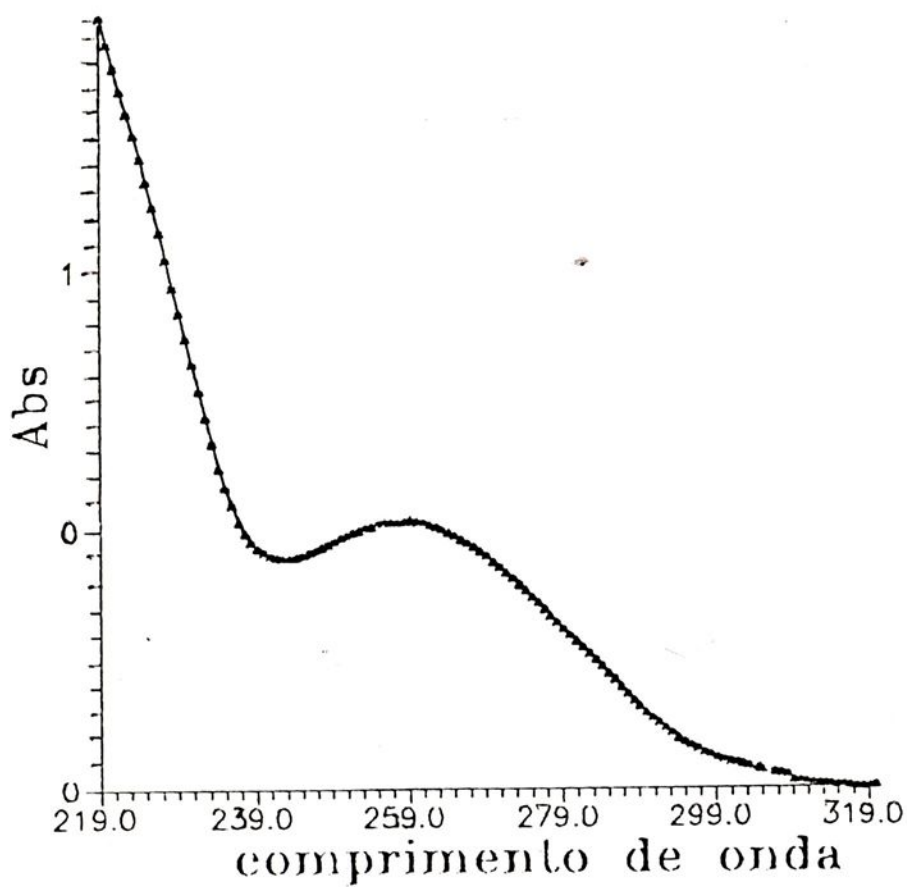


Figura 4. Espectro de absorção do vírus do mosaico do pepino (CMV-Cr) purificado em gel de Sephacryl S-1000.

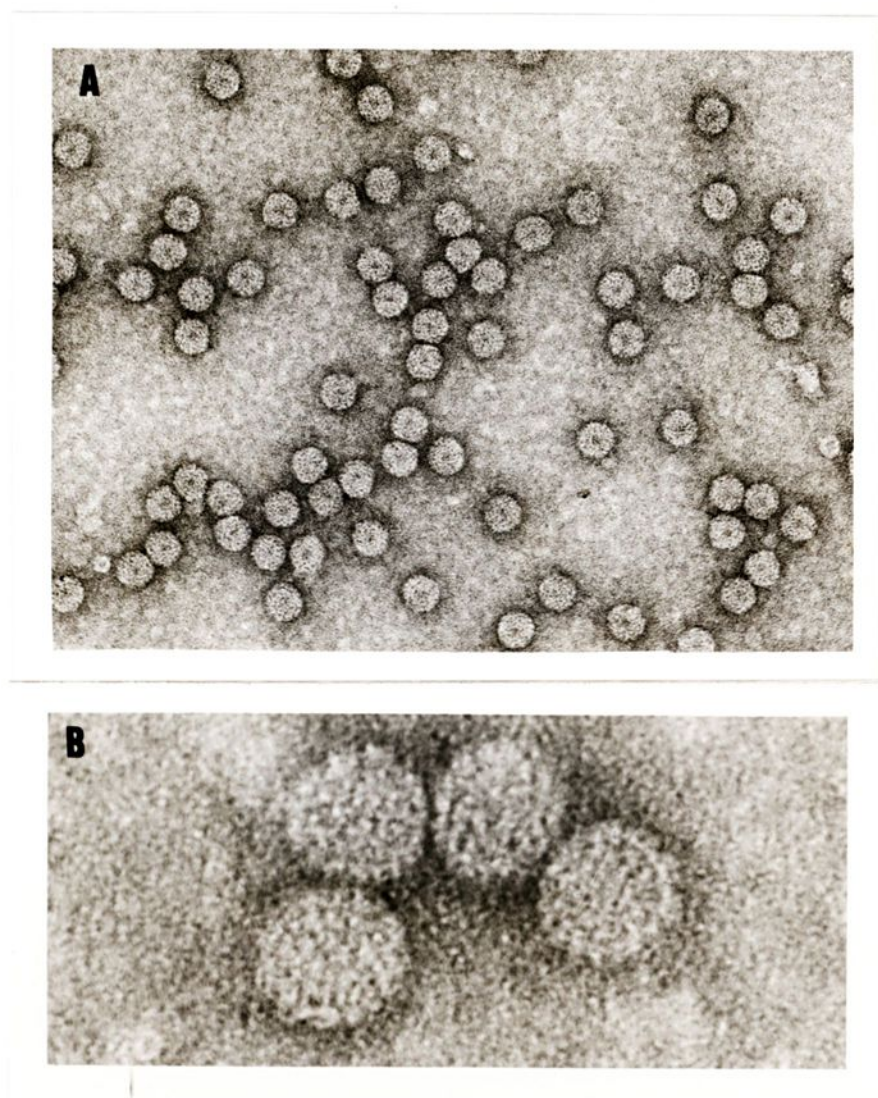


Figura 5. (A) Partículas do CMV-Cr, contrastadas negativamente com acetato de uranila, observadas ao microscópio eletrônico de transmissão (aumento 185.000 X). **(B)** Partículas do CMV-Cr em detalhe (aumento 770.000 X).

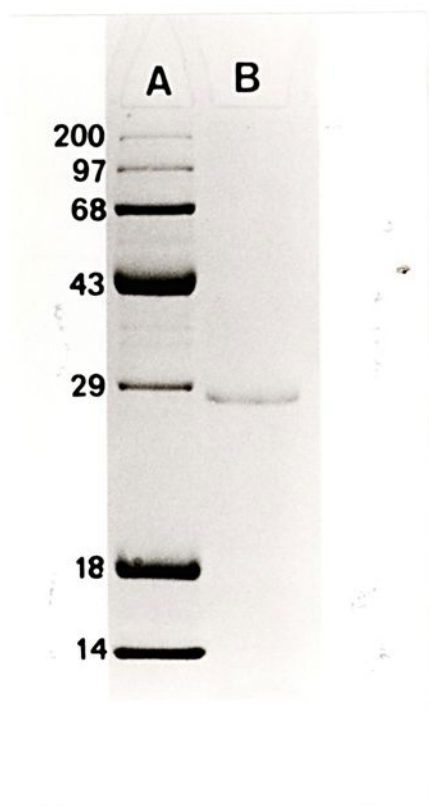


Figura 6. Determinação da massa molecular da proteína capsidial do CMV-Cr em SDS-PAGE . **(A)** Marcadores de massa molecular: miosina (200 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), albumina de soro bovino (68 kDa), albumina de ovo (43 kDa), anidrase carbônica (29 kDa). **(B)** Alíquota da preparação purificada do CMV-Cr.

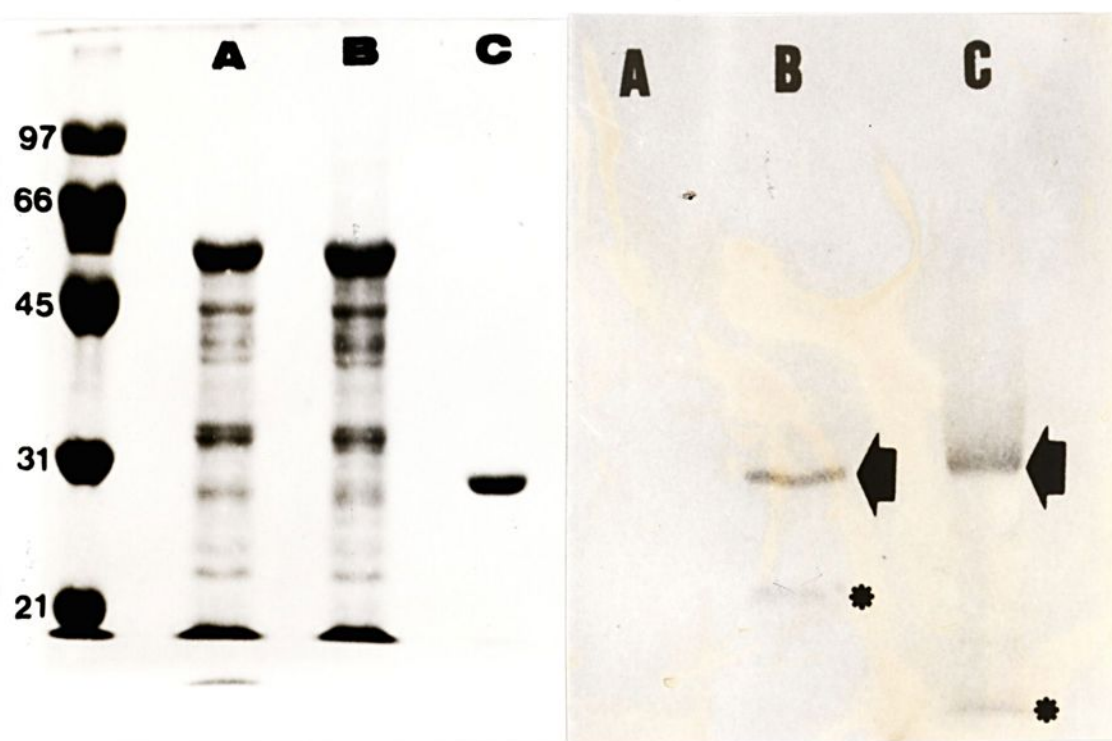


Figura 7. 1. Perfil eletroforético de extrato de planta sadia (A), planta infectada (B) e CMV-Cr purificado (C) **2.** "Western Blot" e reação imunológica de um gel similar ao 1 para a detecção do CMV-Cr (setas) em *C. roseus*. Os asteriscos indicam polipeptídeos sorologicamente relacionados com a proteína capsidial.

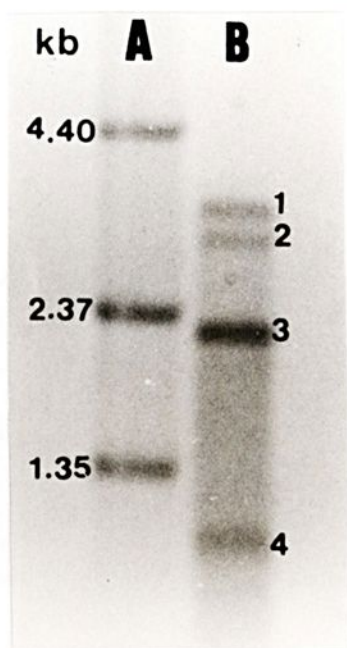


Figura 8. Análise do RNA viral em gel de agarose 1%. **(A)** Padrão de tamanho molecular. **(B)** RNA extraído do CMV-Cr (RNAs 1, 2, 3 e 4).

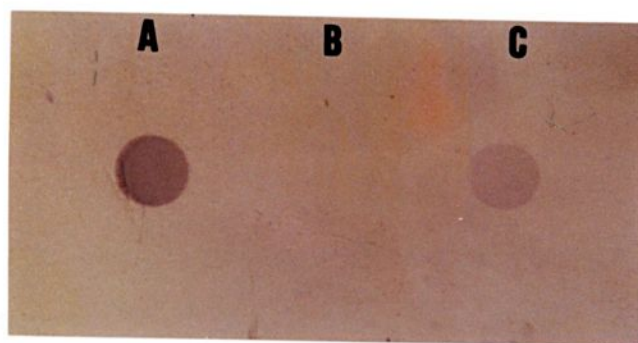


Figura 9. Determinação da especificidade da sonda (cDNA). **(A)** RNA genômico. **(B)** RNA total extraído de planta sadia. **(C)** RNA total extraído de planta infectada pelo CMV-Cr.

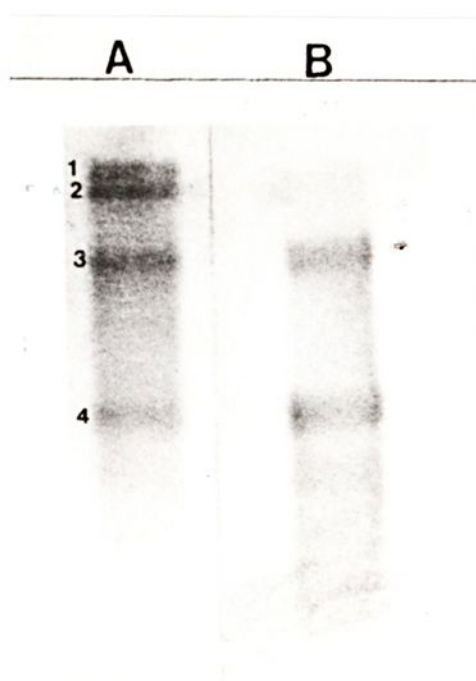


Figura 10. Análise por hibridização "Northern blot" de RNAs do CMV-Cr extraídos de partículas virais purificadas. **(A)** RNAs do CMV-Cr obtidos de partículas purificadas e hibridizados com sonda produzida a partir de RNAs, utilizando transcriptase reversa. **(B)** RNAs do CMV-Cr extraídos de partículas purificadas e hibridizados com sonda produzida através de PCR, utilizando "primers" que flanqueiam a região do gene da capa proteica viral.

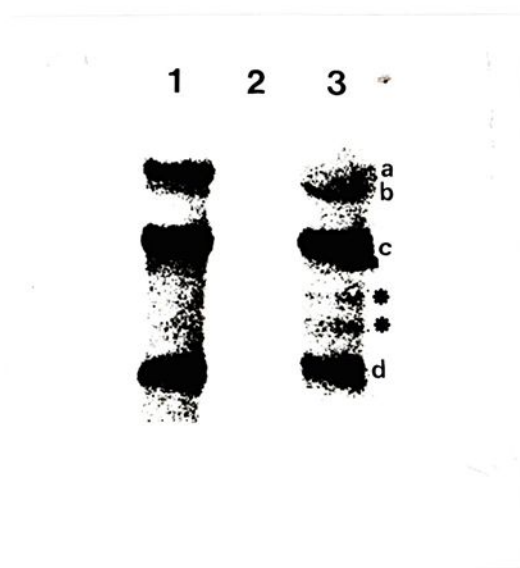


Figura 11. Análise por hibridização “Northern blot” com sonda específica para o CMV. **Coluna 1.** RNAs extraídos de partículas purificadas (a, b, c, d). **Coluna 2.** RNAs extraídos de folha de planta de fumo sadia. **Coluna 3.** RNAs extraídos de folha de fumo infectada pelo CMV-Cr (a, b, c, d). Os asteriscos indicam possíveis produtos de degradação ou DI RNAs.

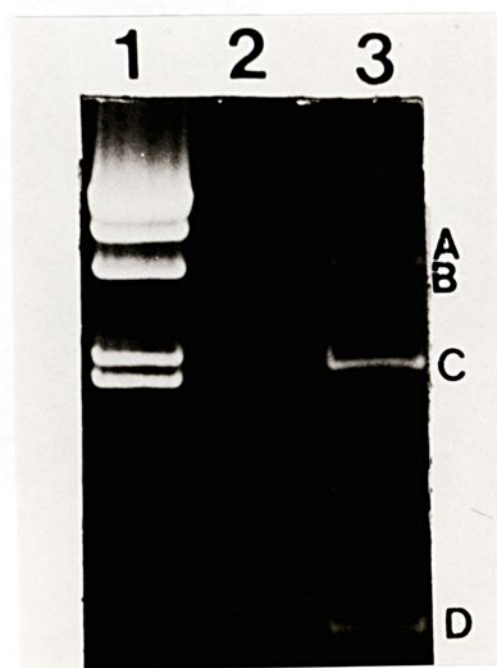


Figura 12. Perfil eletroforético dos dsRNAs extraídos e purificados em Celulose CF-11. **(1).** DNA de fago lambda digerido com Hind III. **(2).** dsRNAs extraídos de folhas de fumo controle (não inoculado). **(3).** Extração feita a partir de folhas de fumo infectado pelo CMV-Cr – dsRNAs 1, 2, 3 e 4, respectivamente, a, b, c, d.

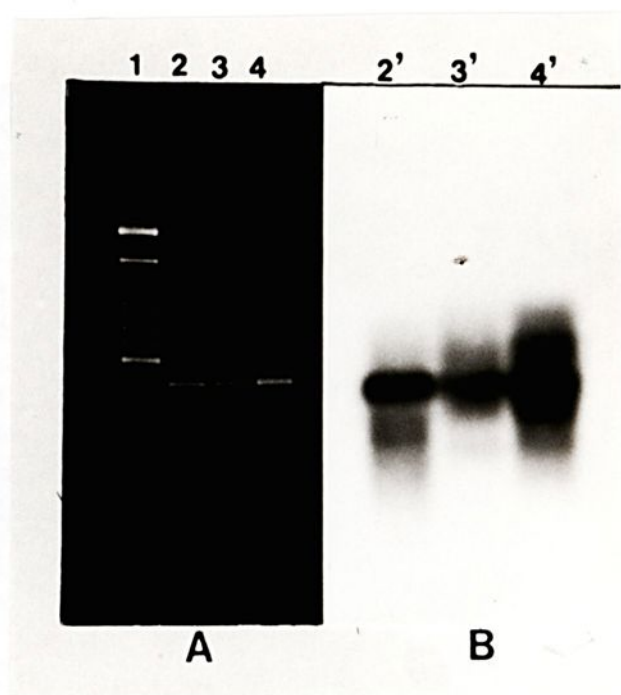


Figura 13. (A) Amplificação dos cDNAs da região da capa proteica dos isolados do CMV através de RT-PCR em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. 1. Marcador de 100 pb (Gibco-BRL). 2. Isolado obtido de *Catharantus roseus*. 3. Isolado obtido de *Passiflora* sp (maracujá). 4. Isolado obtido de *Musa* sp (banana). **(B)** "Southern blot" de um gel similar ao (A) usando sonda específica para região do gene da capa proteica do CMV produzida através de PCR.

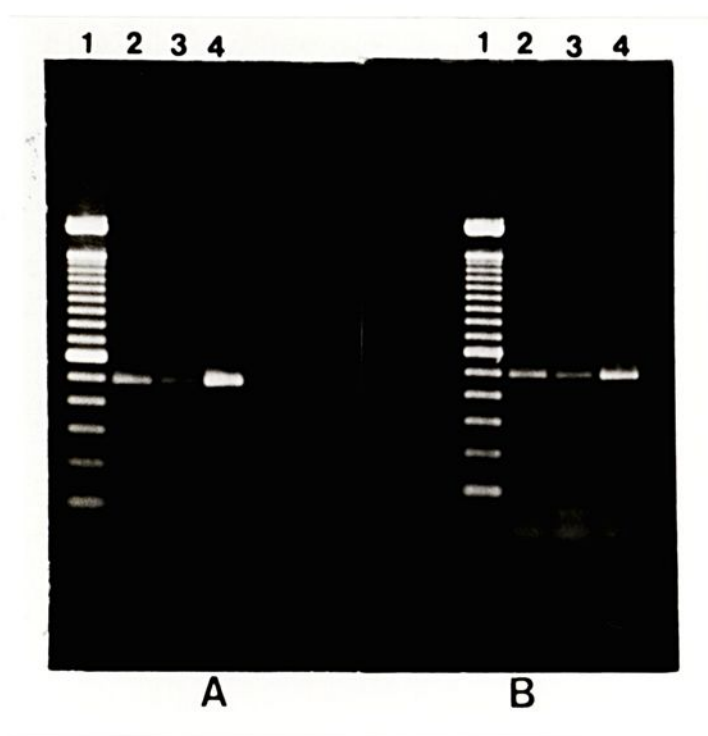


Figura 14. Análise dos produtos amplificados por RT-PCR digeridos pelas endonucleases de restrição utilizando gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. **(A)** Digestões utilizando a enzima Eco RI. **(B)** Digestões utilizando-se a enzima Bam HI. 1. Marcador molecular 100 pb (Gibco-BRL). 2. CMV isolado de *Catharantus roseus*. 3. Isolado de *Passiflora* sp. 4. Isolado de *Musa* sp.

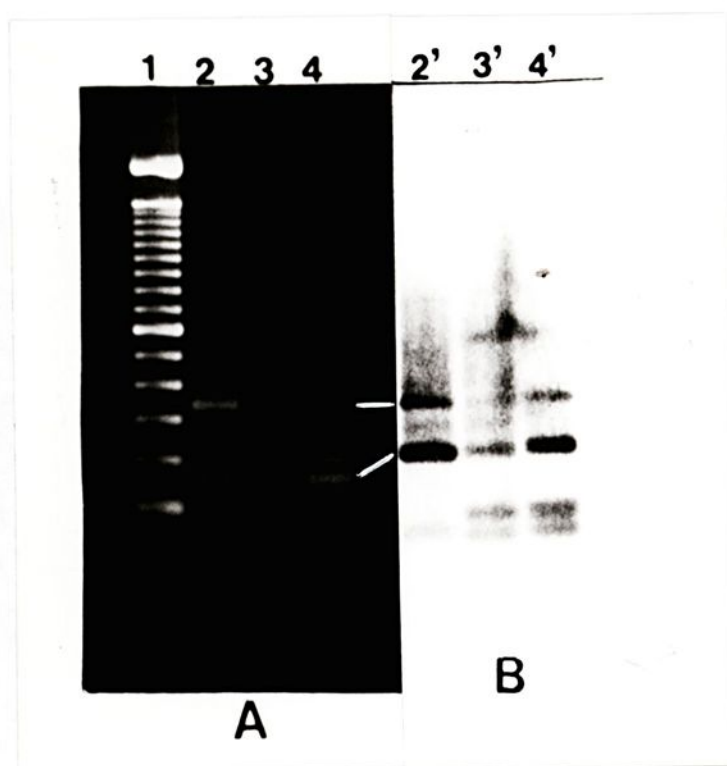


Figura 15. (A) Análise em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio dos produtos amplificados por RT-PCR digeridos pela endonuclease de restrição Msp I. 1. Marcador molecular 100 pb (Gibco-BRL). 2. CMV isolado de *Catharantus roseus*. 3. Isolado de *Passiflora* sp. 4. Isolado de *Musa* sp. **(B)** "Southern blot" de um gel similar ao (A) hibridizado com sonda específica para a região da capa proteica viral.

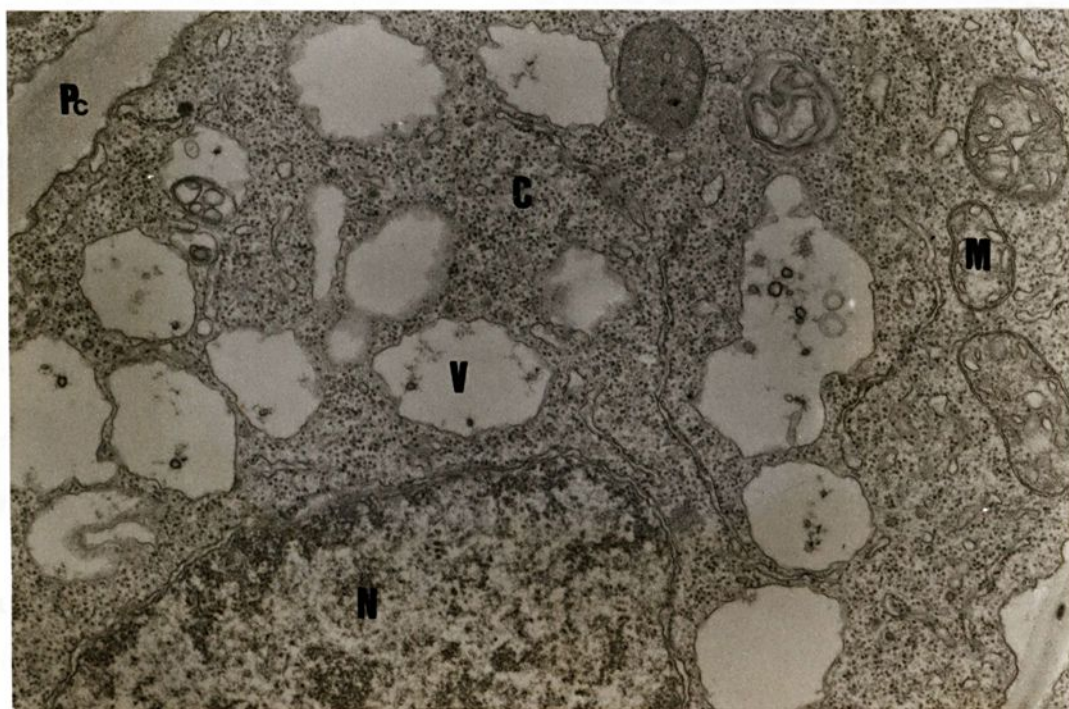


Figura 16. Micrografia eletrônica de célula de folha de fumo infectada pelo CMV-Cr, evidenciando intensa vacuolização no citoplasma. C = citoplasma; M = mitocôndria; N = núcleo; Pc = parede celular; V = vacúolo (aumento: 25.860 X).

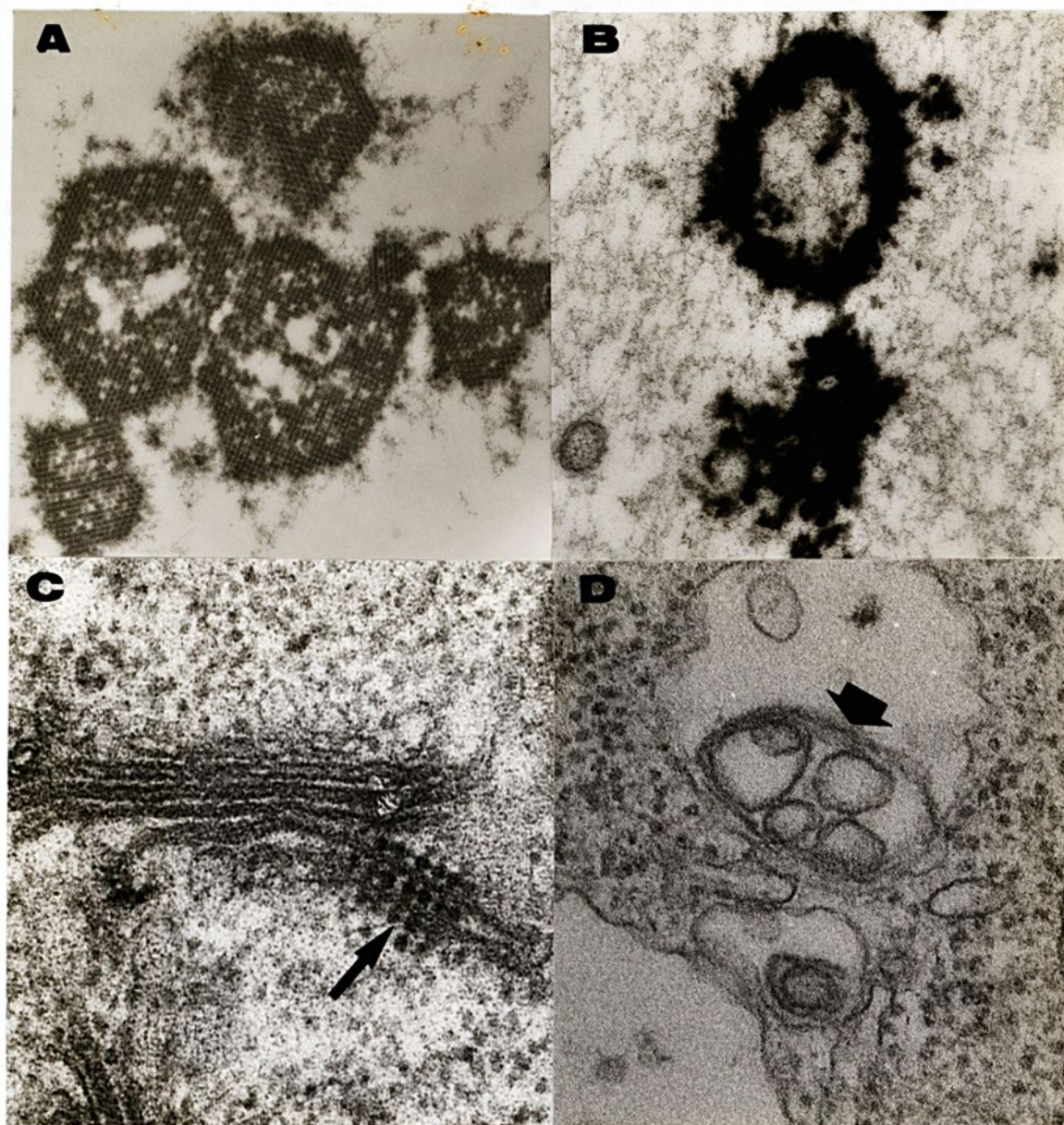


Figura 17. Micrografias eletrônicas mostrando alterações surgidas nas células de folha de fumo infectadas pelo CMV-Cr. **(A)** Cristais de diversos tamanhos formados por partículas isométricas encontradas no vacúolo (aumento: 38.808 X). **(B)** Substância amorfa densa aos elétrons encontrada no vacúolo (aumento: 43.120 X). **(C)** Partículas virais (seta) associadas à membrana do dictiossomos (aumento: 122.320 X). **(D)** Corpos mielínicos (seta) associados ao tonoplasto (aumento: 95.682 X).



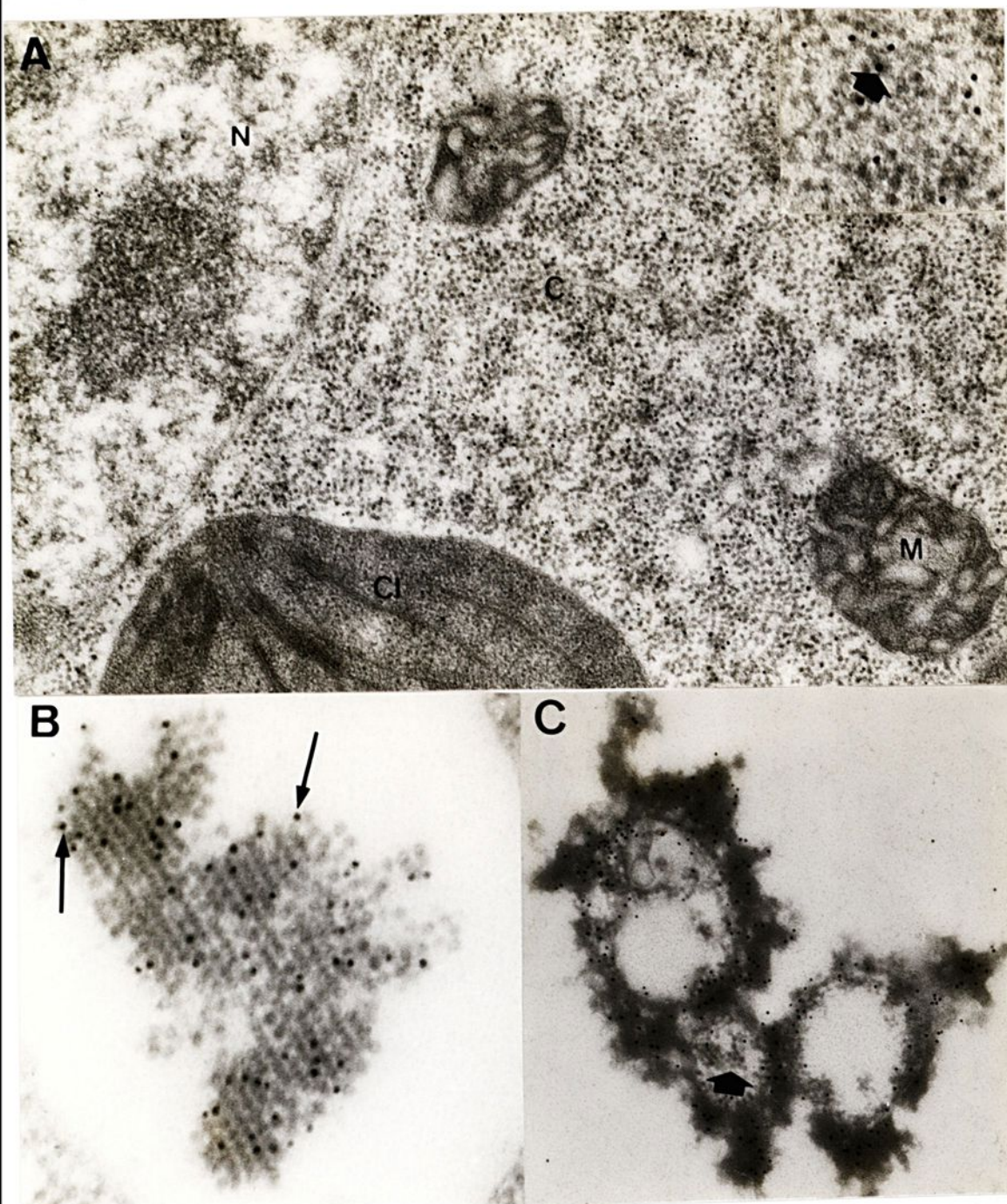


Figura 18. (A) Imunomarcção de proteínas da capa proteica viral em tecido foliar de planta de fumo infectada pelo CMV-Cr, utilizando-se anti-soro específico e ouro coloidal. C = citoplasma; Cl = cloroplasto; M = mitocôndria; N = núcleo (aumento: 50.100 X). A inserção mostra a ampliação de uma região do citoplasma evidenciando a marcação com ouro coloidal (seta) (aumento: 133.600 X). (B) Imunomarcção (setas) de um cristal encontrado no vacúolo (aumento: 133.089 X). (C) Imunomarcção da substância amorfa encontrada no vacúolo. Notar presença de partículas virais (seta) (aumento: 52.820 X).

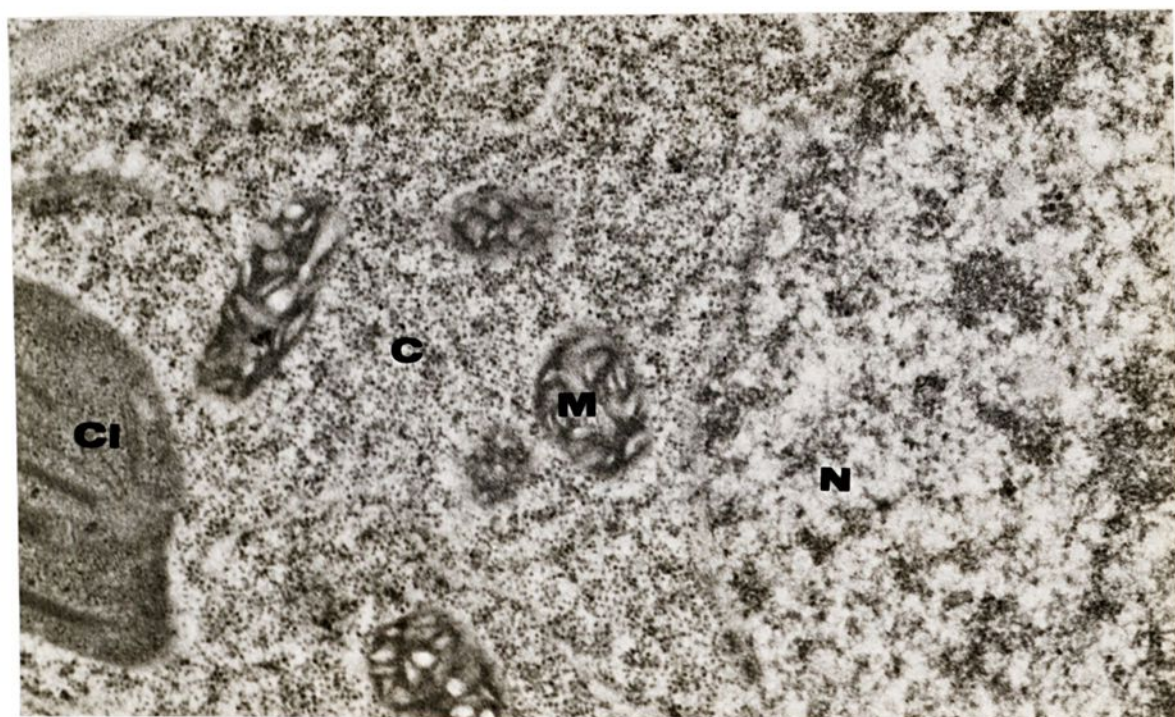


Figura 19. Controle de reação de célula de folha de fumo infectada pelo CMV-Cr incubada com soro normal e ouro coloidal. Notar ausência de marcação. C = citoplasma; Cl = cloroplasto; M = mitocôndria; N = núcleo (aumento: 32.400 X).

V. DISCUSSÃO

Dentre os 32 gêneros de vírus vegetais existentes (Martelli, 1992), o do Cucumovirus se constitui num dos mais importantes devido ao grande número de hospedeiras e ao dano econômico ocasionado por seus membros em algumas espécies vegetais (Costa *et al.*, 1971; Hollings & Stone, 1971; Mink, 1972; Tobias *et al.*, 1982).

O vírus do mosaico do pepino é a espécie tipo do gênero cucumovirus e apresenta uma grande gama de hospedeiras, estimada em mais de 750 espécies em 365 gêneros de 85 famílias (Douine *et al.*, 1979), sendo responsável por muitas doenças em plantas de importância econômica. O registro do CMV nos Estados da Bahia (Chagas *et al.*, 1984), Ceará (Lima & Santos, 1985), Goiás (Lin *et al.*, 1981; Rodrigues *et al.*, 1984), Pará (Caner, 1969; Costa *et al.*, 1970; Kitajima *et al.*, 1980), Pernambuco (Medeiros, 1963), Piauí (Lin *et al.*, 1982), Paraná (Silberschmidt, 1963; Lima Neto *et al.*, 1983; Lima *et al.*, 1984), Rio de Janeiro (Robbs, 1964; Costa & Robbs, 1971; Ribeiro *et al.*, 1975), Rio Grande do Norte (Lin, 1982), São Paulo (Silberschmidt & Nóbrega, 1941; Nóbrega, 1947; Silberschmidt, 1955; Caner & Ikeda, 1972; Costa & Kitajima, 1972; Costa *et al.*, 1972; Lin *et al.*, 1980; Kudamatsu *et al.*, 1981; Cereda, 1983; Costa, 1983; Colariccio *et al.*, 1984; Espinha & Gaspar, 1997) e Mato Grosso do Sul (Dusi *et al.*, 1992) demonstram sua ampla distribuição no território nacional.

Entre as hospedeiras do CMV incluem-se *Vinca rosea* (Wellman, 1935) e *Vinca minor* (Smith & Davis, 1986). No Brasil, plantas de *Catharantus roseus* infectadas pelo vírus do mosaico do pepino foram encontradas na região de Campinas, SP (Costa, 1983) e em uma região, não especificada, do interior desse Estado (Duarte *et al.*, 1992). Esses dados e aqueles relatados neste trabalho, indicam que o CMV pode ter uma distribuição geográfica bem mais ampla nessa hospedeira e, como postulado por Costa (1983), constituir importante reservatório desse vírus.

Os resultados obtidos quanto a hospedeiras e sintomatologia estão, em geral, de acordo com aqueles descritos por Smith & Davis (1986) e por Duarte

et al. (1992) sendo as diferenças observadas, relacionadas com o tipo de intensidade dos sintomas. Como relatado por Francki & Hatta (1980), a diversidade dos sintomas apresentados por isolados do CMV é bastante grande, tornando esta propriedade insatisfatória para identificação desse vírus. O diagnóstico baseado na sintomatologia é ainda mais complicado devido à variação de condições ambientais e também à presença de RNAs satélites em alguns isolados, o que contribui para a variação na expressão dos sintomas. Mossop e Francki (1979) relataram que a atenuação dos sintomas em plantas infectadas por várias estirpes do CMV era devido a um RNA satélite. Por outro lado, Kaper e Waterworth (1977) mostraram que o RNA satélite por eles estudado atenuava os sintomas em algumas hospedeiras, mas não em tomate, causando sintomas necróticos severos não comuns. Finalmente, Francki e Hatta (1980) concluíram que os sintomas exibidos por uma planta infectada por um vírus são determinados por interações entre o genoma viral, a planta hospedeira e o ambiente. Assim, como todos estes fatores são variáveis, não é surpreendente que a sintomatologia não seja um bom caráter para a identificação do vírus.

O método utilizado neste trabalho para a purificação do CMV-Cr combina extração, clarificação, precipitação com polietilenoglicol, filtração em gel de Sephacryl S-1000 e concentração por filtração em membrana, sem a utilização de ultracentrifugações (Gaspar *et al.*, 1995). A maioria dos métodos usados para a purificação do CMV constitui modificações daqueles desenvolvidos por Scott (1963) e Lot e colaboradores (1972). Alguns autores utilizam centrifugações diferenciais (Dusi *et al.*, 1992; Maciel-Zambolim *et al.*, 1990; Smith, 1986) e ultracentrifugação em gradiente de densidade de sacarose (Maciel-Zambolim *et al.*, 1990). O método de purificação aqui utilizado, através de filtração em gel de Sephacryl S-1000 que possui faixa de fracionamento de 500.000-100.000.000, constitui uma alternativa bastante atrativa para a purificação desse vírus, já que os outros métodos requerem ultracentrífugas muito caras. Assim, esta metodologia constitui um meio bastante simples e rápido, tornando-se alternativa de baixo custo para laboratórios que não dispõem de ultracentrífugas. Como evidenciado por eletroforese em SDS-PAGE, a preparação purificada do CMV-Cr mostra-se pura e, ao ser analisada em

espectrofotômetro sob luz ultravioleta, apresenta curva típica de nucleoproteína. O rendimento de 11 mg de vírus por Kg de folha pode ser considerado dentro da média obtida para o CMV por outros autores (Tomlinson *et al.*, 1973; Brioso, 1986) mas muito abaixo dos valores obtidos – 475 mg/Kg e 1 g/Kg – respectivamente por Lot *et al.* (1972) e Palukaitis *et al.* (1992). Obviamente, esses resultados dependem do isolado do vírus e da hospedeira utilizada, assim como do intervalo entre inoculação e colheita e do método de extração.

A proteína capsidial do CMV-Cr migrou, em gel desnaturante de SDS-PAGE, como único polipeptídeo com massa molecular estimada de 27 kDa. Este valor está pouco abaixo daquele descrito por Smith (1986), para o CMV isolado de *V. minor* nos EUA (29 kDa), porém ambos estão dentro dos valores descritos para outros isolados do CMV (determinados em SDS-PAGE), variando de 24,5 kDa (Habili & Francki, 1974) a 31 kDa (Maciel-Zambolim *et al.*, 1990). Essas divergências em relação à variação de massa molecular têm sido atribuídas ao fato de que diferentes proteínas não ligam quantidades uniformes de SDS levando a comportamento anômalo em SDS-PAGE (Matthews, 1991). Variações de valores são também encontradas quando as estimativas de massa molecular são feitas em géis de diferentes concentrações e em diferentes laboratórios. Além disso, a substituição de certos grupos de aminoácidos numa proteína pode levar à mudanças na massa molecular. Matthews (1974) demonstra, por exemplo, que após carboxi metilação a proteína capsidial do vírus do mosaico amarelo do nabo ("Tyrnyp yellow mosaic virus") tem a massa molecular, em SDS-PAGE, de 23.000 Da contra 20.100 Da sem a carboxi metilação. Deve-se salientar, entretanto, que dados da sequência de aminoácidos da capa proteica de vários isolados do CMV (deduzidos da sequência de nucleotídeos) indicam a presença de 218 aminoácidos, com massa molecular variando de 24.159 a 24.300 Da (Palukaitis *et al.*, 1992).

A presença do CMV-Cr em extratos de folhas de *C. roseus* foi também evidenciada por imunodeteção em "Western blotting". No extrato de folha infectada, uma banda pôde ser identificada após reação com anti-soro para o CMV. Alguns polipeptídeos menores também reagem com o anti-soro e, provavelmente,

representam produtos de degradação proteolítica da proteína capsidial, um evento também observado por outros pesquisadores (Roberts & Wood, 1981).

O perfil eletroforético do RNA genômico do CMV-Cr mostrou a presença de 4 RNAs com tamanho similar a outros isolados do vírus do mosaico do pepino (Palukaitis *et al.*, 1992). Não foi observado nenhum RNA que pudesse corresponder a um RNA satélite. Entretanto, como os RNAs satélites replicam eficientemente em algumas hospedeiras e muito pouco em outras (Mossop & Francki, 1979), a constatação de RNA satélite depende do hospedeiro utilizado para a multiplicação do vírus podendo-se detectar ou não o mesmo, no entanto, não se descarta a possibilidade de ser uma característica do isolado (Waterworth *et al.*, 1978), além do fato de que não foram encontrados RNAs satélites mesmo após 6 passagens em série em plantas de fumo, o que possibilitaria o surgimento espontâneo de satélites (Rizzo & Palukaitis, 1990).

Como pode ser visto na Figura 9, a sonda produzida reage especificamente com o RNA viral sem nenhuma reação com RNAs de planta sadia.

Através do "Northern blotting" e hibridização com sonda específica para os RNAs do CMV, foi possível detectar todos os três RNAs genômicos, bem como o RNA subgenômico codificador da proteína capsidial em extratos de RNAs totais de planta de fumo infectada pelo CMV-Cr, como mostra a figura 11. Esses dados estão de acordo com aqueles descritos para outros isolados do CMV (revisado por Palukaitis *et al.*, 1992). É interessante notar, entretanto, a presença de duas outras bandas, que aparecem entre as posições dos RNAs 3 e 4 (asteriscos na figura 11). Essas duas bandas, correspondentes a RNAs de 1.93 Kb e 1.5 Kb, não foram detectadas nos RNAs obtidos de partículas purificadas do CMV-Cr, indicando não serem "encapsidadas". No trabalho de Ding e colaboradores (1995) observa-se a presença de duas bandas entre os RNAs 3 e 4 extraídos de plantas infectadas (similares às encontradas neste trabalho), embora os autores não façam comentários sobre as mesmas. É bem provável que esses dois RNAs sejam RNAs derivados do genoma do vírus por deleções internas ou complexos de rearranjos de sequências genômicas ("DI RNAs – defective interfering RNAs"), que surgem depois de várias passagens do vírus nas hospedeiras (Graves & Roossinck, 1995).

É possível ainda que esses dois RNAs sejam tão somente produtos de degradação de outros RNAs do CMV gerados pelo catabolismo celular.

Quatro espécies de RNAs de fita dupla foram detectados em plantas de fumo infectadas pelo CMV-Cr, visualizados na figura 12, cujos tamanhos moleculares foram determinados por comparação com os tamanhos moleculares de fragmentos de DNA. Os valores obtidos (RNA 1: 3.9 Kpb; RNA 2: 3.3 Kpb; RNA 3: 2.5 Kpb; RNA 4: 1.0 Kpb) são discrepantes em relação aos valores esperados, baseados no tamanho molecular dos RNAs de fita simples. Isso se deve, com certeza, ao fato de a comparação ter sido feita com padrão de fragmentos de DNA, os quais apresentam ligeira diferença na migração em comparação às moléculas de RNA (Sambrook *et al.*, 1989). Quando o dsRNA foi desnaturado e aplicado em gel desnaturante de agarose-formaldeído, os valores obtidos foram similares àqueles dos RNAs extraídos das partículas virais (3.4 Kb, 3.0 Kb, 2.2 Kb, e 1.0 Kb). Nenhum RNA de fita dupla foi obtido a partir de folhas de fumo sadio.

É interessante notar que em todas as preparações de dsRNA, a concentração de ds RNA 3 foi sempre maior quando comparada com aquelas dos RNAs 1, 2 e 4. Embora os autores não façam comentário a esse respeito, uma análise das fotos publicadas por Pares *et al.* (1992), mostra que existe variação na concentração dos diferentes dsRNAs extraídos de 26 isolados do CMV. É possível que esse aspecto possa ter valor como meio de identificação de isolados brasileiros do CMV, além de uma possível disparidade no padrão de migração dos 4 dsRNAs.

A análise eletroforética dos dsRNAs do CMV-Cr, mostrou também a ausência de RNA satélite, assim como demonstrado na análise dos RNAs extraídos de partículas virais purificadas. Mesmo após seis passagens sucessivas por plantas de fumo, nenhuma alteração no perfil eletroforético dos dsRNAs foi detectada. Esses resultados reforçam a hipótese de que isolados brasileiros não possuem RNAs satélites como observado por outros pesquisadores (Brioso, 1986). Embora mais recentemente, Boari e colaboradores (1998), caracterizaram 5 RNAs satélites de isolados do CMV do subgrupo I, utilizando "primers" específicos para a sequência de RNAs satélites.

O vírus do mosaico do pepino é encontrado em quase todas as partes do mundo, ocorrendo inúmeros variantes (isolados) que diferem no tipo de sintomas induzidos. Os isolados do CMV podem ser divididos em dois subgrupos (I e II) com base em diferentes critérios incluindo-se sorologia, sintomatologia, gama de hospedeiras, mapeamento peptídico da capa proteica, hibridização de ácido nucleico e RT-PCR/RFLP. Esta divisão de isolados do CMV em dois subgrupos é baseada na variação da sequência de nucleotídeos que existe entre isolados (Palukaitis *et al.*, 1992).

As técnicas de RT-PCR/RFLP foram usadas por alguns autores para incluir isolados do CMV em um dos dois subgrupos (Singh *et al.*, 1995; Wylie *et al.*, 1993; Rizos *et al.*, 1992). A digestão de um fragmento (488 pb) amplificado do gene da capa proteica do CMV pela enzima Msp I resulta em padrões de digestão diferentes para os dois subgrupos, sendo que esta digestão resulta em dois fragmentos de 337 e 151 pb para isolados do subgrupo I e em três fragmentos de 197, 151 e 126 pb para isolados do subgrupo II (Singh *et al.*, 1995).

Uma região do gene da capa proteica de três isolados do CMV foi amplificada usando RT-PCR (Figura 13 A). Esta região amplificada foi reconhecida por sonda produzida a partir de PCR, indicando tratar-se de sequências específicas do CMV (Figura 13 B).

Com o objetivo de determinar a qual subgrupo pertence o CMV-Cr, bem como dois outros isolados (*Passiflora sp* e *Musa sp*) usados para efeito comparativo, os fragmentos amplificados de 486 a 488 pb foram digeridos com as enzimas de restrição Eco RI, Bam HI e Msp I. As enzimas Eco RI e Bam HI não digeriram os fragmentos amplificados dos três isolados (Figura 14 A e B, respectivamente). Entretanto, a digestão com a enzima Msp I resultou em dois fragmentos de 337 e 151 pb para os três isolados, sendo que o fragmento amplificado do isolado de banana, após ter sido digerido com Msp I produziu além dos dois fragmentos citados, um outro de cerca de 197 pb (Figura 15 A).

A sonda produzida por PCR reconheceu especificamente os fragmentos digeridos pela enzima Msp I, comprovando que estes pertencem à região do gene da capa proteica viral amplificada e cortada nos sítios de restrição,

como mostra a figura 15 B. O fragmento de 197 pb do isolado de banana digerido pela Msp I mostrado na figura 15 A, não foi reconhecido pela sonda (fig. 15 B), sendo, portanto, um produto não específico da reação do PCR e não pertencente à região amplificada do gene da capa proteica. O tamanho dos fragmentos resultantes da digestão pela endonuclease de restrição Msp I, são iguais aos obtidos para o isolado de banana caracterizado por Singh e colaboradores (1995).

Considerando que a sequência do RNA 4 de todas as estirpes do subgrupo II contém um único sítio para Eco RI, o qual está ausente na sequência do RNA 4 do subgrupo I (Anderson *et al.*, 1995) e, ainda considerando que a endonuclease de restrição Msp I contém um sítio de restrição na sequência amplificada do RNA 4 para o subgrupo I e dois para o subgrupo II, os padrões resultantes das digestões utilizando tais enzimas mostraram que o isolado do CMV obtido de *Catharantus roseus* pertence ao subgrupo I, assim como os isolados de maracujá e banana.

Esses resultados corroboram as evidências de que isolados pertencentes ao subgrupo I são predominantes nas regiões tropicais e subtropicais (Hasse *et al.*, 1989), como também demonstrado por Boari e colaboradores (1997), que analisaram 30 isolados obtidos dos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo, identificando que somente um pertence ao subgrupo II, e os outros 29 isolados ao subgrupo I.

O método de RT-PCR aliado às digestões por endonucleases de restrição constitui-se em uma técnica rápida para classificar os isolados do CMV. O uso da técnica de PCR e um único par de "primers" específicos ao gene da capa proteica do CMV é bastante útil também no diagnóstico da doença, podendo ser usado como método alternativo ou aliado à outras técnicas para diagnosticar a doença.

A sonda produzida através de PCR, pode também ser utilizada como método alternativo para detecção de RNAs do CMV, uma vez que esta é uma técnica conveniente, pois grandes quantidades de sonda específica pode ser obtida em poucas horas, a partir de pequena quantidade de cDNA. Essa sonda, assim como a produzida anteriormente ficarão armazenadas e poderão ser usadas

futuramente, como por exemplo, no diagnóstico dessa virose em plantas, detecção de RNAs virais *in situ*, análise de RNAs de fita única ou dupla, etc.

A observação de seções ultrafinas de tecido foliar infectado pelo CMV-Cr mostrou que a alteração citológica mais proeminente foi a intensa vacuolização no citoplasma (Figura 16). Esta parece ser uma característica comum para as células invadidas pelos membros do gênero cucumovirus (Gerola et al., 1965; Russo & Martelli, 1973) e aparentemente os vacúolos surgem do inchamento de cisternas do retículo endoplasmático que, com o progresso da infecção, se juntam uns aos outros e com o vacúolo central (Martelli & Russo, 1985).

O aparecimento de cristais formados por partículas isométricas e o acúmulo de substância de natureza amorfa dentro dos vacúolos foram também freqüentes nas células infectadas pelo CMV-Cr (Figura 17 A, B). Cristais similares a esses foram encontrados no citoplasma de células infectadas por outros isolados do CMV (Russo & Martelli, 1973; Honda & Matsui, 1974) mas foram mais freqüentemente encontrados nos vacúolos (Gerola et al., 1965; Russo & Martelli, 1973; Honda & Matsui, 1974; Ehara et al, 1976; Hatta & Francki, 1979). Os corpos amorfos, associados ou não com partículas virais, foram também encontrados em células infectadas por membros do gênero cucumovirus, sendo descritos como de constituição desconhecida (Martelli & Russo, 1985) e lembram estruturas vistas em células infectadas por Comovirus e Nepovirus (Russo et al., 1982; Di Franco et al., 1983). No presente trabalho, a utilização da imunomarcação com anti-soro específico para a proteína capsial do CMV e ouro coloidal permitiu identificar os cristais como sendo formados de partículas do CMV (Figura 18 B) e que os corpos amorfos são constituídos, pelo menos em parte, de proteína capsial (Figura 18 C). É mais provável que os corpos amorfos sejam produtos de degradação de partículas virais, visto que estas aparecem, às vezes, fazendo parte desses corpos (Figura 18 C, seta).

Uma associação particular encontrada em células infectadas pelo CMV-Cr foi a presença de partículas entre membranas dos dictiossomos (Figura 17 C). Esta particularidade só havia sido antes descrita para o "Tomato aspermy cucumovirus" (Lawson & Hearon, 1970; Martelli & Russo, 1985). O papel dessa

associação no ciclo de multiplicação do CMV, se algum, ainda esta por ser determinado.

A presença de corpos mielínicos (ou corpos membranosos) foi apenas esporádica em células infectadas pelo CMV-Cr e na maioria das vezes eram associados com o tonoplasto (Figura 17 D). Tais corpos membranosos parecem não ser uma característica de células infectadas visto estarem também presentes em células sadias (Gerola et al., 1965; Ehara, 1979) sendo, entretanto, maiores e estruturalmente mais complexos nas células invadidas pelos cucumovirus. Sua função, se alguma houver, é ainda desconhecida.

No citoplasma a identificação de partículas do CMV-Cr, quando não arranjadas em agregados ordenados (cristais), foi bastante difícil visto que elas podem ser confundidas com os ribossomos como já anteriormente descrito para outros cucumovirus (Matsui & Yamaguchi, 1966; Honda & Matsui, 1974). Entretanto, através de imunomarcação utilizando-se anti-soro específico para a capa proteica viral e ouro coloidal, verificou-se intensa marcação no citoplasma indicando que muitas das partículas similares a ribossomo eram partículas virais (Figura 18 A). Obviamente, alguma marcação encontrada no citoplasma pode representar proteína capsidial livre não formando partículas. Anteriormente, somente Lin e colaboradores (1996) haviam utilizado imunomarcação para detectar proteína capsidial do CMV em células infectadas. Esses autores detectaram marcação no citoplasma, núcleo e periferia do nucléolo. No presente estudo, nenhuma marcação foi encontrada no núcleo de células infectadas pelo CMV-Cr (Figura 18 A), indicando que a presença da proteína capsidial do CMV no núcleo provavelmente representa uma reação particular de uma determinada estirpe do vírus em uma determinada hospedeira, não constituindo uma característica geral para os cucumovirus.

Cloroplastos e mitocôndrias são organelas que não se mostraram estruturalmente afetadas pela infecção do CMV-Cr (Figuras 16; 18 A). Alterações morfológicas nessas duas organelas têm sido descritas para os três membros do gênero cucumovirus mostrando, entretanto, grande variação na extensão das alterações (Gerola et al., 1965; Russo & Martelli, 1973; Honda & Matsui, 1974).

Secções de células infectadas pelo CMV-Cr quando incubadas com soro normal ou anti-soro não homólogo não mostraram nenhuma marcação (Figura 19) evidenciando a especificidade da reação com anti-soro homólogo.



VI. CONCLUSÕES

01. O vírus causador de mosaico e distorção foliar em *Catharantus roseus* é o vírus do mosaico do pepino.
02. O método de purificação em Sephacryl S-1000 permitiu a purificação do vírus do mosaico do pepino em concentrações satisfatórias para estudos bioquímicos e moleculares.
03. A massa molecular da proteína capsidial do CMV-Cr, determinada em SDS-PAGE, é 27 kDa.
04. Os tamanhos moleculares dos RNAs extraídos de partículas purificadas do CMV-Cr são: RNA-1, 3,4 Kb; RNA-2, 3,0 Kb; RNA-3, 2,2 Kb e RNA-4, 1,0 Kb.
05. Extratos de RNAs totais de plantas infectadas pelo CMV-Cr possuem dois RNAs adicionais de tamanhos 1,93 Kb e 1,5 Kb não encontrados em preparações purificadas do vírus.
06. Quatro espécies de RNAs de fita dupla são detectados em plantas de fumo infectadas pelo CMV-Cr, com tamanhos de 3,9 kbp, 3,3 kbp, 2,5 kbp e 1,0 kbp.
07. O isolado do CMV obtido de *Catharantus roseus* não possui RNA satélite.
08. O CMV-Cr pertence ao subgrupo I do gênero cucumovirus.
09. O CMV-Cr induz intensa vacuolização no citoplasma de folhas de fumo.
10. Partículas do CMV-Cr são encontradas dispersas no citoplasma e na forma de cristais frequentes nos vacúolos.
11. Partículas do CMV-Cr são também encontradas em associação com membranas dos dictiossomos.
12. Os corpos de natureza amorfa induzidos pelo CMV-Cr são constituídos, pelo menos em parte, de proteína capsidial.
13. Partículas do CMV-Cr (ou proteína capsidial livre) não são encontradas nos cloroplastos, mitocôndrias e núcleos de células de fumo infectadas.



VII. RESUMO

O presente trabalho descreve a caracterização de um isolado do vírus do mosaico do pepino ("cucumber mosaic virus", CMV) obtido de *Catharantus roseus* na região de São José do Rio Preto (Noroeste paulista) e denominado CMV-Cr.

O vírus infectou localmente *Chenopodium quinoa* Willd. e *Datura metel* L., e sistemicamente plantas de *Nicotiana tabacum* L. "TNN", *Nicotiana benthamiana* L., *Cucurbita pepo* L. "caserta", *Cucumis sativus* L. e *Gomphrena globosa* L. e não infectou e nem foi recuperado de *Phaseolus vulgaris* L. "carioca", "Jalo", "rajado", *Vigna unguiculata* Walp., *Brassica oleraceae* L. "acephala" e *Raphanus sativus* L.

O CMV-Cr foi purificado a partir de folhas de fumo através de filtração em gel de Sephacryl S-1000 produzindo preparações de bom grau de pureza e concentrações de 11 mg/Kg de tecido de planta infectada.

Através de eletroforese em gel desnaturante SDS-PAGE foi determinada a massa molecular da proteína capsidial com valor estimado de 27 kDa. Em SDS-PAGE, uma análise comparativa de extratos de planta infectada e sadia não evidenciou diferenças entre elas, mas a proteína capsidial foi detectada por "Western blot" utilizando-se anti-soro específico para o CMV.

A eletroforese em gel de agarose do RNA extraído de partículas do CMV-Cr revelou 4 bandas com tamanho de 3,4 Kb, 3,0 Kb, 2,2 Kb e 1,0 Kb. Utilizando-se esses RNAs como molde produziu-se uma sonda molecular não radioativa que reconhece especificamente todos os RNAs virais e não reconhece RNAs de plantas sadias. Através de "Northern blot" e hibridização com a sonda específica detectou-se todos os três RNAs genômicos e o RNA subgenômico codificador da capa proteica em extratos de plantas infectadas pelo CMV-Cr. Duas outras bandas adicionais (1,93 Kb e 1,5 Kb) foram também detectadas, as quais não foram observadas em preparações purificadas do vírus.



Quatro espécies de RNAs de fita dupla (dsRNA) foram extraídas a partir de extratos de plantas infectadas pelo CMV-Cr com tamanhos de 3,9 kbp, 3,3 kbp, 2,5 kbp e 1,0 kbp.

Uma região do gene da capa proteica do isolado do CMV-Cr foi amplificada (488 pb) utilizando-se "primers" específicos e as técnicas de RT-PCR. Esta região amplificada foi reconhecida por sonda molecular específica para o CMV-Cr, indicando tratar-se de sequências específicas do CMV. O fragmento amplificado não foi digerido pelas enzimas de restrição Eco RI, Bam HI e quando digeridos pela enzima Msp I produziu dois fragmentos de 337 pb e 151 pb. Estes dados indicam que o CMV-Cr pertence ao subgrupo I, assim como dois outros isolados do CMV de maracujá e banana usados para comparação.

Células de folha de fumo infectadas pelo CMV-Cr mostraram intensa vacuolização no citoplasma. Dentro dos vacúolos puderam ser observados cristais e substâncias de natureza amorfa. Partículas isométricas semelhantes a vírus foram encontradas dispersas no citoplasma e, algumas vezes, em associação com dictiossomos. Corpos mielínicos foram raramente encontrados. Cloroplastos, mitocôndrias e núcleos não se mostraram estruturalmente afetados pela infecção pelo CMV-Cr.

A imunomarcagem de secções de folhas de fumo infectadas pelo CMV-Cr com anticorpos específicos para a proteína capsial mostrou intensa marcação no citoplasma, nos cristais e na substância amorfa. Quase nenhuma marcação foi verificada nos cloroplastos, mitocôndrias e núcleos.



VIII. SUMMARY

The present work describes the characterization of an isolate of the cucumber mosaic virus (CMV) obtained from *Catharantus roseus* in the region of São José do Rio Preto (northwest of São Paulo state) and designated CMV-Cr.

The virus infected locally *Chenopodium quinoa* Willd. and *Datura metel* L., and systemically plants of *Nicotiana tabacum* L., "TNN", *Nicotiana benthamiana* L., *Cucurbita pepo* L. "caserta", *Cucumis sativus* L. and *Gomphrena globosa* L. and did not infect and was not recovered from *Phaseolus vulgaris* L. "carioca", "Jalo", "rajado", *Vigna unguiculata* Walp., *Brassica oleraceae* L. "acephala" and *Raphanus sativus* L.

The CMV-Cr was purified from tobacco leaves by gel filtration using Sephacryl S-1000 which produced preparations with good purity and concentrations of 11mg/Kg of infected plant tissue.

By electrophoresis using denatured gel SDS-PAGE the molecular mass of coat protein was determined to have an estimated value of 27 kDa. In SDS-PAGE a comparative analysis of infected and healthy plants showed no difference between them, but the coat protein was detected by Western blot using anti-serum specific for CMV.

Electrophoresis in agarose gel of the RNA extracted from particles of CMV-Cr showed 4 bands with the sizes 3.4 Kb, 3.0 Kb, 2.2 Kb and 1.0 Kb. Using these RNAs as a template a non radioactive molecular probe was produced which recognizes specifically all viral RNAs but does not recognize RNAs of healthy plants. Using Northern blot and hybridization with the specific probe there were detected each of the three genomic RNAs and the subgenomic RNA wich codes for the coat protein in extracts of plants infected with CMV-Cr. Two other additional bands (1.93 Kb and 1.5 Kb) were also detected, which were not observed in purified preparations of the virus.

Four species of double stranded RNA (dsRNA) were obtained from extracts of plants infected with CMV-Cr, having sizes of 3.9 Kbp, 3.3 Kbp, 2.5 Kbp and 1.0 Kbp.



A region of the gene for the coat protein from the isolate of CMV-Cr was amplified (488 pb) using specific primers and RT-PCR techniques. The amplified region was recognized by molecular probe specific for CMV. The fragment recognized was not digested by the restriction enzymes Eco RI, Bam HI and when digested by enzyme Msp I produced two fragments having 337 pb and 151 pb. These data indicate that CMV-Cr belongs to subgroup I, as do the two other isolates of CMV of passion fruit and banana used as comparison.

Cells of tobacco leaf infected with CMV-Cr showed intense vacularization of the cytoplasm. Within of vacuoles could be seen crystals and a substance having an amorphous nature. Isometric virus-like particles were observed dispersed in the cytoplasm and sometimes associated with dictyosomes. Myelinics bodies were rarely encountered. Chloroplasts, mitochondria and nuclei were not structurally affected by infection with CMV-Cr.

The immunogold-labelling of sections of tobacco leaf infected with CMV-Cr with antibodies specific for the coat protein showed intense label in the cytoplasm, crystals and amorphous substance. Almost no label was verified in the chloroplasts, mitochondria and nuclei.



IX. LITERATURA CITADA

- AHLQUIST, P., STRAUSS, E.G., RICE, C.M., STRAUSS, J.H., HASELOFF, J., ZIMMERN, D. Sindbis virus proteins nsP1 and nsP2 contain homology to non-structural proteins from several RNA plant viruses. **Journal of Virology**, v. 53, p. 536-542, 1985.
- ANDERSON, B.J., BOYCE, P.M., BLANCHARD, C.L. Cucumber mosaic virus subgroup I and II RNA 4 sequences. **Gene**, v. 161, p. 293-294, 1995.
- ARARIPE, D.F.A., LIMA, J.A.A. Infecção natural do Vírus do Mosaico do Pepino em *Justicia sp.* **Fitopatol. bras.**, v. 18(Suplemento), p.12, 1993.
- ARGOS, P. A sequence motif in many polymerases. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 9909-9916, 1988.
- BARRADAS, M.M., ALEXANDRE, M.A.V., VICENTE, M. Solanáceas silvestres como hospedeiras experimentais de vírus: II – *Solanum lycocarpum* St. Hill., *S. mammosum* L. e *S. robustum* Wendl. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 46, p. 117-126, 1979.
- BIRD, J., SANCHEZ, J., TIO, M.AA., LIU, L.J. Effect of various temperatures on symptom expression by different plant species (cucumber, plantain, and banana) affected by cucumber mosaic virus. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v. 55, p. 70-77, 1971.
- BLANCHARD, C.L., BOYCE, P.M., ANDERSON, B.J. Cucumber mosaic virus RNA 5 is a mixed population derived from the conserved 3' terminal regions of genomic RNAs 2 and 3. **Virology**, v. 217, p. 598-601, 1996.



- BOARI, A.J., ZERBINI, F.M., MACIEL-ZAMBOLIM, E., CARVALHO, M.G. RT-PCR and restriction enzyme used to differentiate CMV isolates within subgroups I and II. **Fitopatologia brasileira**, v. 22(suplemento), p. 333 (Resumo nº 583), 1997.
- BOARI, A.J., ZERBINI, F.M., MACIEL-ZAMBOLIM, E., CARVALHO, M.G. Biological and molecular characterization of satellite RNAs associated with cucumber mosaic virus (CMV). **Fitopatologia brasileira**, v. 23 (suplemento), p. 313 (Resumo nº 574), 1998.
- BOUZOUBAA, S., NIESBACH-KLOSGEN, U., JUPIN, I., GUILLEY, H., RICHARDS, K., JONARD, G. Shortened forms of beet necrotic yellow vein virus RNA-3 and -4: internal deletions and a subgenomic RNA. **Journal General Virology**, v. 72, p. 259-266, 1991.
- BRADLEY, D.W., ZAITLIN, M. Replication of tobacco mosaic virus. II. The *in vitro* synthesis of high molecular weight virus-specific RNAs. **Virology**, v. 45, p. 192-199, 1971.
- BRIOSO, P.S.T. **Caracterização Biológica, Físico-Química e Sorológica de Isolados do Vírus do Mosaico do Pepino (Cucumber Mosaic Virus) no Brasil**. Brasília, Universidade de Brasília, 1986. 121 p. (Tese M.S.).
- BRUNT, A.A., CRABTREE, K., DALLWITZ, M.J., GIBBS, A.J. WATSON, L., ZURCHER, E.J. (EDS) (1996 ONWARDS). **Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from VIDE Database**. Version: 16th January 1997.
'URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vidc/>.
- BURGYAN, J., GRIECO, F., RUSSO, M. A defective interfering RNA molecule in cymbidium ringspot virus infections. **Journal of General Virology**, v. 70, p. 235-239, 1989.



- CANER, J. Doença de vírus em Pimenta do Reino. **O Biológico**, v. 35, p. 185, 1969.
- CANER, J., IKEDA, H. Doença de Vírus em cultura de Pimenta do Reino no Estado de São Paulo. **O Biológico**, v. 38, p. 93-94, 1972.
- CEREDA, E. Ocorrência de uma possível virose no maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). **Summa Phytopathologica**, v. 9, p. 30-31, 1983.
- CHAGAS, C.M., COLARICCIO, A., KUDAMATSU, M., LIN, M.T., BRIOSO, P.S.T., KITAJIMA, E.W. Estirpe incomum do vírus do mosaico do pepino (CMV) isolado de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Fitopatologia brasileira**, v. 9, p. 402, 1984.
- CHEN, J., MACFARLANE, S.A., WILSON, T.M.A. Detection and sequence analysis of a spontaneous deletion mutant of soil-borne wheat mosaic virus RNA 2 associated with increased symptom severity. **Virology**, v. 202, p. 921-929, 1994.
- CHOU, Q., RUSSEL, M., BIRCH, D.E., RAYMOND, J., BLOCH, W. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. **Nucleic Acids Research**, v. 20, p. 1717-1723, 1992.
- CHRISTIE, R.G., EDWARDSON, J.R. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. **Fla. Agric. Exp. Stn. Monogr.**, v. 9, 1977.
- COLARICCIO, A., KUDAMATSU, M., CHAGAS, C.M., VEGA, J., CEREDA, E. Possível ocorrência do vírus do Mosaico do Pepino (CMV) em Maracujá Amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 10, p. 118-119, 1984.



- CORNELISSEN, B., BOL, J. Homology between proteins encoded by tobacco mosaic virus and two tricornaviruses. **Plant Molecular Biology**, v. 3, p. 379-384, 1984.
- COSTA, A.S. Tornou-se rara a ocorrência do vírus do mosaico do pepino em plantações de alface e tomate no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 9, p. 39 (Resumo nº 27), 1983.
- COSTA, A.S., KITAJIMA, E.W. Ocorrência de mosaico em milho no Estado de São Paulo, causada pelo Vírus do Mosaico do Pepino. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v. 5, p. 159-160, 1972.
- COSTA, A.S., ROBBS, C.F. Morte dos ponteiros da baunilha causada pelo Vírus do Mosaico do Pepino. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v. 4, p. 36-37, 1971.
- COSTA, A.S., KITAJIMA, E.W., NAGAI, H. Alguns vírus que afetam o pepino (*Cucumis sativus* L.) em São Paulo. **Revista de Oleicultura**, v. 12, p. 100-101, 1972.
- COSTA, A.S., SILVA, D.M., KITAJIMA, E.W. Vírus que infectam o cafeeiro sob condições experimentais. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v. 4, p. 34, 1971.
- COSTA, A.S., ALBUQUERQUE, F.C., IKEDA, H., CARDOSO, M. Moléstias da pimenta-do-reino causada pelo Vírus do Mosaico do Pepino. **Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Nordeste (IPEAN) Série: Fitotécnia**, v. 1, p. 3-18, 1970.



CUOZZO, M., O'CONNELL, K., KANIEWSKI, W., FANG, R.-X., CHUA, N.-H., TUMER, N.E. Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. **Bio/Technology**, v. 6, p. 549-557, 1988.

DAVIES, C., SYMONS, R.H. Further implications for the evolutionary relationships between tripartite plant viruses based on cucumber mosaic virus RNA 3. **Virology**, v. 165, p. 216-224, 1988.

DEVERGNE, J.C., CARDIN, L. Contribution a l'etude du virus de la mosaïque du cocombre (CMV) IV. Essai de classification de plusieurs isolats sur la base de leur structure antigenique. **Ann. Phytopathol.**, v. 5, p. 409-430, 1973.

DIAZ-RUIZ, J. R., & KAPER, J. M. Nucleotide sequence relationships among three peanut stunt virus isolates determined by competition hybridization. **Arch. Virol.**, v. 75, p. 277-281, 1983.

DI FRANCO, A., MARTELLI, G.P., RUSSO, M. An ultrastructural study of olive ringspot virus in *Gomphrena globosa*. **J. Submicrosc. Cytol.**, v. 15, p. 539-548, 1983.

DING, B., LI, Q., NGUYEN, L., PALUKAITIS, P., LUCAS, W.J. Cucumber mosaic virus 3a protein potentiates cell-to-cell trafficking of CMV RNA in tobacco plants. **Virology**, v. 207, p. 345-353, 1995.

DING, S.-W., ANDERSON, B.J., HAASE, H.R., SYMONS, R.H. New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome. **Virology**, v. 198, p. 593-601, 1994.



- DOOLITTLE, S.P. A new infectious mosaic disease of cucumber. **Phytopathology**, v. 6, p. 145-147, 1916.
- DOUINE, L., QUIOT, J.B., MARCHOUX, G., ARCHANGE, P. Recensement des espèces végétales sensibles au virus de la mosaïque du concombre (CMV): Etude bibliographique. **Ann. Phytopathol.**, v. 11, p. 439-475, 1979.
- DUARTE, L.M.L., ALEXANDRE, M.A.V., RIVAS, E.B., OLIVEIRA, J.M. Infecção natural de *Catharantus roseus* (L) G. Don. por vírus. **5ª RAIB** - (Resumo nº 5). 1992.
- DUARTE, L.M.L., RIVAS, E.B., ALEXANDRE, M.A.V. & FERRARI, J.T. Detection of CMV isolates from commelinaceae species. **Fitopatol. bras.**, v. 19, p. 248-253, 1994.
- DUSI, A.N., ZAMBOLIM, E.M., GAMA, M.I.C.S., ÁVILA, A.C., GIORDANO, L.B., SANTOS, J.R.M. Ocorrência e caracterização do vírus do mosaico do pepino (CMV) em ervilha. **Fitopatol. bras.**, v. 17, p.286-291, 1992.
- EDWARDS, M.C., GONSALVES, D. Grouping of seven biologically defined isolates of cucumber mosaic virus by peptide mapping. **Phytopathology**, v. 73, p. 1117-1120, 1983.
- EDWARDSON, J.R., CHRISTIE, R.G. Light microscopy of inclusions induced by viruses infecting pepper. **Fitopatologia brasileira**, v. 4, p. 341-373, 1979.
- EHARA, Y. Complex membranous organelles in the cells of the local lesion area on cowpea leaves infected with cucumber mosaic virus. **Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.**, v. 45, p. 17-24, 1979.



- EHARA, Y., MISAWA, T. Studies on the infection of cucumber mosaic virus – Leaf growth and appearance of mosaic symptoms. **Shokubutsu Byogai Kenkyu**, v. 8, p. 245-260, 1973.
- EHARA, Y., MISAWA, T. Occurrence of abnormal chloroplasts in tobacco leaves infected systemically with the ordinary strain of cucumber mosaic virus. **Phytopathol. Z.**, v. 84, p. 233-252, 1975.
- EHARA, Y., MISAWA, T., NAGAYAMA, H. Arrangement of cucumber mosaic virus particles in the virus aggregates. **Phytopathol. Z.**, v. 87, p. 28-39, 1976.
- ESPINHA, L.M., GASPAR, J.O. Caracterização parcial do vírus do mosaico do pepino ("Cucumber Mosaic Virus", CMV) isolado de *Catharantus roseus*. **Fitopatologia brasileira**, v. 22, p. 209-212, 1997.
- ESPINHA, L.M., SCAGLIUSI, S.M.M., GASPAR, J.O. Infecção natural de *Catharantus roseus* (L) G. Don. (*Vinca rosea*) pelo vírus do mosaico do pepino. **Fitopatol. bras.**, v. 19, p. 307 (Resumo nº 245), 1994.
- FARRELL, R.E. JR. **RNA Methodologies**: A Laboratory guide for isolation and charaterization. Academic Press, Inc., 1993. 317 pp.
- FAVALI, M.A., CONTI, G.G. Ultrastructural observations on the cloroplasts of basil plants either infected with different viruses or treated with 3-amino-1,2,4-triazole. **Protoplasma**, v. 70, p. 153-166, 1970.
- FINCH, J.T., KLUG, A., van REGENMORTEL, M.H.V. The structure of Cucumber Mosaic Virus. **J. Mol. Biol.**, v. 24, p. 303-305, 1967.
- FRANCKI, R.I.B. Inactivation of cucumber mosaic virus (Q strain) nucleoprotein by pancreatic ribo-nuclease. **Virology**, v. 34, p.694-700, 1968.



- FRANCKI, R.I.B. Plant virus satellites. **Annu. Ver. Microbiol.**, v. 39, p. 151-174, 1985.
- FRANCKI, R. I. B., HATTA, T. Cucumber mosaic virus - variation and problems of identification. **Acta Horticulturae**, v. 110, p. 167-174, 1980.
- FRANCKI, R.I.B., MILNE, R.G., HATTA, T. **An atlas of plant virus**, Volume II, CRC Press, Boca Raton, Florida. 1985.
- FRANCKI, R.I.B., MOSSOP, D.W., HATTA, T. Cucumber Mosaic Virus. **Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologists. Description of Plant Viruses**, n. 213, p.1-6, 1979.
- FRANCKI, R.I.B., RANGLES, J.W., CHAMBERS, T.C., WILSON, S.B. Some properties of purified cucumber mosaic virus (Q strain). **Virology**, v. 28, p. 729-741, 1966.
- GALITELLI, D., VOVLAS, C., MARTELLI, G. P., MONTASSER, M. S., TOUSIGNANT, M. E.; KAPER, J. M. Satellite mediated protection of tomato against cucumber mosaic virus: II. Field test under natural epidemic conditions in Southern Italy. **Plant Disease**, v. 75, p. 93-95, 1991.
- GASPAR, J.O., BONILLA, G.O., BELENTANI, S.C., ESPINHA, L.M., SCAGLIUSI, S.M.M. Purificação de vírus de plantas através de filtração em gel sem ultracentrifugação. **Fitopatologia brasileira**, v. 20 (Suplemento), p. 326 (Resumo nº 296), 1995.
- GERA, A., LOEBENSTEIN, G., RACCAH, B. Protein coats of two strains of cucumber mosaic virus affect transmission by *Aphis gossypii*. **Phytopathology**, v. 69, p. 396-399, 1979.



- GEROLA, F.M., BASSI, M., BELLI, G. Some observations on the shape and localization of different viruses in experimentally infected plants, and on the fine structure of the host cells. II. *Nicotiana glutinosa* systemically infected with cucumber mosaic virus, strain Y. **Caryologia**, v. 18, p. 567-597, 1965.
- GONSALVES, D., PROVVIDENTI, R., EDWARDS, M. C. Tomato white leaf: The relation of na apparent satellite RNA and cucumber mosaic virus. **Phytopathology**, v. 72, p. 1533-1538, 1982.
- GOULD, A.R., SYMONS, R.H. Determination of sequence homology between the four RNA species of cucumber mosaic virus. **Nucleic Acids Research**, v. 4, p. 3787-3802, 1977.
- GOULD, A.R., SYMONS, R.H. Alfafa mosaic virus RNA. Determination of the sequence homology between the four RNA species and a comparison with the four RNAs species of cucumber mosaic virus. **European Journal Biochemistry**, v. 91, p. 269-278, 1978.
- GRACIA, O., FELDMAN, J.M. Isolation and identification of 2 celery viruses in Argentina. **Plant Dis. Rep.**, v. 61, p. 905-908, 1977.
- GRAVES, M.V., ROOSSINCK, M.J. Characterization of defective RNAs derived from RNA 3 of the Fny strain of Cucumber Mosaic Cucumovirus. **Journal of Virology**, v. 69, p. 4746-4751, 1995.
- HAASE, A., RICHTER, J., RABENSTEIN, F. Monoclonal antibodies for detection and serotyping of cucumber mosaic virus. **Journal of Phytopathology**, v. 127, p. 129-136, 1989.



- HABILI, N., FRANCKI, R. I. B. Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses. I. Physical and chemical properties. **Virology**, v. 57, p. 397-401, 1974.
- HABILI, N., KAPER, J.M. Cucumber mosaic virus-associated RNA 5. **Virology**, v. 112, p. 250-261, 1981.
- HABILI, N., SYMONS, R.H. Evolutionary relationships between luteoviruses and other RNA plant viruses based on sequence motifs in their putatives RNA polymerases and nucleic acid helicases. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 9543-9555, 1989.
- HANADA, K. Electrophoretic analysis of virus particles of fourteen cucumovirus isolates. **Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.**, v. 50, p. 361-367, 1984.
- HARRIS, J.R., HORNE, R.W. Negative staining. In: **Electron microscopy in biology**. A pratical approach. Oxford University Press, New York. 1991. 308p.
- HASELOFF, J., GOELET, P., ZIMMERN, D., ALHQUIST, P., DASGUPTA, R., KASEBERG, P. Striking similarities in amino acid sequence among non-structural proteins encoded by RNA viruses that have dissimilar genomic organization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, p. 4358-4362, 1984.
- HATTA, T., FRANCKI, R.I.B. Enzyme cytochemical method for identification of cucumber mosaic virus particles in infected cells. **Virology**, v. 93, p. 265-268, 1979.
- HATTA, T., FRANCKI, R.I.B. Cytopathic structures associated with tonoplasts of plant cells infected with cucumber mosaic and tomato aspermy viruses. **Journal of General Virology**, v. 53, p. 343-346, 1981.



- HAVRANEK, P. Use of quantitative immunoelectrophoresis in cucumber mosaic virus assay II. Strain and isolate specific modifications of the antigenic complex. **Phytopathologische Zeitschrift**, v. 93, p. 5-11, 1978.
- HAYAKAWA, T., MIZUKAMI, M., NAKAJIMA, M., SUZUKI, M. Complete nucleotide sequence of RNA 3 from cucumber mosaic virus (CMV) strain O: comparative study of nucleotide sequences and among strains O, Q, D and Y. **Journal General Virology**, v. 70, p. 499-504, 1989.
- HAYES, R. J., BUCK, K. W. Complete replication of a eukariotic virus RNA in vitro by a purified RNA-dependent RNA polymerase. **Cell**, v. 63, p. 363-368, 1990.
- HILLMAN, B.I., CARRINGTON, J.C., MORRIS, T.J. A defective interfering RNA that contains a mosaic of a plant virus genome. **Cell**, v. 51, p. 427-433, 1987.
- HILLS, G.J., PLASKITT, K.A., YOUNG, N.D., DUNIGAN, D.D., WATTS, J.W., WILSON, T.M.A., ZAITLIN, M. Immunogold localization of the intracellular sites of structural and nonstructural tobacco mosaic virus proteins. **Virology**, v. 161, p. 488-496, 1987.
- HODGMAN, T.C. A new superfamily of replicative proteins. **Nature, London**, v. 333, p. 22-23, 1988.
- HOLLAND, J.J. **Defective viral genomes**. In *Virology*, 2nd edn., vol1. Edited by B.N. Fields & D.M. Knipe. New York: Raven Press. 1990. p. 151-165.
- HOLLINGS, M., STONE, O.M. Tomato Aspermy Virus. **Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologists. Descriptions of Plant Viruses**, v. 79, 4 pp, 1971.



- HONDA, Y., MATSUI, C. Electron microscopy of intracellular modifications of tobacco by mixed infections with cucumber mosaic and tobacco mosaic viruses. **Phytopathology**, v. 58, p. 1230-1235, 1968.
- HONDA, Y., MATSUI, C. Electron microscopy of cucumber mosaic virus infected tobacco leaves showing mosaic symptoms. **Phytopathology**, v. 64, p. 534-539, 1974.
- HONDA, Y., MATSUI, C., OTSUKI, Y., TAKEBE, I. Ultrastructure of tobacco mesophyll protoplast inoculated with cucumber mosaic virus. **Phytopathology**, v. 64, p. 30-34, 1974.
- JACROT, B., CHAUVIN, C., WITZ, J. Comparative neutron small angle scattering study of small spherical RNA viruses. **Nature**, v. 266, p. 417-421, 1977.
- JAGGER, I.C. Experiments with the cucumber mosaic disease. **Phytopathology**, v. 6, p. 148-151, 1916.
- KAHN, R.P., SCOTT, H.A. Serological relationship of cucumber mosaic virus and certain virus isolates that incite Amaryllis mosaic symptoms. **Phytopathology**, v. 53, p. 360-362, 1964.
- KAPER, J.M. Some observations on the chemistry and molecular organization of cucumber mosaic virus. **Meded. Fac. Landbouw. Rijks. Univ. Gent.**, v. 40, p. 1-13, 1975.
- KAPER, J.M., GEELLEN, J.L.M.C. Studies on the stabilizing forces of simple RNA viruses. II. Stability, dissociation, and reassembly of cucumber mosaic virus. **Journal of Molecular Biology**, v. 56, p. 277-294, 1971.



- KAPER, J.M., RE, G.C. Redetermination of the RNA content and the limiting RNA size of the three strains of cucumber mosaic virus. **Virology**, v. 60, p. 308-311, 1974.
- KAPER, J. M., WATERWORTH, H. E. Cucumber mosaic virus associated RNA 5. Causal agent for tomato necrosis. **Science**, v. 196, p. 429-431, 1977.
- KAPER, J. M., WATERWORTH, H. E. Cucumovirus. **Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis**. Amsterdam: Elsevier, North Holland Biomedical Press. 1981. p. 257-332.
- KAPER, J. M., DURIAT, A. S., TOUSIGNANT, M. E. The 368-nucleotide satellite of cucumber mosaic virus strain y from Japan does not cause lethal necrosis in tomato. **J. Gen. Virol.**, v. 67, p. 2241-2246, 1986.
- KAPER, J.M., TOUSIGNANT, M.E., LOT, H. A low molecular weight replicating RNA associated with a divided genome plant virus: defective or satellite RNA? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 72, p. 1237-1243, 1976.
- KARNOVISKY, M.J. A formaldehydegutaraldehyde fixative for high osmolarity for use in electron microscopy. **J. Cell. Biol.**, v. 27, p. 137-138, 1965.
- KARNOVISKY, M.J. The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. **J. Cell. Biol.**, v. 35, p. 213-236, 1967.
- KENNEDY, J.S., DAY, M.F., EASTOP, V.F. **A Conspectus of Aphids as Vectors of Plant Viruses**. Commonwealth Institute of Entomology, London. 1962.



- KITAJIMA, E.W., CUPERTINO, F.P., LIN, M.T., ALBUQUERQUE, F.C., HIRAKATA, R. Dados preliminares de um levantamento de viroses de plantas cultivadas na região de Tomé-Açu e Belém, PA. **Fitopatologia brasileira**, v. 5, p. 407, 1980.
- KRAEV, V.G., SEMERNIKOVA, L.I., VUTENKO, S.I., PAREMBSKAYA, N.V. Certain structural changes induced by peanut stunt virus in cells of host plants. **Mikrobiol. Zh. (Kiev)**, v. 37, p. 261-264, 1975.
- KUDAMATSU, M., ALBA, A.P.C., CHAGAS, C.M. Infecção natural de *Salvia splendens* L. (Salvia) pelo vírus do mosaico do pepino (CMV) em São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 7, p. 3-4, 1981.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** (London), v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAWSON, R.H., HEARON, S. Subcellular localization of chrysanthemum aspermy virus in tobacco and chrysanthemum leaf tissue. **Virology**, v. 41, p. 30-37, 1970.
- LI, X., HEATON, L.A., MORRIS, T.J., SIMON, A.E. Turnip crinkle virus defective interfering RNAs intensify viral symptoms and are generated *de novo*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 86, p. 9173-9177, 1989.
- LIMA NETO, V.C., LIMA, M.L.R.Z.C., SOUZA, V.B.V., HAMMERSCHMIDT, I. Levantamento preliminar de viroses de olerícolas na região metropolitana de Curitiba. **Resumos do XXIII Congresso Brasileiro de Olericultura**, 72pp., 1983.
- LIMA, J.A.A., SANTOS, C.D.G. Infecção natural de *Phaseolus lunatus* por uma estirpe de "Cucumber Mosaic Virus" no Ceará. **Fitopatologia brasileira**, v. 10, p. 304, 1985.



- LIMA, M.L.R.Z.C., LIMA NETO, V.C., SOUZA, V.B.V., HAMMERSCHMIDT, I., GLOOR, S. Incidência de viroses em plantações de olerícolas na região metropolitana de Curitiba, PR. **Fitopatologia Brasileira**, v. 9, p. 403, 1984.
- LIN, M.T. Viroses do caupi no Brasil. **Apostila do I Curso de Produção de Caupi**. EMBRAPA/CNPAP/IITA, Goiânia, GO. 20pp, 1982.
- LIN, M.T., NEMOTO, M., KITAJIMA, E.W. Infecção de melão e maxixe por vírus do mosaico da melancia-I e vírus do mosaico do pepino em Presidente Wenceslau, SP. **Resumos do XX Congresso Brasileiro de Oleicultura Brasileira**, 144pp., 1980.
- LIN, M.T., SANTOS, A.A., KITAJIMA, E.W. Host reactions and transmission of two seed-borne cowpea viruses from Central Brazil. **Fitopatologia brasileira**, v. 6, p. 193-203, 1981.
- LIN, M.T., SANTOS, A.A., MUÑOZ, J.O. Ocorrência do vírus do mosaico do pepino em caupi no Estado do Piauí. **Resumo da 1ª Reunião Nacional de Pesquisa de Caupi, Goiânia, GO**. p. 101, 1982.
- LIN, N.S., HSIEH, C.E., HSU, Y.H. Capsid protein of cucumber mosaic virus accumulates in the nuclei and at the periphery of the nucleoli in infected cells. **Arch. Virol.**, v. 141, p. 727-732, 1996.
- LOT, H., KAPER, J.M. Physical and chemical differentiation of three strains of cucumber mosaic virus and peanut stunt virus. **Virology** v. 74, p. 209-222, 1976.



LOT, H., MARROU, J., QUIOT, J. B., ESVAN, C. Contribution a l'etude du virus de la Mosaic du Concombre (CMV). I. Méthode de purification rapide du virus. **Ann. Phytopathol.**, v. 4, p. 25-38, 1972.

LOT, H., MARCHOUX, G., MARROU, J., KAPER, J.M., WEST, C.K., VAN VLOTEN-DOTING, L., HULL, R. Evidence for three functional RNA species in several strains of cucumber mosaic virus. **J. Gen. Virology**, v. 22, p. 81-93, 1974.

LYONS, H.R., ALLEN, T.C. Electron microscopy of viruslike particles associated with necrotic fleck of *Lilium longiflorum*. **J. Ultrastruct. Res.**, v. 27, p. 198-204, 1969.

MACIEL-ZAMBOLIM, E., CARVALHO, M.G., MATSUOKA, K. Caracterização parcial do vírus do mosaico do pepino isolado de pimenta-do-reino (*Piper nigrum*). **Fitopatol. bras.**, v. 15, p. 220-225, 1990.

MACIEL-ZAMBOLIM, E., CARVALHO, M.G., VENTURA, J.A. Infecção natural da pimenta-do-reino pelo vírus do mosaico do pepino no Estado do Espírito Santo. **Fitopatol. bras.**, v. 12, p. 158, 1981.

MARCHOUX, G., QUIOT, J.B., DEVERGNE, J.C. Caracterization d'un isolat du virus de la mosaïque de cocombre transmis par les graines du haricot (*Phaseolus vulgaris* L.). **Annales de Phytopathologie**, v. 9, p. 421-434, 1977.

MARROU, J., DUTEIL, M. La nécrose de la tomate. I. Reproduction des symptomes de la maladie par inoculation mecanique de plusieurs souches du virus de la mosaïque du concombre (CMV). **Ann. Phytopathol.**, v. 6, p.155-171, 1974.

MARTELLI, G.P. Ultrastructural aspects of possible defence reactions in virus-infected plant cells. **Microbiologica**, v. 3, p. 369-391, 1980.



MARTELLI, G.P. Classification and nomenclature of plant viruses: state of art. **Plant Disease**, v. 76, p. 436-442, 1992.

MARTELLI, G.P., RUSSO, M. The use of thin sectioning for visualization and identification of plant viruses, in: **Methods in Virology**, volume 8 (K. Maramorosch and H. Koprowski, eds), Academic Press, New York, 1985.

MATSUI, C., YAMAGUCHI, A. Some aspects of plant viruses *in situ*. **Adv. Virus Res.**, v. 12, p. 127-174, 1966.

MATTHEWS, R.E.F. **Plant Virology**. 3 Ed. Academic Press, Inc., 1991. 835pp.

McKINNEY, H.H. Virus diseases of cereal crops. In: **Yearbook of Agriculture**. Department of Agriculture, Washington, D.C., 1953. p. 350-360.

MEDEIROS, A.G. Nota sobre a ocorrência de mosaico em bananeira no Estado de Pernambuco. **Boletim Técnico Instituto de Pesquisa Agropecuária (Recife)**, v. 4, p. 1-13, 1963.

MILLONIG, G. A modified procedure for lead staining of thin sections. **J. Biophysic and Biochem. Cytol.**, v. 11, p. 736, 1961.

MINK, G.I. Peanut Stunt Virus. **Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologists. Descriptions of Plant Viruses**, v. 92, 4 pp, 1972.

MISAWA, T., EHARA, Y. Electron microscopic observation of host cells infected with cucumber mosaic virus. **Tohoku J. Agric. Res.**, v. 16, p. 159-173, 1966.



- MONTASSER, M. S., TOUSIGNANT, M. E., KAPER, J. M. Satellite-mediated protection of tomato against cucumber mosaic virus. I. Geenhouse experiments and simulated epidemic conditions in the field. **Plant Disease**, v. 75, p. 86-92, 1991.
- MORRIS, T. J., DODDS, J. A. Isolation and analysis of double stranded RNA. **Phytopathology**, v. 69, p. 854-858, 1979.
- MOSSOP, D. W., FRANCKI, R. I. B. Survival of a satellite RNA *in vivo* and its dependence on cucumber mosaic virus for replication. **Virology**, v. 86, p. 562-566, 1978.
- MOSSOP, D.W., FRANCKI, R.I.B. Comparative studies on two satellite RNAs of cucumber mosaic virus. **Virology**, v. 95,p. 395-404, 1979.
- NEERGAARD, P. **Seed Pathology**. John Wiley & Sons, New York. 1977. 1187 pp.
- NITTA, N., TAKANAMI, Y., KUWATA, S., KUBO, S. Inoculation with RNAs 1 and 2 of cucumber mosaic virus induces viral RNA replicase activity in tobacco mesophyll protoplasts. **Virology**, v. 69, p. 2695-2700, 1988.
- NÓBREGA, N.R. Uma doença de vírus em Orquídea. **O Biológico**, v. 13, p. 62, 1947.
- OWEN, J., PALUKAITIS, P. Characterization of cucumber mosaic virus. I. Molecular heterogeneity mapping of RNA 3 in eight CMV strains. **Virology**, v. 166, p. 495-502, 1988.
- OWEN, J., SHINTAKU, M., AESCHLEMAN, P., TAHAR, S.B., PALUKAITIS, P. Nucleotide sequence and evolutionary relationships of cucumber mosaic virus



(CMV) strains: CMV RNA 3. **Journal General Virology**, v. 71, p. 2243-2249, 1990.

PALUKAITIS, P., ROOSSINCK, M.J., DIETZGEN, R.G., FRANCKI, R.I.B. Cucumber mosaic virus. **Adv. Virus Res.**, v. 41, p. 281-348, 1992.

PARES, R.D., GILLINGS, M.R., GUNN, L.V. Differentiation of biologically distinct Cucumber Mosaic Virus isolates by PAGE of double-stranded RNA. **Intervirology**, v. 34, p. 23-29, 1992.

PEDEN, K.W.C., SYMONS, R.H. Cucumber mosaic virus contains a functionally divided genome. **Virology**, v. 53, p. 487-492, 1973.

PHATAK, H.C. Seed-borne plant viruses-identification and diagnosis in seed health testing. **Seed Sci. Technol.**, v. 2, p. 3-155, 1974.

PIAZZOLA, P., DIAZ-RUIZ, J.R., KAPER, J.M. Nucleic acid homologies of eighteen cucumber mosaic virus isolates determined by competition hybridization. **Journal of General Virology**, v. 45, p. 361-369, 1979.

PROVIDENTI, R. Reaction of *Phaseolus* and *Macroptilium* species to a strain of cucumber mosaic virus. **Plant Dis. Rep.**, v. 60, p. 289-293, 1976.

QUADT, R., JASPARS, E.M.J. Purification and characterization of brome mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase. **Virology**, v. 178, p. 189-194, 1990.

QUADT, R., VERBEEK, H.J.M., JASPARS, E.M.J. Involvement of a nonstructural protein in the RNA synthesis of Brome Mosaic Virus. **Virology**, v. 165, p. 256-261, 1988.

QUEMADA, H., KEARNEY, C., GONSALVES, D., SLIGHTOM, J.L. Nucleotide sequences of the coat protein genes and flanking regions of cucumber mosaic virus strain C and WL RNA 3. **Journal General Virology**, v. 70, p. 1065-1073, 1989.

REZAIAN, M.A., WILLIAMS, R.H.V., GORDON, K.H.J., GOULD, A.R., SYMONS, R.H. Nucleotide sequence of cucumber mosaic virus RNA 2 reveals a translation product significantly homologous to corresponding proteins of other viruses. **Eur. J. Biochem.**, v. 143, p. 277-284, 1984.

REZAIAN, M.A., WILLIAMS, R.H.V., SYMONS, R.H. Nucleotide sequence of cucumber mosaic virus RNA 1: Presence of a sequence complementary to part of the viral satellite RNA and homologies with other viral RNAs. **Eur. J. Biochem.**, v. 150, p. 331-339, 1985.

RIBEIRO, M.I.S.D., RIBEIRO, R.L.D., MAIOLINO, W., ROBBS, C.F. Nota sobre a ocorrência de uma forma severa de "Mosaico" em bananais do Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v. 06/07/08, p. 26-28, 1975.

RIZOS, H., GUNN, L.V., PARES, R.D., GILLINGS, M.R. Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reaction. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 2099-2103, 1992.

RIZZINI, C.T., MORS, W.B. **Botânica Econômica Brasileira**. São Paulo, EPU: Ed. Universidade de São Paulo. 1976. 207pp.

RIZZO, T.M., PALUKAITIS, P. Nucleotide sequence and evolutionary relationships of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA 1. **Journal General Virology**, v. 70, p. 1-11, 1989.



- RIZZO, T.M., PALUKAITIS, P. Construction of full-length cDNA clones of cucumber mosaic virus RNAs 1, 2 and 3 : Generation of infectious RNA transcripts. **Mol. Gen. Genet.**, v. 222, p. 249-256, 1990.
- ROBBS, C.F. Aspectos Sanitários da cultura da bananeira no Estado da Guanabara. **Agronomia**, v. 22, p. 127-130, 1964.
- ROBERTS, P.L., WOOD, K.R. Comparison of protein synthesis in tobacco systemically infected with a severe or a mild strain of cucumber mosaic virus. **Phytopathol. Z.**, v. 102, p. 257-265, 1981.
- RODRIGUES, M.C.R., KITAJIMA, E.W., LIN, M.T. Manchas anulares em almandra associadas à infecção pelo vírus do mosaico do pepino. **Fitopatologia brasileira**, v. 9, p. 151-154, 1984.
- ROMERO, J., HUANG, Q., POGANY, J., BUJARRSKI, J.J. Characterization of defective interfering RNA components that increase symptom severity of broad bean mottle virus infections. **Virology**, v. 194, p. 576-584, 1993.
- RUSSO, M., MARTELLI, G.P. The fine structure of *Nicotiana glutinosa* L. cells infected with two viruses. **Phytopathol. Mediterr.**, v. 12, p. 54-60, 1973.
- RUSSO, M., CASTELLANO, M.A., MARTELLI, G.P. The ultrastructure of broad bean stain and broad bean true mosaic virus infections. **J. Submicrosc. Cytol.**, v. 14, p. 149-160, 1982.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 3v.



- SAVITHRI, H.S., DEVARAJAN, S., MURTHY, M.R.N. Stability and structural transitions of tomato aspermy virus and cucumber mosaic virus. **Virology**, v. 134, p. 398-405, 1984.
- SCHWINGHAMER, M.W., SYMONS, R.H. Translation of the four major RNA species of cucumber mosaic virus in plant and animal cell-free systems and in toad oocytes. **Virology**, v. 79, p. 88-108, 1977.
- SCOTT, H. Purification of cucumber mosaic virus. **Virology**, v. 20, p. 103-106, 1963.
- SILBERSCHMIDT, K. *Asclepias curassavica*, a natural host of cucumber mosaic virus in Brazil. **Plant Disease Reporter**, v. 39, p. 555-557, 1955.
- SILBERSCHMIDT, K. Feijoeiro com doença de vírus. **O Biológico**, v. 29, p.117, 1963.
- SILBERSCHIMDT, K., FLORES, E. A interação do vírus causador da "Clorose Infecciosa" das malváceas com o vírus X da batatinha, o vírus do mosaico do fumo ou o vírus do mosaico do pepino em tomateiro. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 34, p. 125-149, 1962.
- SILBERSCHMIDT, K., NÓBREGA, N.R. Sobre uma doença de vírus da bananeira. **O Biológico**, v. 7, p. 216-219, 1941.
- SILBY, A.D. Report of committee on vegetable pathology. A peculiar malady of forced cucumbers. **Annual Report Ohio State Horticultural Society**, v. 1902, p. 109, 1903.



- SINGH, Z., JONES, R.A.C., JONES, M.G.K. Identification of cucumber mosaic virus subgroup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR. **Plant Disease**, v. 79, p. 713-716, 1995.
- SMITH, D.B., DAVIS, R.F. Identification of cucumber mosaic virus from *Vinca minor* in New Jersey. **Plant Disease**, v. 70, p. 1056-1059, 1986.
- SPURR, A.R. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **J. Ultr. Res.**, v. 26, p. 31-43, 1969.
- TAKANAMI, Y., TOMARU, K. Effect of EDTA on cucumber mosaic virus and its application in purification. **Virology**, v. 37, p. 293-295, 1969.
- TAMAKI, H., YAMASHINA, S. Improved method for post-embedding cytochemistry using reduced osmium and LR White resin. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 42, p. 1285-1293, 1994.
- TIEN, P., ZHANG, X., QUI, B., WU, G. Satellite RNA for the control of plant diseases caused by cucumber mosaic virus. **Ann. Appl. Biol.**, v. 11, p. 143-152, 1987.
- TOBIAS, I., MAAT, D.Z., HUTTINGA, H. Two hungarian isolates of cucumber mosaic virus from sweet pepper (*Capsicum annum*) and melon (*Cucumis melo*): identification and antiserum preparation. **Netherlands Journal Plant Pathology**, v. 88, p. 171-183, 1982.
- TOLIN, S.A. Cucumovirus (cucumber mosaic virus) group. In **The atlas of Insects and Plant Viruses, Including Mycoplasma Viruses and Viroids**. New York: Academic Press. 1977. p. 303-309.



- TOMLINSON, J.A., CARTER, A.L., FAITHFULL, E.M., WEBB, M.J.W. Purification and serology of the W strain of cucumber mosaic virus. **Ann. Applied Biol.**, v. 74, p. 181-189, 1973.
- TOWBIN, H., GORDON, J. Immunoblotting and dot immuno-binding currents status and outlook. **Journal Immunology Methods**, v. 72, p. 313-340, 1984.
- van REGENMORTEL, M.H.V., HENDRY, D.A., BALTZ, T. A reexamination of the molecular size of cucumber mosaic virus and its coat protein. **Virology**, v. 49, p. 647-653, 1972.
- van PELT-HEERSCHAP, H., VERBEEK, H., HUISMAN, M. J., LOESCH-FREIS, L.S., VAN VLOTEN-DOTING, L. Non-structural proteins and RNAs of alfafa mosaic virus synthesized in tobacco and cowpea protoplasts. **Virology**, v. 161, p. 190-197, 1987.
- WATERWORTH, H.E., TOUSIGNANT, M.E., KAPER, J.M. A lethal disease of tomato experimentally induced by RNA-5 associated with cucumber mosaic isolated from *Commelina* from El Salvador. **Phytopathology**, v. 68, p. 561-566, 1978.
- WELLMAN, F.L. The host of Southern celery-mosaic virus. **Phytopathology**, v. 25, p.377-404, 1935.
- WHITE, K.A., BANCROFT, J.B., MACKIE, G.A. Defective RNAs of clover yellow mosaic virus encode nonstructural/coat protein fusion products. **Virology**, v. 183, p. 479-486, 1991.
- WYLIE, S., WILSON, C.R., JONES, R.A.C., JONES, M.G.K. A polymerase chain reaction assay for cucumber mosaic virus in lupin seeds. **Aust. J. Agric. Res.**, v. 44, p. 41-51, 1993.



ZAMBOLIM, E.M., ASSIS, M.I.T., ZAMBOLIM, L., VENTURIA, J.A., CARVALHO, M.G. Infecção natural da bananeira cultivar "Prata" (AAB) pelo vírus do mosaico do pepino no estado de Minas Gerais. **Fitopatol. bras.**,v. 19(3), p.483-484, 1994.



