

Priscila Belintani

**Vírus Latente da Couve: Propriedades da
Proteína Capsidial e Imunolocalização
em Tecidos Infectados**



1910000708



PRISCILA BELINTANI

**VÍRUS LATENTE DA COUVE: PROPRIEDADES DA PROTEÍNA
CAPSIDIAL E IMUNOLocalização EM TECIDOS INFECTADOS.**

Dissertação apresentada para a 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.

Orientador: Prof. Dr. José Osmar Gaspar



708/96

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

1995



Aos meus amigos para Maria Helena e
Aymor, que deram muito de si para minha formação pessoal e

Este trabalho foi realizado no 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 da CAPES.

Ao meu querido filho Bruno, motivação
do meu trabalho e da minha vida, cujo sorriso sempre
foi minha maior fonte de energia e de alegria

Dedico este trabalho

Aos meus amados pais, Maria Helena e Aymar, que deram muito de si para minha formação pessoal e profissional, e que me ampararam, principalmente nesta fase final do meu trabalho, me incentivando e apoiando com todo carinho e dedicação.

Ao meu querido filho, Bruno, motivação do meu trabalho e da minha vida, cujo sorriso sempre foi minha maior fonte de energia e de alegria.

AGRADECIMENTOS

É uma oportunidade muito agradável agradecer a todas as pessoas que durante o desenvolvimento deste trabalho, participaram dos meus esforços de diferentes maneiras, prestando-me colaboração não apenas durante a execução de tarefas, como também durante dificuldades e crises.

Agradeço especialmente a meu orientador, Prof. Dr. José Osmar Gaspar, pela sua valiosa e inabalável atenção e incentivo constantes, sua dedicada orientação, confiança, seu exemplo de profissionalismo e, principalmente, valiosa amizade.

Aos Professores Doutores Carlos Roberto Cerón e Jorge Alberto Marques, pelas acuradas análises de pré-forma, e valiosas sugestões que aprimoraram este texto.

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

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação, Prof. Dr. Vladimir João Tadei, pela compreensão, compreensão e atenção nos problemas burocráticos.

A todos professores do Curso de Pós-Graduação, pelos preciosos ensinamentos durante o desenvolvimento de todo este Curso de Mestrado, onde pude adquirir muita experiência e aprendizagem de todos.

A Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da Universidade de São Paulo (UNESP), pela fornecimento dos recursos materiais.

A Coordenação do Curso de Virologia do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e a Coordenação do Centro de Estudos Moleculares e Evolutivos da Universidade de Campinas (UNICAMP).

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Osmar Gaspar, além de orientador, mestre e amigo, que muito me ensinou durante o curso de pós-graduação, sempre atento e disposto a novas investigações, demonstrando verdadeira dedicação ao trabalho científico.

Aos professores doutores Carlos Roberto Cerón, Aviana Rodrigues de Oliveira (UNICAMP), e Jorge Alberto Marques (UNESP), pelas análises de pré-forma e valiosas sugestões que aprimoraram este texto.

A CAPES pela concessão da Bolsa de Mestrado.

Aos colegas e professores dos Departamentos de Botânica, Biologia, Química, Física e Engenharia de Alimentos, pela facilidade de acesso e troca de informações e materiais, principalmente aos professores Elenice de Cassia Conforti, Neusa Tereza de Aguiar, Antônio Roberto Taboga, Lucio Mota, Roberto da Silva, Ieda Aparecida Pádua, Wellington, Gustavo Orlando R. Botana e Marimmo Lopes Cordeiro.

AGRADECIMENTOS

Nesta oportunidade, venho agradecer à todas as pessoas que, durante o desenvolvimento deste trabalho, participaram dos meus esforços de diferentes maneiras prestando sua colaboração, não apenas diretamente na execução do mesmo, como também dividindo dificuldades e resoluções.

Agradeço especialmente a meu orientador, Prof. Dr. José Osmar Gaspar, pelo seu entusiasmo incansável, atenção e incentivo constantes, sua dedicada orientação, confiança, seu exemplo de profissionalismo, e principalmente, valiosa amizade.

Aos Professores Doutores Carlos Roberto Ceron e Jorge Alberto Marques Rezende, pelas acuradas análises da pró-forma, e valiosas sugestões que aprimoraram esta tese.

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

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação, Prof. Dr. Wlademir João Tadei, pela colaboração inestimável e atenção nos problemas burocráticos.

A todos professores do Curso de Pós-Graduação, pelos preciosos ensinamentos durante o desenvolvimento de todo este Curso de Mestrado, onde pude contar com a colaboração e atenção de todos.

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

A Chefia da Seção de Virologia do Instituto Agrônomo de Campinas, IAC e à Coordenação do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da Universidade de Campinas, UNICAMP, pelo acesso a equipamentos.

A bióloga Sandra M. M. Scagliusi pela realização das observações e das fotografias de microscopia eletrônica.

Ao Dr. José Alberto Caran de Souza Dias, pela doação de folhas de batata infectadas pelo vírus do enrolamento da folha da batata (VEFB).

Aos Doutores, M. Iwaki (Japão), Avelino Rodrigues de Oliveira (UNICAMP), Allan A. Brunt (Inglaterra), pela doação dos antissoros utilizados neste trabalho.

A CAPES, pela concessão da Bolsa de Mestrado.

As chefias e professores dos Departamentos de Botânica, Biologia, Química, Física e Engenharia de Alimentos, pela facilidade de acesso e uso de equipamentos e material, principalmente aos professores Elenice de Cássia Conforto, Neusa Taroda Ranga, Sebastião Roberto Taboga, Laerte Miola, Roberto da Silva, Ieda Aparecida Pastre Sertonani, Gustavo Orlando R. Bonilla e Marinônio Lopes Cornélio.

A todos funcionários e técnicos dos Departamentos de Botânica, Biologia, Química, Física, Engenharia de Alimentos, Biblioteca, Polo Computacional e Seção de Pós-Graduação, principalmente à Maria Helena Carabolante de Sá, Vilma Therezinha de Souza Strengari, Ademir de Oliveira Veschi, Izabelino Fávoro, Bernadete Daineze Trevisan, Josué Rodrigues dos Santos, João Rodrigues dos Santos, Jorge Freytag Buchid, Paulo Roberto Salinas, Antonio Aparecido Barbosa, Tania Maria Venturin, Olinda Vacari T. Luchesi, Maria do

Carmo Junqueira, Gislaine de Lourdes Gameiro, Tarlei Lodi, Sandra Regina R. Martins, José Antonio Queiroz, Nanci Queiroz de A. Pereira e Onilda Naves de O. Akasaki, pela simpatia, atenção, e auxílio nas diversas "pequenas coisas" fundamentais que engrandecem todo trabalho.

A todos os colegas do Curso de Pós-Graduação, pelo incentivo constante, amizade e auxílio, especialmente à Raquel Keli Bortoleto, pela ajuda desinteressada.

As colegas Lilian Castiglioni Ruiz e Andréa Regina B. Rossit, que me proporcionaram sua amizade mesmo antes de me conhecerem, incentivando-me no ingresso ao curso de Pós-Graduação.

As colegas Silviamar Aguiar Ishida e Gisela Aparecida R. Queiroz, pela amizade, companheirismo e incentivo.

Aos colegas de trabalho no Laboratório de Fitovirologia, Luciana Marcia Espinha, Sonia Cristina S. Belentani, Andréia Estela Moreira, Juliana Martha de Sá, Isabel Cristina de Souza, Luciamara Lopes e Edis Moacir Brancalião, pelo apoio, incentivo, e convivência agradável.

Aos colegas de Departamento e de "corredor", Valéria Stranghetti, Paulo Guimarães e Andréa Rezende.

A Joseli Maria. P. Brighetti, pela amizade e incentivo.

Ao Aroldo, grande responsável pelo meu ingresso no Curso de Pós-Graduação.

A Rute e Ailton pelo apoio e carinho recebido em todas ocasiões.

A Maria José, que me ajudou e participou dos últimos acontecimentos da minha vida.

Ao Bruno, pelo carinho, incentivo e apoio neste momento tão importante.

A toda minha família, por tudo que representa para mim.

A minha "caríssima sorella" Giovana, a quem tanto amo, por seu companheirismo, pelo seu apoio, incentivo, exemplo de alegria e força.

Ao meu filho querido, Bruno, alegria dos meus dias, motivação da minha vida e do meu trabalho, batida do meu coração.

Aos meus pais, Aymar e Maria Helena, que como todos os pais, nem sempre podem nos dirigir os passos mas sempre nos amparam nas quedas, pela sua presença constante, amor e dedicação.

A todos que fizeram parte da minha vida nos últimos anos, me proporcionando amizades, alegrias, aprendizado, e lucidez.

1. Introdução	01
---------------	----

2. Revisão de literatura	02
--------------------------	----

A DEUS..

A Grupo de vírus latente do cravo ("Carlavirus group")	02
--	----

A.1 Patologia	02
---------------	----

A.2 Morfologia e propriedades físico-químicas	03
---	----

...por todas coincidências, casualidades pouco prováveis que ocorreram durante minha vida e a conduziram até o momento quando finalizo esta lese.

A.3 Estrutura genômica	06
------------------------	----

B Vírus latente do cravo	12
3. Material e métodos	12
3.1 Purificação	12

...pelos espinhos, que me permitiram *quase* aprender que a dor também é amiga e ensina, por si mesma, a curar e cicatrizar feridas.

3.2 Espectroscopia	13
--------------------	----

...pelos ombros amigos que me proporcionaram aprender que há um momento de estender a mão, de aceitar ajuda, de reconhecer nossas fraquezas e que todos necessitamos uns dos outros, e de não poupar aos outros os nossos sofrimentos, mas também compartilhá-los, assim como as alegrias (afinal, amigo é para essas coisas).

3.3.1 Fracionamento	16
---------------------	----

3.3.2 Separação dos gêis	17
--------------------------	----

... pelas flores, que me proporcionaram *quase* aprender que também há tempo para apreciar a beleza e se dar momentos de pura contemplação.

3.7.1 Pre-adsorção	18
--------------------	----

... *quase* porque a vida é um eterno e constante aprendizado, que sempre nos surpreende com algo novo, inesperado, e é um desafio que vale a pena enfrentar.

3.7.3 "Dot blotting"	19
----------------------	----

3.7.4 Imunolocalização da proteína capsidial	19
--	----

ÍNDICE

1. Introdução.....	01
2. Revisão de literatura.....	02
A. Grupo do vírus latente do cravo ("Carlavirus group").....	02
A.1 Patologia.....	02
A.2 Morfologia e propriedades físico-químicas.....	03
A.3 Ultraestrutura dos tecidos infectados.....	04
A.4 Serologia.....	05
A.5 Estrutura genômica.....	06
B. Vírus latente da couve.....	10
3. Material e métodos.....	12
3.1 Purificação.....	12
3.2 Espectrofotometria.....	13
3.3 Microscopia eletrônica do vírus purificado.....	13
3.4 Teste biológico para o vírus purificado.....	15
3.5 Eletroforese.....	15
3.5.1 Preparo dos géis.....	15
3.5.2 Procedimento.....	16
3.5.3 Secagem dos géis.....	17
3.6 Determinação da massa molecular da proteína capsidial.....	17
3.7 Testes serológicos.....	18
3.7.1 Pré-adsorção.....	18
3.7.2 "Western blotting".....	18
3.7.3 "Dot blotting".....	19
3.7.4 Imunolocalização da proteína capsidial.....	19



3.8 Impressão de tecidos.....	20
4. Resultados.....	21
4.1 Purificação.....	21
4.2 Espectro de absorção do VLC.....	21
4.3 Teste biológico.....	21
4.4 Eletroforese e determinação da massa molecular da proteína capsial.....	22
4.5 Relações serológicas.....	23
4.6 Imunolocalização da proteína capsial em tecidos infectados.....	23
5. Discussão.....	39
6. Conclusões.....	45
7. Resumo.....	46
8. Summary.....	48
9. Literatura citada.....	49

PVSA: Potato S virus Andean strain (Virus S da batata - carlino andina)

PVX: Potato X virus (Virus X da batata - Potexvirus)

RCVMV: Red clover vein mosaic virus

SNMV: Solanum nodiflorum mottle virus (Sobemovirus)

VEPB: Virus do enrolamento da folha da batata (Eutovirus)

VLC: Virus latente da couve.

YMAF: Virus do mosaico angular do feijoeiro

VMCT: Virus do mosaico da couve-flor (Caulimovirus)

VMN: Virus do mosaico do nabo (Tymovirus?)

VTMoV: Velva tobacco mottle virus (Sobemovirus)

Obs: Quando não especificado, o vírus é pertencente ao grupo dos carlavirus.

ABREVIATURAS UTILIZADAS PARA OS FITOVIRUS DO TEXTO

AHLV: American hop latent virus

BBScV: Blueberry scorch virus

CLV: Carnation latent virus

CMMV: Cowpea mild mottle virus

CVB: Chrysanthemum B virus

CV2: Cactus virus 2

GV1: Garlic virus 1

HpMV: Hop mosaic virus

HclVS: Helenium S virus

LSV: Lily symptomless virus

PeSV: Pea streak virus

PLV: Passiflora latent virus

PopMV: Poplar mosaic virus

PVM: Potato M virus

PVS: Potato S virus

PVS^O: Potato S virus ordinary strain (Vírus S da batata - estirpe comum)

PVS^A: Potato S virus Andean strain (Vírus S da batata - estirpe andina)

PVX: Potato X virus (Vírus X da batata- Potexvirus)

RCVMV: Red clover vein mosaic virus

SNMV: Solanum nodiflorum mottle virus (Sobemovirus)

VEFB: Vírus do enrolamento da folha da batata (Luteovirus)

VLC: Vírus latente da couve

VMAF: Vírus do mosaico angular do feijoeiro

VMCF: Vírus do mosaico da couve-flor (Caulimovirus)

VMN: Vírus do mosaico do nabo (Tymovirus?)

VTMoV: Velvet tobacco mottle virus (Sobemovirus)

Obs: Quando não especificado, o vírus é pertencente ao grupo dos carlavirus.



1. INTRODUÇÃO

A couve (*Brassica oleracea* L. var *acephala*) e outras crucíferas são hospedeiras de vários vírus que vêm sendo detectados no Brasil nos últimos 30 anos.

KITAJIMA *et al.* (1965) verificaram, no Estado de São Paulo, a incidência de um vírus esférico provocando faixa amarela das nervuras em couve, provavelmente, o vírus do mosaico da couve flor (VMCF) (Caulimovirus).

Em 1979, KITAJIMA & COSTA observaram em uma espécie de rabanete selvagem (*Raphanus* sp) a presença de partículas baciliformes semelhantes às dos Rhabdovirus.

A presença, isolada ou em conjunto, do vírus do mosaico do nabo (VMN) (Tymovirus?), vírus do mosaico da couve flor (Caulimovirus) e vírus latente da couve (VLC) (Carlavirus), foi verificada em praticamente todas as variedades de couve comum ou manteiga estudadas por COSTA *et al.*, (1972), de modo a tornar esta crucífera, em fonte de inóculo potencial para as demais.

O vírus latente da couve (VLC) foi inicialmente detectado durante pesquisas sobre a suscetibilidade de variedades de couve ao vírus do mosaico do nabo, onde se encontrava em estado latente em todas as variedades investigadas.

Além de sua característica de latência, pôde-se averiguar que o VLC é transmissível mecânicamente e por afídeos a várias plantas-teste (A. S. COSTA, dados não publicados). Estes dados, aliados à estudos citopatológicos, morfológicos e de propriedades biológicas (KITAJIMA *et al.*, 1970) permitiram sua inclusão no grupo do vírus latente do cravo ("carlavirus group").

O presente trabalho teve como objetivos a purificação, os estudos das relações serológicas entre o VLC e outros membros do grupo carlavirus, sua localização nos tecidos de couve e a determinação da massa molecular da proteína capsidial.



2. REVISÃO DE LITERATURA

A. GRUPO DO VIRUS LATENTE DO CRAVO ("CARLAVIRUS GROUP")

A.1 PATOLOGIA

A ocorrência de uma doença causada por um carlavirus foi pela primeira vez documentada por SCHULTZ & FOLSOM (1923) quando verificaram sintomas em batata constituídos por mosaico e enrolamento das folhas, que foram mais tarde atribuídos ao vírus M da batata (BAGNALL *et al.*, 1956). Inicialmente os carlavirus foram incluídos em um grupo denominado "grupo do vírus S da batata" (BRANDES & BERCKS, 1965), o qual foi posteriormente chamado de "grupo do vírus latente do cravo" - CARLAVIRUS (HARRISON *et al.*, 1971; MATHEWS, 1979), sendo este o membro tipo do grupo.

Atualmente são conhecidas doenças provocadas pelos carlavirus em várias famílias de mono e dicotiledôneas, tais como solanáceas, leguminosas, cucurbitáceas, compostas, liliáceas, etc.

Os membros do grupo carlavirus geralmente induzem poucos sintomas em suas hospedeiras (HARRISON *et al.*, 1971) ou permanecem latentes em muitas, não causando grandes perdas de ordem econômica (WETTER & MILNE, 1981). Há todavia, algumas exceções, onde os sintomas tornam-se mais severos como no caso do "poplar mosaic virus" (PopMV) (BIDDLE & TINSLEY, 1971), "blueberry scorch virus" (BBSV) (CAVILEER, *et al.*, 1994), "cowpea mild mottle virus" (CMMV) em soja e amendoim (BRUNT & KENTEN, 1973) e em feijão Jalo (COSTA *et al.* 1983).

Os carlavirus são transmitidos mecanicamente e, alguns, de maneira não persistente por afídeos (HAGEDORN & HANSON, 1951; KASSANIS, 1955; HOLLINGS, 1957; BRUNT, 1977; ADAMS & BARBARA, 1980; VAN LENT *et al.*, 1980; JOHNS, 1982; KOENIG *et al.*, 1983). O afídeo *Myzus persicae* é um dos vetores para vários vírus do



grupo, tais como "carnation latent virus" (WETTER & MILNE, 1981), "red clover vein mosaic virus" (VARMA, 1970), "chrysanthemum virus B" (HOLLINGS, 1972), "lily symptomless virus" (ALLEN, 1972) e "hop mosaic virus" (ADAMS & BARBARA, 1980). ALLEN (1972) cita que o "lily symptomless virus" pode ser transmitido de maneira não persistente por *Myzus persicae* e de maneira persistente por *Aphis gossypii*.

A transmissão de carlavírus pela mosca branca *Bemisia tabaci* já foi verificada para o vírus do mosaico angular do feijoeiro Jalo (COSTA *et al.*, 1980) e CMMV (IWAKI *et al.*, 1982) que são vírus semelhantes ou mesmo idênticos (GASPAR *et al.*, 1985).

A transmissão pelas sementes geralmente não ocorre, ou ocorre em baixa proporção, exceto para o CMMV, onde observou-se transmissão de 2 a 90% das sementes em três hospedeiras testadas (BRUNT & KENTEN, 1973).

A.2 MORFOLOGIA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Os vírus pertencentes ao grupo dos carlavírus apresentam partículas ligeiramente flexíveis com comprimento normal variando de 610 a 700 nm e 12 a 15 nm de diâmetro (WETTER & MILNE, 1981).

As partículas contêm RNA infectivo de fita única, cuja concentração determinada para alguns membros do grupo, variou de 5% a 8,5% (WETTER & MILNE, 1981; TAVANTZIS, 1984; GASPAR & COSTA, 1993).

A massa molecular da proteína capsial foi estimada por eletroforese em gel desnaturante de SDS-poliacrilamida variando de 31 kDa a 37 kDa (BRUNT & KENTEN, 1973; PAUL, 1974; BOCCARDO & MILNE, 1976; VEERISSETTY & BRAKKE, 1977a; BRUNT, 1977; KUSCHKI *et al.*, 1978; ADAMS & BARBARA, 1980; GASPAR & COSTA, 1993). Vários trabalhos, entretanto, têm evidenciado, em gel de SDS-PAGE, a presença de duas ou mais bandas relacionadas com a proteína capsial, havendo várias hipóteses para o surgimento dessas bandas adicionais (TUNG & KNIGHT, 1972; BRUNT &

KENTEN, 1973; GOODMAN, 1975; BOCCARDO & MILNE, 1976; KOENIG *et al.*, 1978; FOSTER & MILLS, 1991a).

A partir de dados para a massa molecular e conteúdo de ácido nucleico e proteína, foi estimado o peso molecular da partícula em $50-60 \times 10^6$ Da, o que indica que cada partícula contém cerca de 1600 a 1800 subunidades proteicas (VARMA *et al.*, 1968; VEERISSETTY & BRAKKE, 1977a,b; VEERISSETTY & BRAKKE, 1978). Estas partículas possuem coeficiente de sedimentação entre 157 S e 172 S, sendo que seu coeficiente de extinção varia de 2,1 a 2,3 (PAUL & WETTER 1964; WETTER & MILNE, 1981).

O ponto de inativação térmica dos carlavirus varia de 55°C a 70°C (WETTER & MILNE, 1981) e o ponto final de diluição entre 10^{-3} a 10^{-4} (KOENIG, 1982) chegando ocasionalmente a 10^{-6} (WETTER & MILNE 1981). A longevidade em extratos de folhas é de poucos dias (KOENIG, 1982) exceção feita ao "Helenium virus S", onde a longevidade "in vitro" é de 2-3 semanas (KOENIG *et al.*, 1983).

A.3 ULTRAESTRUTURA DOS TECIDOS INFECTADOS

Os carlavirus que têm sido estudados a nível de microscopia eletrônica apresentam distribuição restrita ao citoplasma de células epidérmicas e do mesófilo (CHRISTIE & EDWARDSON, 1977), sendo menos frequentemente encontrado também em elementos crivados do floema (TU & HIRUKI, 1970, THONGMEEARKOM *et al.*, 1984; GASPAR & COSTA, 1993).

As partículas aparecem soltas ou mais frequentemente formando conjuntos agregados com configuração mais ou menos paralela das mesmas (TU & HIRUKI, 1970; BOS & RUBIO-HUERTOS, 1972; HIRUKI & SHUKLA, 1973; RUBIO-HUERTOS & BOS, 1973; ATKINSON & COOPER, 1976; KUSCHKI *et al.*, 1978; Van LENT *et al.*, 1980; HEARON, 1982; KOENIG *et al.*, 1983).

Frequentemente, estes agregados são associados com a membrana do tonoplasto, com a parede celular e às vezes com a membrana do cloroplasto (DE BOKX & WATERREUS, 1971; BOS & RUBIO-HUERTOS, 1971; 1972; RUBIO-HUERTOS & BOS, 1973; HIRUKI & SHUKLA, 1973; BRUNT *et al.*, 1976; KUSCHKI *et al.*, 1978; HEARON, 1982; GASPAS & COSTA, 1993). Tais agregados podem aparecer às vezes como "corpos bandados", onde a largura de cada banda corresponde ao comprimento de uma partícula (BOS & RUBIO-HUERTOS, 1971; CHRISTIE & EDWARDS, 1977; HEARON, 1982). Em estudos realizados com o CMMV, foi observada a presença de agregados em forma de "penas" de aves (BRUNT *et al.*, 1983; THONGMEEARKON *et al.*, 1984). Em estudos posteriores com o vírus do mosaico angular do feijoeiro (VMAF), GASPAS & COSTA (1993) relataram também a presença desses agregados, denominados "feixes falcados" e sugeriram a sua utilização como meio de diagnóstico para esses vírus, uma vez que não foi relatada a presença desses agregados em outras combinações vírus/planta.

3.3 ESTRUTURA GENÔMICA

A.4 SEROLOGIA

Os carlavírus são um grupo de vírus de plantas cujo material genético é

Todos os carlavírus são bons imunogênicos quando injetados em coelhos (WETTER & MILNE, 1981). São geralmente obtidos antissoros de alto título usando como método, principalmente, a injeção intravenosa seguida de uma injeção intramuscular do vírus purificado adicionado ao adjuvante de Freund, durante um certo período.

Os métodos mais utilizados para averiguar as relações serológicas entre os carlavírus são os testes de aglutinação, testes de precipitina, testes de imunodifusão, ELISA e testes de decoreação em microscopia eletrônica de imunoadsorção (WETTER & MILNE, 1981).

As relações serológicas entre os membros do grupo dos carlavírus podem variar desde muito próximas até distantes ou mesmo não detectáveis (KOENIG, 1982).

Os membros melhor estudados do grupo (CLV, CVB, PVS, RCVMV, PeSV, PLV e CV2) são serologicamente interrelacionados (BAGNALL, *et al.*, 1959; KUSCHKI *et al.*, 1978; ADAMS & BARBARA, 1980; WETTER & MILNE, 1981; KOENIG, 1982; FOSTER & MILLS, 1991a).

Os testes serológicos têm sido ainda utilizados para confirmação ou exclusão de um dado vírus dentro do grupo dos carlavirus. O CMMV, por exemplo, inicialmente indicado como carlavirus pela sua morfologia e tamanho da partícula não apresentou relação serológica com nenhum carlavirus bem caracterizado, exceto, uma relação muito distante com o CLV (BRUNT & KENTEN, 1973). Devido à esse dado, aliado ao fato de a transmissão desse carlavirus ser feita pela mosca branca *Bemisia tabaci* (IWAKI *et al.*, 1982; COSTA *et al.*, 1983), foi sugerido que aquele vírus fosse colocado como um subgrupo dos carlavirus ou que permanecesse temporariamente sem classificação até ser melhor caracterizado (JEYANANDARAJAH & BRUNT, 1993).

A.5 ESTRUTURA GENÔMICA

Os carlavirus são um grupo de vírus de plantas cujo material genético é constituído por um RNA monopartido de fita única e positiva, com peso molecular variando de 2,3 a 3,0 x 10⁶ (7,0-8,0 Kb) (WETTER & MILNE, 1981; KOENIG, 1982; PROLL *et al.*, 1981; KUSCHKI *et al.*, 1978).

Os carlavirus possuem uma região terminal 3' poliadenilada (TAVANTZIS, 1984; MACKENZIE *et al.*, 1989; ZAVRIEV *et al.*, 1991; FOSTER & MILLS, 1992) sendo que o sinal determinante para a poliadenilação (AATAAA), típico de mRNAs de eucariotos, foi encontrado nas sequências de nucleotídeos dos carlavirus HelVS (FOSTER *et al.*, 1990a) e PVM (ZAVRIEV *et al.*, 1991), estando ausente nos demais carlavirus já sequenciados. A estrutura 5'-Cap foi também encontrada em vários carlavirus, tais como BBScV (CAVILEER *et al.*, 1994; LAWRENCE & HILLMAN, 1994), PVM (ZAVRIEV *et al.*, 1991), AHLV

(FOSTER & MILLS, 1991b) e PVS^o (FOSTER & MILLS, 1990a). Há, entretanto, evidências experimentais de que os RNAs subgenômicos não apresentam esta estrutura (RUPAZOV *et al.*, 1989).

A sequência parcial de nucleotídeos da extremidade 3' foi determinada para vários membros do grupo, tais como PVM (RUPAZOV *et al.*, 1989), PVS^A (MACKENZIE *et al.*, 1989), LSV (MEMELINK *et al.*, 1990), HelVS (FOSTER *et al.*, 1990a; TURNER *et al.*, 1993), CLV (MEEHAN & MILLS, 1991; FOSTER *et al.*, 1990b), chrysanthemum virus B (CVB) (LEVAY & ZAVRIEV, 1991), PVS^o (FOSTER & MILLS, 1992), PopMV (HENDERSON *et al.*, 1992), GV1 (NAGAKUBO *et al.*, 1994).

A sequência completa dos nucleotídeos foi determinada para o RNA genômico do PVM (ZAVRIEV *et al.*, 1991) e BBS^cV (CAVILEER *et al.*, 1994) que possuem respectivamente, 8534 e 8514 nucleotídeos, excluindo a sequência poly(A). Essas sequências incluem seis "Open Reading Frames" (ORFs) que codificam proteínas com as seguintes massas moleculares: 5'-223 kDa- 25 kDa- 12 kDa- 7 kDa- 34 kDa(CP)- 11 kDa-3' para PVM e 5'-223 kDa- 25 kDa- 11 kDa- 7 kDa- 33 kDa(CP)- 16 kDa-3' para BBS^cV (Diagrama 1). As sequências de nucleotídeos dos carlavírus, parcial ou totalmente sequenciados, apresentam grande similaridade quanto a sua organização.

A ORF-1 nos dois vírus completamente sequenciados, que codifica para a proteína 223 kDa, contém domínios altamente conservados de metil transferase, helicase e polimerase, típicos daqueles encontrados em proteínas envolvidas na replicação de vírus de outros grupos (MOROZOV *et al.*, 1990a; ROZANOV *et al.*, 1992; KOONIN & DOLJA, 1993; LAWRENCE & HILLMAN, 1994).

Após a ORF-1, ocorre a primeira região intergênica, não codificadora, seguida de três ORFs sobrepostas (ORFs 2, 3 e 4) que apresentam sequências com alto grau de homologia entre as sequências dos membros do grupo dos carlavírus. A ORF-2 codifica uma proteína de aproximadamente 25 kDa que possui um provável domínio de ligação a nucleotídeos tri-fosfato, notadamente ATP e GTP. Este domínio constitui o núcleo GKS

(glicina- lisina- serina), altamente conservado e presente em vários carlavirus (MACKENZIE *et al.*, 1989; HENDERSON *et al.*, 1992; RUPAZOV *et al.*, 1989; CAVILEER *et al.*, 1994). Os produtos das ORFs 3 e 4, de 11 kDa e 7 kDa respectivamente, parecem conter segmentos altamente hidrofóbicos e provavelmente são proteínas associadas a membranas (MOROZOV *et al.*, 1990b; RUPAZOV *et al.*, 1989).

A ORF que codifica a proteína capsidial (ORF-5) segue-se à segunda região intergênica não codificadora e é seguida pela ORF terminal 3' (ORF-6) que tem um potencial para codificar uma proteína rica em resíduos de cisteína, num modelo típico de sequências que caracterizam um domínio "zinc finger" encontrado em vários carlavirus e cuja massa molecular varia de 10,8 kDa a 16 kDa (GRAMSTAT *et al.*, 1990; HAYLOR *et al.*, 1990; ZAVRIEV *et al.*, 1991; CAVILEER *et al.*, 1994).

Há várias evidências de que a proteína capsidial de alguns carlavirus é codificada por RNA subgenômico (FOSTER & MILLS, 1990b,c; 1991c; MACKENZIE *et al.*, 1989). A tradução em sistemas livres de células de RNAs do CLV (TAVANTZIS, 1991) ou PVS^o (FOSTER & MILLS, 1992) sugerem ainda que a proteína capsidial pode estar envolvida, como protease, no processamento da proteína codificada pela ORF-1 (223 kDa).

Uma característica dos carlavirus é a presença da sequência canônica procariótica de Shine-Dalgarno (SHINE & DALGARNO, 1975). Esta sequência (AGGAGGT) aparece dentro de dois blocos de nucleotídeos altamente conservados em regiões "upstream" dos códons de iniciação das ORFs da proteína 25 kDa e da proteína capsidial (FOSTER & MILLS, 1991d). A sequência Shine-Dalgarno mostra pareamento com as sequências 3'-terminal do rRNA 16S o que, em procariotos, permite a ligação com o ribossomo e subsequente iniciação da tradução e alongação da proteína. A pequena subunidade rRNA dos cloroplastos possui alta homologia com o rRNA 16 S bacteriano, com forte conservação de sua sequência terminal 3' (FOSTER, 1992). Alguns trabalhos, a nível de microscopia eletrônica, com os carlavirus PVS e PVM, têm demonstrado uma estreita associação entre partículas virais e cloroplastos (TU & HIRUKI, 1971; HIRUKI & TU,

1972). Estas informações têm levado a uma especulação sobre um possível papel dos cloroplastos no ciclo de multiplicação dos carlavirus (FOSTER, 1992). No entanto, ainda são necessárias maiores informações para se avaliar o verdadeiro sentido da presença dessas sequências no genoma de vírus cujos hospedeiros são eucarióticos, mas a conservação rigorosa destas sequências em todos os carlavirus, indica uma possível importância funcional.

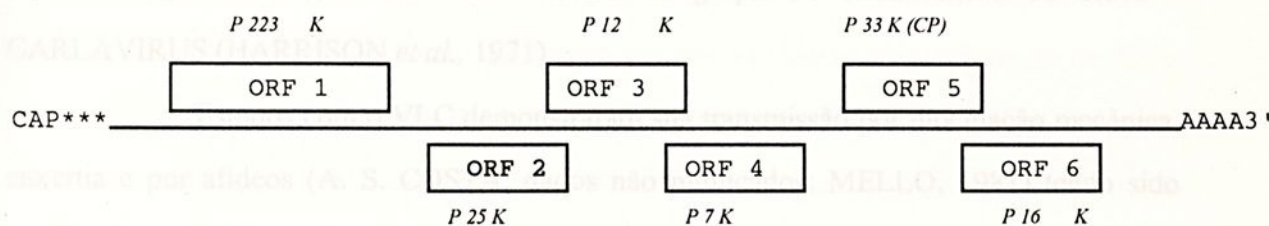


Diagrama da organização genômica dos carlavirus. (O massa molecular das proteínas é referente ao BBScV, carlavirus inteiramente sequenciado) (Modificado de CAVILEER *et al.*, 1994).

B. VIRUS LATENTE DA COUVE

A presença do vírus latente da couve (VLC) em diversas variedades de couve manteiga ou comum cultivadas, foi verificada já há algum tempo (A. S. COSTA, dados não publicados; COSTA *et al.*, 1972, 1974).

Pela sua morfologia e aspectos citopatológicos (KITAJIMA *et al.*, 1970) além do caráter latente e dados preliminares sobre suas propriedades biológicas (A. S. COSTA, dados não publicados), o VLC foi incluído no grupo do vírus latente do cravo - CARLAVIRUS (HARRISON *et al.*, 1971).

Estudos com o VLC demonstraram sua transmissão por inoculação mecânica, enxertia e por afídeos (A. S. COSTA, dados não publicados; MELLO, 1981) tendo sido verificado que a transmissão por *Myzus persicae* ocorre com baixa eficiência (MELLO, 1981).

Quanto às características físicas do VLC, MELLO (1981) relata que o ponto de inativação térmica variou entre 75°C e 80°C e o ponto final de diluição entre 10^{-3} e 10^{-4} . A longevidade em suco de plantas, quando mantido em câmara de temperatura controlada (10-15°C) foi de 4 a 6 dias, enquanto em temperatura ambiente, a mesma foi de 2 a 4 dias.

Quanto ao círculo de hospedeiras, MELLO (1981) relata que após inoculação mecânica, o VLC infectou todas as crucíferas testadas e no mínimo uma espécie das famílias Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Malvaceae, Solanaceae, Cucurbitaceae e Leguminosae, sendo que a maioria não desenvolveu sintomas. A recuperação do vírus foi possível a partir de folhas inoculadas e não inoculadas de espécies das famílias das Crucíferas, Cucurbitáceas, Leguminosas e Solanáceas.

O comprimento normal das partículas varia de 633 nm (MELLO, 1981) a 650 nm (KITAJIMA *et al.*, 1970), variação que segundo MELLO (1981) é aceitável devido à diversos fatores que interferem na determinação.



3. MATERIAL O conteúdo de ácido nucleico, determinado para esse vírus por leituras espectrofotométricas, foi de 8,5% (MELLO, 1981).

KITAJIMA *et al.* (1970) relataram a localização das partículas do VLC no citoplasma não se achando especificamente associadas a nenhuma organela celular, embora, com certa frequência, as partículas fossem encontradas nas proximidades de cloroplastos. Relataram, ainda, a presença de agregados de partículas nos tecidos foliares e radiculares, sendo que nas folhas, os agregados do VLC foram mais comumente encontrados no parênquima lacunoso e paliádico e menos frequentemente na epiderme e no parênquima vascular. Tais agregados não foram detectados no interior dos vasos crivados ou lenhosos maduros, embora formas imaturas desses vasos pudessem ocasionalmente conter agregados do vírus. A disposição das partículas virais dentro do agregado normalmente era paralela entre seus eixos maiores. Na ponta da raiz, grupos de partículas alongadas foram encontrados na epiderme, na coifa e na região cortical, mas não na zona meristemática. Não foram encontrados efeitos citopáticos conspícuos nas células invadidas pelo VLC e sugeriram que deva haver um equilíbrio entre o metabolismo normal da célula e o mecanismo de síntese do vírus.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Quando não especificado, a metodologia utilizada é aquela descrita no "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (SAMBROOK *et al.*, 1989).

3.1 Purificação

O vírus latente da couve foi purificado sempre a partir de folhas de couve manteiga obtidas em feiras livres de São José do Rio Preto, S.P. A metodologia utilizada (Esquema 1) foi, em parte, aquela usada por GASPAR & COSTA (1993) para purificação do vírus do mosaico angular do feijoeiro Jalo.

Cerca de 100 g de folhas congeladas ou frescas foram trituradas em liquidificador com 2 volumes de tampão fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) 0,5 M pH 7,0 (ajustado com NaOH concentrado) contendo sulfito de sódio 0,1%, etilenodiaminotetracetato de sódio (EDTA) 0,005 M (Tampão A). Após filtração em gaze, o suco foi misturado com meio volume de clorofórmio/tetracloreto de carbono (1:1 v/v) e fortemente agitado por 15 minutos e continuamente durante a sua manipulação.

A emulsão foi então centrifugada a 10.000g por 15 minutos e a fase aquosa recuperada e misturada com Triton X-100 à concentração final de 0,5%. Após dissolução deste detergente, adicionou-se polietilenoglicol (PEG 8000) numa concentração final de 6% e deixou-se a 4°C por 120 minutos com agitação. Após centrifugação a 12.000g por 15 minutos, o sobrenadante (SN-1) foi descartado e o "pellet" (P-1) ressuspenso em 1/10 do volume inicial de tampão KH_2PO_4 0,5 M pH 7,0 contendo EDTA 0,002M, Triton X-100 0,1% (Tampão B) e mantido a 4°C por 120 minutos com agitação. A seguir o material foi centrifugado a 12.000g por 15 minutos e então o "pellet" (P-2) foi descartado e foi realizada uma reprecipitação, adicionando ao sobrenadante polietilenoglicol (PEG 8000) à concentração final de 4% e NaCl 0,1 M e mantido a 4°C por 120 minutos com agitação.



Após centrifugação a 12.000g por 15 minutos, o sobrenadante (SN-3) foi descartado e o "pellet" (P-3), ressuspendido em tampão B, agitado a 4°C por 120 minutos e então submetido a centrifugação de 12.000g por 15 minutos, da qual se descartou o "pellet" (P-4) e reservou-se o sobrenadante (SN-4) que foi centrifugado a 150.000g por 90 minutos. O "pellet" (P-5) foi ressuspendido em tampão B e centrifugado em gradiente linear de sulfato de césio (10-40%) em tampão KH_2PO_4 0,05M pH 7,0 a 110.000g por 90 minutos. A banda foi coletada com pipeta e, após diluição, concentrada por ultracentrifugação a 150.000g por 90 minutos e o "pellet" obtido (P-6), ressuspendido em tampão KH_2PO_4 0,5 M pH 7,0 contendo EDTA 2 mM e Triton X-100 0,1% (Fração A). Esta fração foi visualizada ao microscópio eletrônico e utilizada para todos os demais testes realizados.

Em algumas purificações adicionou-se PMSF (Fluoreto de fenilmetil sulfonila) 10 mM em todos os tampões utilizados durante o processo de purificação.

3.2 Espectrofotometria

O espectro de absorção do VLC purificado (Fração A) foi determinado em um espectrofotômetro de luz ultravioleta modelo CARY/1E/Varian. A concentração do vírus foi aferida utilizando-se a absorção a 260 nm e assumindo um coeficiente de extinção de 2.1 determinado para o vírus latente do cravo, membro tipo do grupo (PAUL & WETTER, 1964).

3.3 Microscopia eletrônica do vírus purificado

Uma alíquota da preparação purificada do vírus foi aplicada sobre telinhas de microscopia eletrônica cobertas com Formvar e reforçadas com carbono. Contrastação negativa foi realizada com solução de ácido fosfotúngstico e observado em um microscópio eletrônico Zeiss EM-10.

Esquema 1. Purificação do VLC

Folhas de plantas infectadas

 KH_2PO_4 0,5 M pH 7,0

EDTA 0,005 mM

Sulfito de Sódio 0,1 % (Tampão A)

liquidificador

filtragem em gaze

50 % clorofórmio/tetracloreto de carbono (1:1)

10.000g/15 min.

Fase

Orgânica

Fase

Aquosa

Triton X-100 0,5 %

PEG 8000 6%

120 min/4^o C/agitação

12.000g/15 min.

SN-1

P-1

 KH_2PO_4 0,5 M pH 7,0

EDTA 0,002 M

Triton X-100 0,1 % (Tampão B)

2-3 horas/4^o C/agitação

12.000g/15 min.

P-2

SN-2

PEG 8000 4 %

NaCl 0,1 M

2-3 horas/4^o C/agitação

12.000g/15 min.

SN-3

P-3

Tampão B

2-3 horas/4^o C

agitação

12.000g/15 min.

P-4

SN-4

150.000g/90 min.

P-5

SN-5

Tampão B

Gradiente CS_2SO_4

110.000g/90 min

Banda

150.000g/90 min

SN-6

P-6

Tampão B

Fração A

3.4 Teste biológico para o vírus purificado

Uma alíquota da fração do vírus purificado foi diluída em tampão fosfato monobásico de potássio 0,5 M, pH 7,2 e sulfito de sódio a 0,02 M e inoculado mecanicamente em plantas de couve sadias e, então, mantidas em casa de vegetação. A presença de vírus nas plantas inoculadas foi determinada através de teste serológico com o antissoro para o VLC pela técnica de impressão de tecidos.

3.5 Eletroforese

3.5.1 Preparo dos géis

Inicialmente foram testadas as concentrações de 10%, 12%, 15% e 20% para a preparação dos géis mantendo em todos os casos, a porcentagem de ligações cruzadas, C= 3,3%. Verificando-se não haver diferenças quanto à massa molecular das proteínas estudadas, optou-se pela concentração de 12% para todos os demais experimentos.

Os componentes utilizados para o preparo da solução do gel foram os seguintes:

Gel de Resolução:

Água deionizada.....	3,1 ml
Solução aquosa de Acrilamida/bis (29: 1).....	6,0 ml
Tris HCl 1M pH 8,7.....	5,6 ml
SDS 10%.....	150 ul
Persulfato de Amônio 10% (recém preparado).....	150 ul
TEMED (N, N, N, N, tetrametilenodiamina).....	6 ul

Gel de Empacotamento ("stacking")

Água.....	3,40 ml
Solução aquosa de Acrilamida/bis (29: 1).....	0,83 ml
Tris- HCl 1M pH 6,8.....	0,63 ml
SDS 10%.....	50,0 ul
Persulfato de Amônio 10%.(recém .preparado).....	50,0 ul
TEMED.....	5 ul

Tampão de corrida (~pH 8,3)

Glicina.....	7,2g
Trizma Base.....	1,5g
SDS 10%.....	2,5 ml
Água.....q.s.p.....	500 ml

3.5.2 Procedimento

A determinação da massa molecular da proteína capsidial foi feita em gel descontínuo de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo LAEMMLI (1970). Utilizou-se gel de empacotamento ("stacking gel") a 5% e de resolução a 12%. As proteínas foram desnaturadas por fervura a 100°C por 3 minutos em tampão de amostra (Tris HCl 0,125 M pH 6,8 contendo SDS 4%, glicerol 20%, 2 mercaptoctanol (2-ME) 10% e azul de bromofenol 0,001 M). Como marcadores de massa molecular utilizou-se o padrão Dalton Mark VII-L (Sigma Chemical Co.) composto das seguintes proteínas: Albumina bovina (66 kDa), Albumina de ovo (45 kDa), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36 kDa), Anidrase carbônica (29 kDa), Tripsinogênio (24 kDa), Inibidor de Tripsina (20 kDa) e Albumina de leite (14,2 kDa). Posteriormente também foi utilizado o marcador de massa molecular da Gibco-BRL composto das seguintes proteínas: Lisozima (14,3 kDa), Beta-Lactoglobulina (18,4 kDa), Anidrase Carbônica (29 kDa), Ovalbumina (43 kDa), Soro Albumina Bovina (68

kDa), Fosforilase B (97,4 kDa) e Miosina (H-chain) (200 kDa). A eletroforese foi conduzida à 100 V (voltagem constante) por 90 minutos em um aparelho Mini Protean II da Bio-Rad com gel de 7 cm X 8 cm com espessador de 1mm de espessura. 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.

Foram testados diferentes tampões de amostra a fim de se verificar o efeito da concentração de SDS e 2-ME, assim como a presença de uréia sobre as bandas da proteína capsidial. O tampão comumente usado (Tampão A) continha SDS 2% e 2-ME 5%, o tampão B, SDS 1% e 2-ME 1% e o tampão C, SDS 1%, 2-ME 1% e Uréia 8 M, sendo os outros componentes comuns em qualidade e quantidade para os três tampões da amostra.

3.5.3 Secagem dos géis

O processo de secagem utilizado foi descrito por CERON *et al.*, (1992), onde os géis são acondicionados e prensados entre duas folhas de papel celofane umedecidos por uma solução de gelatina comercial a 5% e deixados à temperatura ambiente até sua secagem completa (de 2 a 4 dias). Através deste procedimento torna-se possível a análise posterior dos géis que desidratam formando uma fina película entre as folhas de celofane.

3.6 Determinação da massa molecular da proteína capsidial

Um gráfico das distâncias de migração (Rfs) dos marcadores no gel versus o logaritmo das respectivas massas moleculares foi feito e a massa molecular da proteína do VLC determinada a partir desse gráfico.

3.7 Testes serológicos

O estudo das relações serológicas entre o VLC e outros membros do grupo, foi realizado utilizando-se a técnica de "Western blotting", realizada com proteínas desnaturadas obtidas através da transferência das proteínas do gel de eletroforese SDS-PAGE para o filtro de nitrocelulose, e a técnica de "Dot blotting", onde a proteína nativa contida na amostra de vírus purificado foi aplicada diretamente sobre o filtro de nitrocelulose.

A comparação serológica entre o VLC e alguns outros vírus do grupo foi realizada com antissoros para o CMMV (cedido pelo Dr. M. Iwaki - Japão), VLC e PVS (cedidos pelo Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira - UNICAMP), RCVMV e o CLV (cedidos pelo Dr. Allan A. Brunt - Grã-Bretanha) além do soro normal usado como controle. Os antissoros foram diluídos na proporção de 1:1000.

3.7.1 Pré-adsorção

Para a pré-adsorção dos antissoros, 0,1g de tecido não infectado pelo VLC foi macerado com 1 ml de tampão PBS e, então, uma alíquota de 20 μ l foi adicionada a 20 μ l do antissoro contra o VLC, agitado e mantido a 4°C por 18-20 horas. Após centrifugação a 16.000g por 10 minutos, o sobrenadante foi utilizado como antissoro primário. O mesmo processo foi utilizado para a pré-adsorção dos antissoros contra os demais vírus testados.

3.7.2 "Western blotting"

Após separação em gel desnaturante de SDS-poliacrilamida, as proteínas foram transferidas para filtro de nitrocelulose em um eletrotransferidor (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad) operando sob voltagem constante (100V) por 60 minutos. O tampão de transferência utilizado foi o Tris-Glicina (Tris 0,025 M, Glicina 0,192



M) contendo Metanol 20%. As membranas foram então incubadas com os antissoros para o VLC, CMMV, RCVMV, PVS, CLV e soro normal. Para detecção da reação antígeno-antissoro, procedeu-se como no item 3.7.4.

3.7.3 "Dot blotting"

Foram aplicados 3 μ l da preparação de vírus purificado (Fração A), diretamente sobre membrana de nitrocelulose e deixado secar por 30 minutos. As membranas foram então incubadas com os antissoros para VLC, CMMV, RCVMV, PVS, CLV e soro normal. Para detecção da reação antígeno-antissoro, procedeu-se como no item 3.7.4.

3.7.4 Imunolocalização da proteína capsidial

A detecção da proteína capsidial na membrana de nitrocelulose foi feita primeiro incubando a membrana em tampão PBS (Fosfato de Sódio 0,01 M pH 7,2- NaCl 0,15 M) contendo Tween-20 0,3% (PBS-T) e albumina de soro bovino (BSA) 3% por 3 horas. Em seguida, a membrana foi incubada por 60 minutos com antissoro para a proteína capsidial do VLC (pré-adsorvido) diluído 1:1000 em tampão PBS-T contendo BSA 0,3% e heparina (20 μ g/ml) (DIETZGEN & FRANCKI, 1987). Seguiram-se lavagens (3 X 15 minutos) com tampão PBS-T e incubação com anticorpos anti-IgG de coelho acoplados com fosfatase alcalina diluído em tampão PBS-T contendo BSA 0,3% na proporção de 1:30.000 por 60 minutos. Após lavagens (3 X 15 minutos) com tampão PBS, a membrana de nitrocelulose foi incubada com mistura de BCIP/NBT ("5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro-blue tetrazolium") até o aparecimento do resultado da reação (cor azul púrpura).

3.8 Impressão de tecidos

Pequenos pedaços de pecíolo foram cortados com lâmina de barbear, secados com papel de filtro e aplicados com leve pressão sobre membrana de nitrocelulose (LIN *et al.*, 1990). O tecido foliar foi imprimido colocando-se o pedaço de folha entre dois pedaços delgados de "isopor" para, então, serem cortados, secados e aplicados sobre a membrana de nitrocelulose. As membranas foram secadas por 20-30 minutos, e então tratadas conforme descrito no item 3.7.4. Em alguns casos, a membrana de nitrocelulose foi também tratada por 1 minuto com solução aquosa de safranina 1% para evidenciar melhor as estruturas dos tecidos. A reação foi observada e fotografada em uma lupa Zeiss Jena.

Os controles foram feitos tanto através da impressão de tecidos de plantas saudáveis, como através da utilização de soro normal na reação serológica.

Para demonstrar a sensibilidade e especificidade da técnica de impressão de tecidos associada à imunolocalização de proteínas, foi realizado um teste serológico utilizando-se um vírus sabidamente restrito ao floema, o vírus do enrolamento da folha da batata (ROCHOW & DUFFUS, 1981).

4.3 Teste biológico

Aliquotas do vírus purificado (Fração A) foram infectivas quando inoculadas em plantas de couve comum (6 plantas obtidas de sementes e mantidas em casa de vegetação). A detecção do vírus foi feita através de imunodetecção da proteína capsidial do VLC, realizada sobre impressão de tecidos de planta inoculada resultando em reação positiva para a planta inoculada e reação negativa para impressão obtida a partir da planta saudável.



4. RESULTADOS

4.1 Purificação

Exames ao microscópio eletrônico, das preparações purificadas do VLC, revelaram bom grau de pureza. A produção comumente obtida, averiguada através de leitura da absorbância a 260 nm, foi de aproximadamente 7mg/Kg de folhas de couve processadas, utilizando-se o coeficiente de extinção do CLV cujo valor é 2,1 (PAUL & WETTER, 1964). Aparentemente não houve grande agregação de partículas virais, conforme observações ao microscópio eletrônico (Figura 1). Não houve diferenças entre as purificações obtidas a partir de material fresco ou congelado quanto à sua concentração ou qualidade.

4.2 Espectro de absorção do VLC

O espectro de absorção na região do ultra-violeta (220-330 nm) da preparação purificada (Fração A) foi típico de nucleoproteínas com picos máximo e mínimo à 260 e 239 nm, respectivamente (Figura 2).

As relações encontradas foram: $A_{260} / A_{280} = 1,55$ e $A_{\max} / A_{\min} = 1,23$.

4.3 Teste biológico

Alíquotas do vírus purificado (Fração A) foram infectivas quando inoculadas em plantas de couve comum (6 plantas obtidas de sementes e mantidas em casa de vegetação). A detecção do vírus foi feita através de imunodeteção da proteína capsial do VLC, realizada sobre impressão de tecidos de planta inoculada resultando em reação positiva para a planta inoculada e reação negativa para impressão obtida a partir da planta sadia

(Figura 3). Assim foi constatado 100% de infecção quando se utilizou como inóculo, partículas purificadas do VLC.

4.4 Eletroforese e determinação da massa molecular da proteína capsidial

Quando a proteína capsidial do vírus latente da couve, desnaturada em meio contendo SDS e 2-ME, foi aplicada em gel de poliacrilamida SDS-12%PAGE, houve formação de duas bandas principais e outras adicionais, menos evidentes, sendo tais proteínas serologicamente relacionadas à proteína capsidial, reagindo positivamente com o antissoro para VLC (Figura 4). A quantidade das proteínas relacionadas a essas bandas menos evidentes, verificada de acordo com a intensidade da coloração das bandas no gel, aumentou gradativamente com o tempo de estocagem da purificação, variando de inexistente (em purificações recentes) à totalidade das proteínas observadas no gel (em purificações estocadas por 4 meses) (Figura 5), identificando uma degradação gradual da proteína capsidial. Não foi realizado um acompanhamento a intervalos mais curtos para estabelecer o tempo mínimo para tal degradação. Quando a purificação foi realizada com a adição de PMSF 10 mM em todos os tampões utilizados, uma banda principal foi observada inicialmente, havendo um atraso no surgimento de produtos de degradação (Figura 6). Não foram testadas outras concentrações para o PMSF, exceto 1 mM que não inibiu a degradação. O uso de tampões de amostra com diferentes concentrações de SDS e 2-ME não evidenciou nenhuma diferença no comportamento da proteína capsidial durante a eletroforese. O tampão de amostra preparado conforme BOCCARDO & MILNE (1976), contendo SDS 1%, 2-ME 1% e Uréia 8M também não teve efeito sobre as diversas bandas relacionadas à proteína capsidial do VLC. Estes resultados foram semelhantes para as preparações purificadas com ou sem a utilização de PMSF 10mM (Figura 7).

A determinação da massa molecular da proteína capsidial do VLC revelou um valor em torno de 38 kDa para banda única, e valores de aproximadamente 38 kDa (banda



superior) e 36 kDa (banda inferior) quando o gel apresentou 2 bandas. A banda para a proteína capsidial degradada após 4 meses de estocagem em geladeira revelou um valor de aproximadamente 26 kDa (Figura 8).

4.5 Relações serológicas

O estudo das relações serológicas entre o VLC e outros membros do grupo apresentou os mesmos resultados para as duas técnicas empregadas, "Western blotting", realizado com proteína desnaturada e "Dot blotting", onde se utiliza a proteína nativa contida na amostra de vírus purificado.

Os resultados obtidos (Figuras 9 e 10) com antissoros para diversos vírus do grupo dos carlavírus, indicam reação positiva apenas com o antissoro homólogo. Nenhuma reação pôde ser vista com os antissoros para CMMV, RCVMV, PVS, CLV ou soro normal.

4.6 Imunolocalização da proteína capsidial em tecidos infectados

A técnica de impressão de tecidos possibilitou o estudo da distribuição da proteína capsidial em tecidos de pecíolos e em folhas. A Figura 11 mostra a ausência do vírus latente da couve em tecidos de planta de couve sadia. Na Figura 12 pode-se observar a presença do vírus latente da couve em tecidos de pecíolo de planta de couve infectada, podendo ser notada sua ampla distribuição embora não seja igualmente distribuído entre as células dos vários tecidos. Apesar de quase todas as células apresentarem a proteína capsidial, a região dos vasos condutores conservou-se praticamente isenta de marcação, o que pode ser observado em detalhe na inserção da Figura 12. Alguma marcação pode ser vista na região do floema possivelmente em célula companheira ou de parênquima floemático.

A Figura 13 mostra a distribuição do vírus latente da couve em tecido de folha de planta infectada. Pode-se notar a presença do vírus nas duas epidermes (adaxial e abaxial) e mesófilo. A proteína capsidial do VLC pode ser vista amplamente distribuída pelos tecidos da folha mas não igualmente distribuída entre as células dos diferentes tecidos. Também nas folhas, não há praticamente nenhuma marcação nos tecidos condutores.

A sensibilidade e especificidade da imunolocalização associada a impressão de tecidos pode ser averiguada na Figura 14, que demonstra a restrita localização do vírus do enrolamento da folha da batata (Luteovirus) em células do floema.

Figura 1. Micrografia eletrônica de partículas de VLC de preparação purificada a partir de couve comum. Ampliado 20 000 X.



Figura 1. Micrografia eletrônica de partículas do VLC de preparação purificada a partir de couve comum. Aumento de 92.000 X.

Figura 2. Espectro de absorção, na faixa do ultravioleta, do vírus latente da couve purificado.

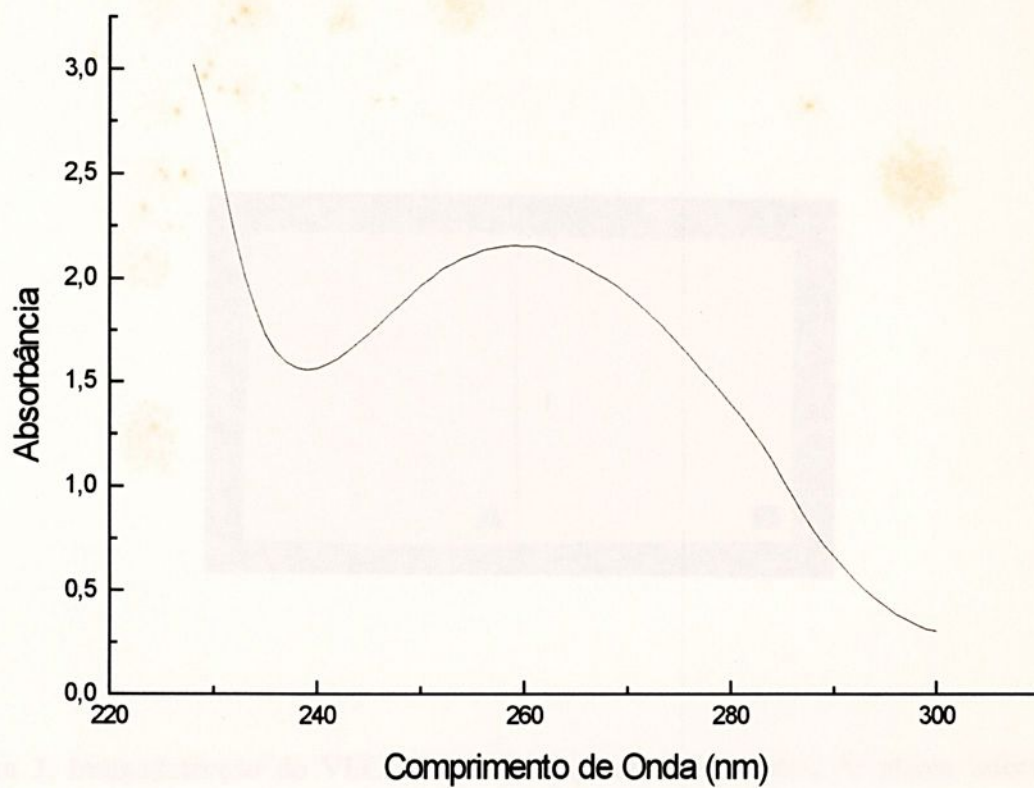


Figura 2. Espectro de absorção, na faixa do ultravioleta, do vírus latente da couve purificado.

Figura 2. Espectro de absorção, na faixa do ultravioleta, do vírus latente da couve purificado.

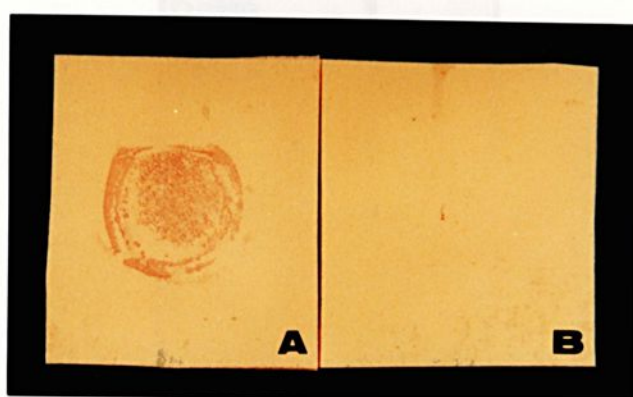


Figura 3. Imunodeteção do VLC através de impressão de tecidos. A: planta infectada a partir da inoculação com o vírus purificado. B: planta sadia, inoculada com tampão.

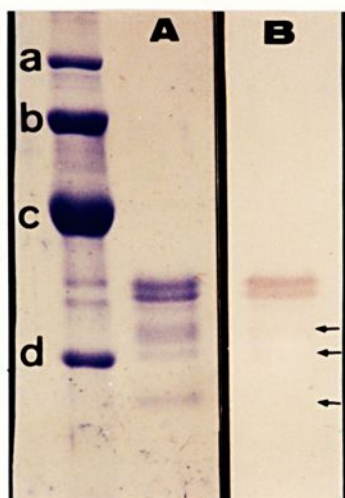


Figura 4: Análise do componente proteico do VLC através de eletroforese e "Western blotting". A: gel de poliacrilamida 12% com amostra da preparação viral purificada; B: Imunoblotting de um gel similar ao (A) transferido por "Western blotting" para membrana de nitrocelulose e incubado com antissoro para VLC. As setas indicam bandas na membrana de nitrocelulose que são mais visíveis no "blott" original.

Marcadores de massa molecular: a: fosforilase B (97,4 kDa), b: albumina de soro bovino (68 kDa), c: albumina de ovo (43 kDa), d: anidrase carbônica (29 kDa).

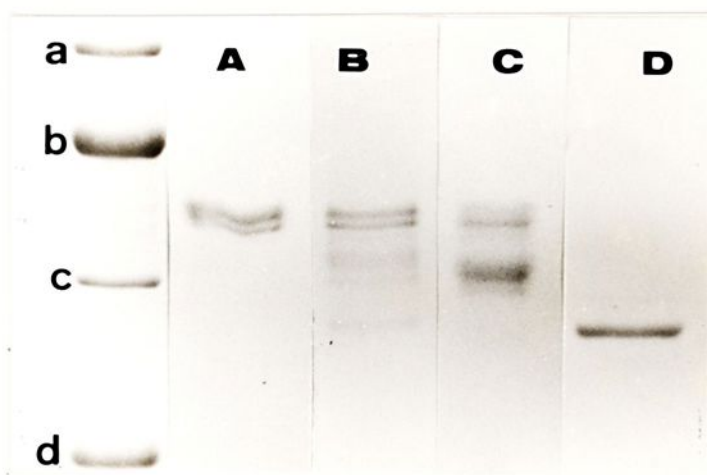


Figura 5. Fotomontagem demonstrando a degradação progressiva da proteína capsidial do VLC (Purificação sem PMSF) em gel de poliacrilamida 12%. As amostras utilizadas para eletroforese foram obtidas a diferentes intervalos após a purificação. A: 1 semana; B: 1 mês; C: 3 meses; D: 4 meses.

Marcadores de massa molecular : a: albumina de soro bovino (68 kDa); b: albumina do ovo (43 kDa); c: anidrase carbônica (29 kDa); d: globulina do leite (18,4 kDa).

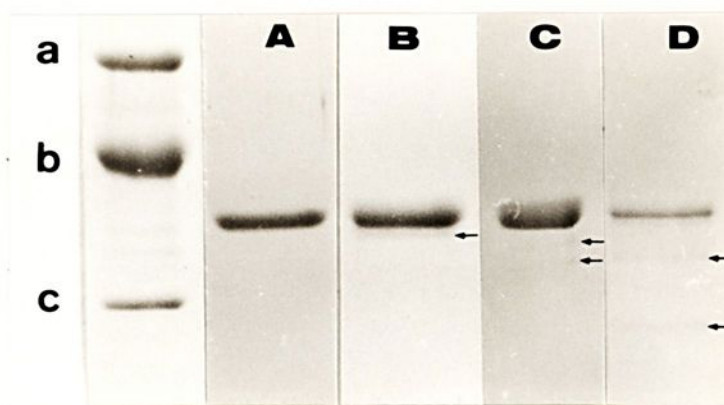


Figura 6. Fotomontagem de eletroforese em gel de poliacrilamida 12% da proteína capsidial do VLC. Amostra obtida de purificação feita com PMSF 10mM- A: 1 semana; B: 2 semanas; C: 2 meses; D: 3 meses.

As setas indicam bandas de produtos degradados, porém de fraca intensidade.

Marcadores de massa molecular : a: albumina de soro bovino (68 kDa); b: albumina de ovo (43 kDa); c: anidrase carbônica (29 kDa).

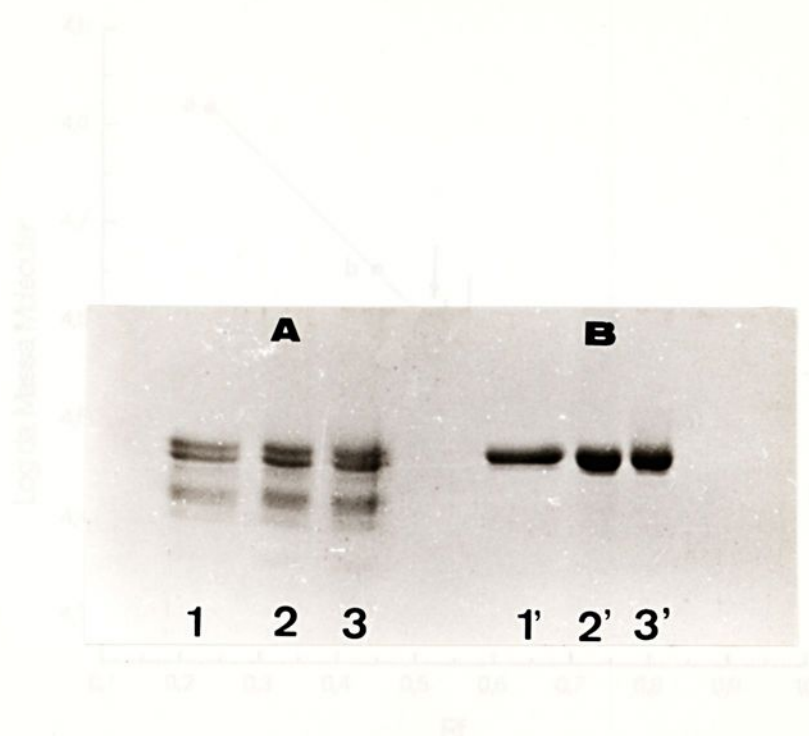


Figura 7. Eletroforese em gel SDS-12%PAGE de preparação purificada do VLC. A: purificação sem PMSF; B: purificação com PMSF 10mM; 1 e 1': tampão de amostra contendo SDS 10% e 2-ME 10%; 2 e 2': tampão com SDS 1% e 2-ME 1%; 3 e 3': tampão com SDS 1%, 2-ME 1% e Uréia 8M.

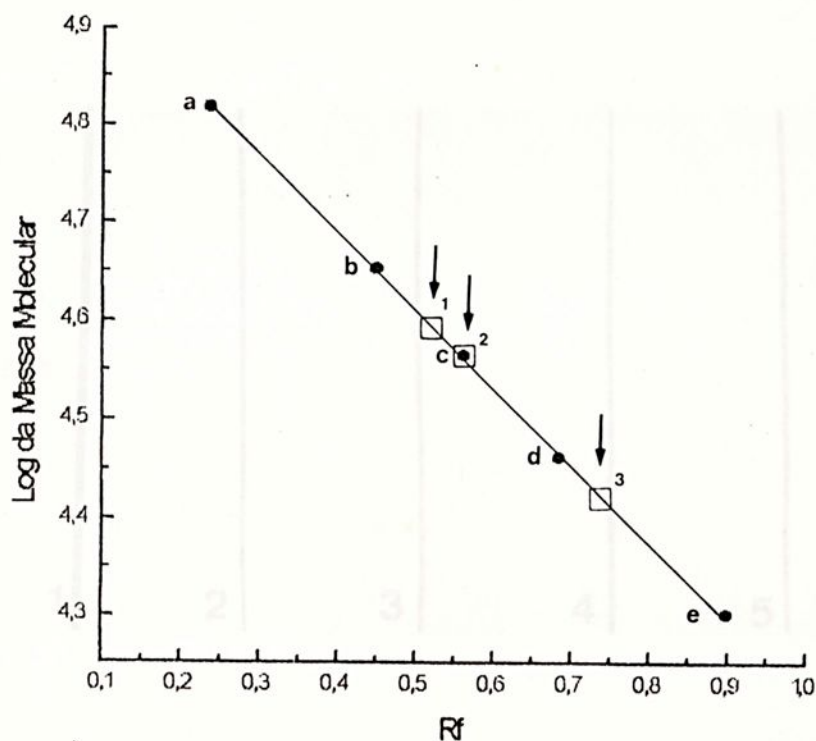


Figura 8. Determinação da massa molecular da proteína capsial do VLC. Os logarítimos das massas moleculares são plotados contra as mobilidades relativas. As setas indicam a mobilidade das bandas da proteína capsial do VLC. 1: banda superior (38 kDa), 2: banda inferior (36 kDa); 3: banda da proteína degradada (26 kDa), 4 meses após purificação.

Relação dos marcadores em ordem crescente de valores da mobilidade relativa (Rf): a, albumina de soro bovino (66 kDa); b, albumina de ovo (45 kDa); c, gliceraldeído fosfato desidrogenase (36 kDa); d, anidrase carbônica (29 kDa); e, inibidor de tripsina (20,1 kDa).

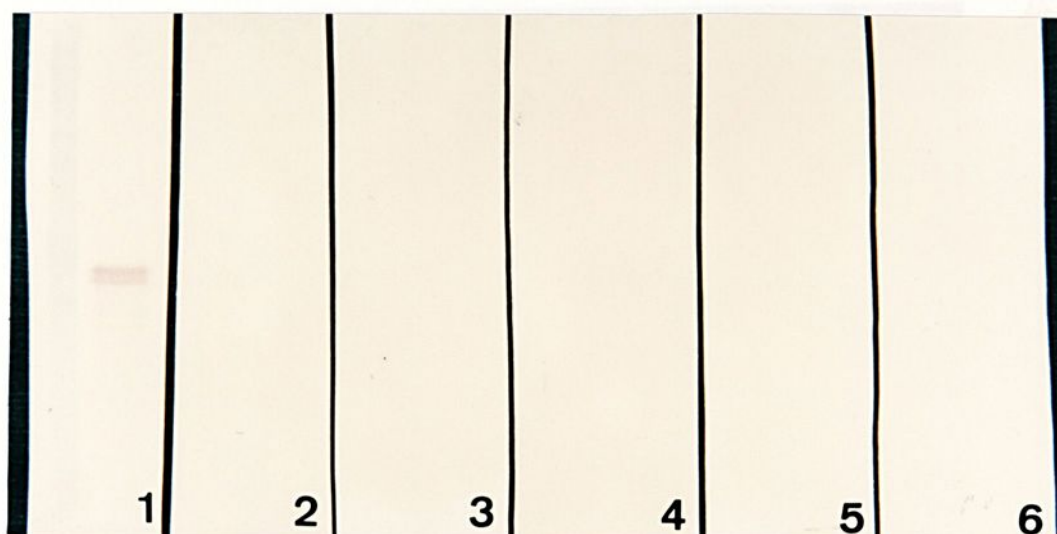


Figura 9. "Western blotting" e reação imunológica com a proteína capsidial do VLC com antissoros para membros do grupo dos carlavirus.

Antissoros testados: 1. anti-VLC; 2. anti-CMMV; 3. anti-PVS; 4. anti-RCVMV; 5. anti-CLV; 6. soro normal.

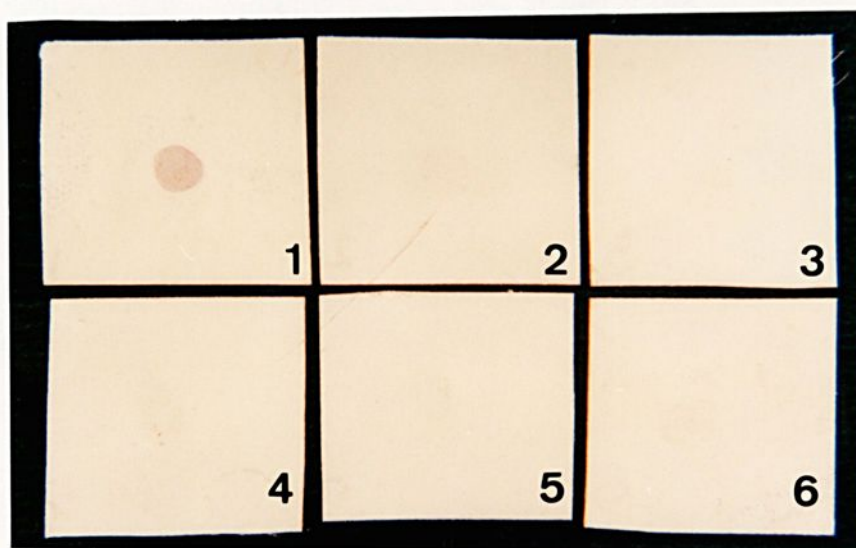


Figura 10. "Dot blotting" e reação imunológica com a proteína capsidial do VLC com antissoros para membros do grupo dos carlavirus.

Antissoros testados: 1. anti-VLC; 2. anti-CMMV; 3. anti-PVS; 4. anti-RCVMV; 5. anti-CLV; 6. soro normal.



Figura 11. Controle da reação. Impressão de tecidos de pecíolo de couve sadia e posterior incubação com antissoro para o VLC.

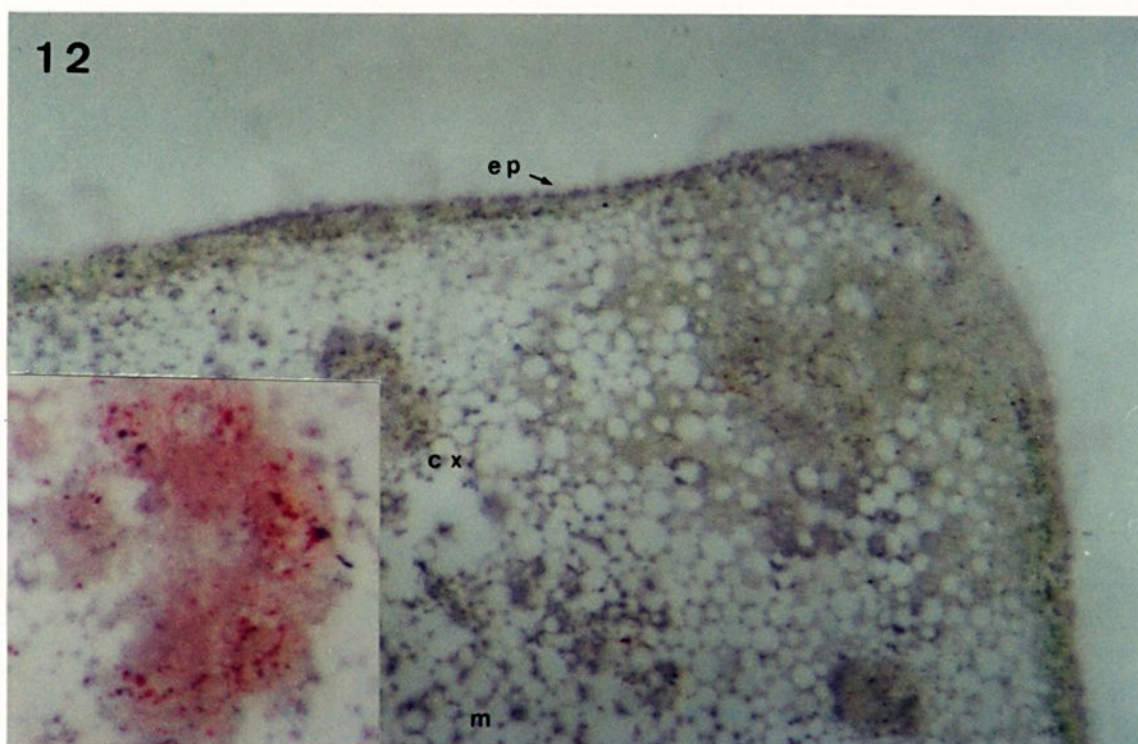


Figura 12. Impressão de tecidos e imunolocalização da proteína capsidial do VLC em pecíolo de planta de couve infectada, utilizando-se antissoro contra VLC. A reação (coloração azul-púrpura) é evidenciada na epiderme (ep), córtex (cx) e medula (m). A região do tecido vascular apresenta pouca ou nenhuma reação. A inserção (também corada com safranina) mostra a ausência de reação na região do xilema.

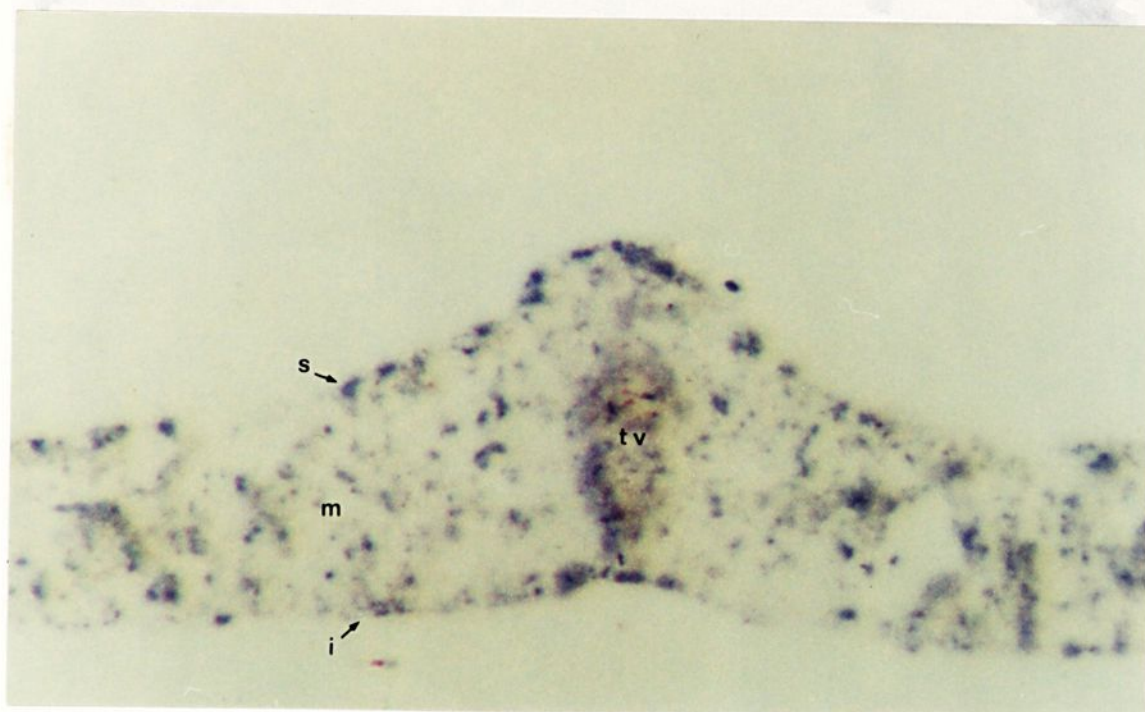


Figura 13. Impressão de tecidos e imunolocalização da proteína capsidial do VLC em folha de planta de couve infectada utilizando-se antissoro contra VLC. Notar a ampla distribuição do VLC pelos tecidos (epiderme e mesófilo). É também evidente a desigualdade quanto a distribuição do VLC nas células de um mesmo tecido. s, epiderme superior; i, epiderme inferior; m, mesófilo; tv, tecido vascular.

5. DISCUSSÃO



Figura 14. Impressão de tecidos e imunolocalização do vírus do enrolamento da folha da batata (VEFB) em pecíolo de planta infectada, utilizando antissoro contra o VEFB. Notar a específica localização (setas) do vírus em células do floema. cx, córtex; e, epiderme; tv, tecido vascular.

5. DISCUSSÃO

Até há bem pouco tempo mencionava-se o grupo dos carlavirus como um dos maiores e menos estudados grupos de fitovírus. Segundo FOSTER (1992), ao nome dos carlavirus seguia-se frequentemente a observação " ...pouco é conhecido sobre a biologia molecular desse grupo". A ausência de graves doenças de repercussão na produção agrícola causadas por membros do grupo, assim como problemas na purificação de partículas virais em quantidades satisfatórias vinham dificultando pesquisas mais detalhadas por parte dos biólogos moleculares e, apesar de nos últimos anos ter havido um significativo aumento no interesse por estudos sobre este grupo de fitovírus, suas propriedades moleculares permanecem ainda pouco esclarecidas.

Os carlavirus, com algumas poucas exceções, não provocam doenças ou sintomas severos, chegando a passar despercebidos, e sendo muitas vezes identificados dentro de um complexo infeccioso com outras viroses (WETTER & MILNE, 1981). Devido a tal fato muitos dos membros do grupo levam o adjetivo "latente" em seu nome, citando-se, como exemplo, o vírus latente da couve e o vírus latente do cravo. Apesar disso, replicam-se em quantidade suficiente para infectar suas hospedeiras local ou sistemicamente. KITAJIMA *et al.* (1970) sugeriram que a ausência de efeitos citopáticos nas células invadidas pelo vírus latente da couve seja devida à um tipo de "equilíbrio entre o metabolismo normal da célula e o mecanismo de síntese do vírus".

Sendo a disseminação do VLC bastante fácil devido ao meio de propagação da cultura da couve dar-se por mudas, aliado ao fato dessa virose não prejudicar economicamente a comercialização da couve como produto alimentício, e conseqüentemente não ser efetivamente combatida há, provavelmente, uma distribuição bastante ampla dessa virose pelo nosso país.

Os trabalhos realizados anteriormente (COSTA, A. S., dados não publicados; KITAJIMA *et al.*, 1970 e MELLO, 1981) forneceram dados sobre a patologia, meios de



transmissão, características morfológicas, ultraestrutura dos tecidos infectados e algumas características físicas e químicas do VLC.

No presente trabalho foram obtidos dados que se somam aos anteriores fornecendo maior base a estudos subsequentes que certamente poderão levar a um conhecimento mais abrangente sobre o VLC e o grupo dos carlavirus em relação às suas características, inclusive genômicas. São relatados os resultados referentes à purificação da partícula viral, algumas propriedades da proteína capsial, relações serológicas com outros carlavirus e a imunolocalização do vírus em tecidos infectados.

Em relação à produtividade do método de purificação empregado, a produção de vírus de 7 mg/Kg de tecido infectado, pode ser considerada satisfatória e dentro dos valores descritos para outros carlavirus, os quais variam de 2-5 mg/Kg de tecido (por exemplo: BRUNT & KENTEN, 1973; GASPAR & COSTA, 1993) a 85 mg/Kg de tecido (por exemplo: LUISONI *et al.*, 1976; HSU *et al.*, 1995). A concentração do VLC na planta deve ser, entretanto, bem maior do que essa, em razão da perda por agregação que ocorre durante o processo de purificação de potyvirus (grupo do vírus Y da batata) e carlavirus (GIBBS & HARRISON, 1976; VEERISSETTY & BRAKKE, 1978; GASPAR & COSTA, 1993). Nas primeiras purificações efetuadas verificou-se o aparecimento de contaminantes, os quais foram reduzidos com a utilização de duas precipitações com polietilenoglicol 8000, incluídas no protocolo de todas as demais purificações. A observação da preparação purificada ao microscópio eletrônico (Figura 1), a curva típica de nucleoproteínas (Figura 2) e a relação A_{260} / A_{280} ao redor de 1,5 confirmam a natureza e a pureza das preparações obtidas.

As preparações purificadas do VLC quando inoculadas em couve obtidas por semente mostraram-se altamente infectivas (Figura 3) reproduzindo a característica de latência do vírus.

Nos experimentos iniciais de determinação da massa molecular da proteína capsial em gel de SDS-PAGE, verificou-se que além da banda esperada havia o

aparecimento de outras bandas coradas com diferentes intensidades, indicando diferentes concentrações dos polipeptídios. Em experimentos subsequentes verificou-se que essas diferenças estavam relacionadas com as diferentes preparações e com tempo de estocagem das amostras em geladeira (Figura 5). Através de "Western blotting" e reação com antissoro homólogo, verificou-se que esses polipeptídios eram relacionados com a proteína capsidial do VLC (Figura 4). Através do gráfico das distâncias de migração versus o logaritmo dos marcadores de massas moleculares utilizados no gel (Figura 8) foram determinadas as massas moleculares referentes às duas bandas principais e que ocorreram em todas as amostras analisadas (38 kDa e 36 kDa) e uma terceira (26 kDa), observada em uma amostra estocada por 4 meses e totalmente destituída dos outros peptídeos de maior massa molecular.

Pelo menos três hipóteses podem ser propostas para explicar o aparecimento das bandas adicionais à proteína capsidial do VLC:

1) as bandas adicionais poderiam ser contaminantes originados da planta hospedeira e não separadas das partículas virais durante o processo de purificação. Entretanto, as observações de que esses polipeptídios adicionais reagem com o antissoro para a proteína capsidial do VLC e o fato de que após quatro meses de estocagem apenas um polipeptídio (26 kDa) é encontrado na preparação, descartam essa hipótese.

2) uma outra hipótese é baseada no trabalho de BOCCARDO & MILNE (1976) que verificaram um comportamento anômalo da proteína capsidial do PopMV em gel de poliacrilamida, dependente dos agentes redutores e desnaturantes utilizados. Assim, quando o vírus era solubilizado em guanidina 6 M ou tratado com SDS 1% e mercaptoetanol 1% seguido de fervura, duas bandas apareciam em SDS-PAGE. Entretanto, quando o vírus era tratado com SDS 1%, mercaptoetanol 1% e uréia 8 M somente uma banda aparecia em SDS-PAGE. Quando essas e outras condições foram utilizadas para preparar a proteína capsidial do VLC, o resultado foi idêntico para todas as condições havendo o aparecimento de duas ou mais bandas (Figura 7). Assim, o aparecimento das bandas adicionais não é devido ao método de preparo das amostras para SDS-PAGE.

3) os polipeptídios adicionais com massas moleculares inferiores a 38 kDa corresponderiam a produtos de degradação da proteína capsidial do VLC induzida por proteases da hospedeira. As observações de que os polipeptídios adicionais foram aparecendo progressivamente em uma amostra inicial de vírus purificado, aliadas ao fato de que a adição de PMSF 10 mM em todos os tampões usados durante o processo de purificação inibiu em larga escala o aparecimento de polipeptídios adicionais (Figura 6), corroboram esta hipótese. Sendo o PMSF um inibidor de enzimas que possuem serina em seu centro ativo, pode-se inferir que pelo menos uma protease que atua sobre a proteína capsidial do VLC seja uma serino-protease. A participação de serino-proteases na produção de polipeptídios adicionais à proteína capsidial foi também sugerida por KOENIG *et al.* (1978) e TREMAINE & AGRAWAL (1972) para o PVX, por FOSTER & MILLS (1991a) para o PVS e por CHU & FRANCKI (1983) para os sobemovirus VTMoV e SNMV.

Constitui sugestão da autora, que em purificações de carlavírus seja adicionado PMSF em todas as fases do processo, em concentração que deverá ser preliminarmente determinada.

O VLC purificado, quando usado como antígeno, apresentou reação serológica positiva apenas para o antissoro homólogo, não reagindo com antissoros para outros carlavírus testados (CMMV, RCVMV, PVS e CLV). Os resultados foram idênticos quando se utilizou a técnica de "Dot blotting", que emprega proteína capsidial em estado nativo, e a técnica de "Western blotting" que emprega proteína capsidial desnaturada. Parte destes resultados diverge daqueles descritos por MELLO (1981) que verificou, em testes de imunodifusão dupla, a formação de linha de precipitação fraca quando se utilizou como antígeno extrato de couve infectada pelo VLC e antissoro para o PVS. Essa divergência pode ser devida a diferenças entre isolados do VLC e/ou antissoros para o PVS utilizados ou, ainda, a diferenças nas técnicas utilizadas. De qualquer forma, se alguma relação de parentesco houver entre o VLC e os outros carlavírus, cujos antissoros foram aqui utilizados, ela pode ser bastante distante. Levando-se em consideração que o gene codificador da

proteína capsidial corresponde a uma pequena porcentagem do genoma viral, estudos utilizando sondas moleculares para o RNA genômico poderão esclarecer as relações de parentesco entre os carlavirus.

A técnica de impressão de tecidos ("tissue printing") foi primeiro descrita por CASSAB & VARNER (1987) para a imunolocalização da proteína extensina em sementes de soja. Posteriormente, LIN *et al.* (1990) utilizaram esse técnica para a detecção imunológica de vírus e micoplasmas em plantas, sugerindo a sua utilização como um rápido e sensível método para diagnóstico. No presente trabalho, a utilização da técnica de impressão de tecidos associada à imunodeteção da proteína capsidial com antissoro homólogo possibilitou, não só o diagnóstico, como também o estudo da localização do VLC nos tecidos de plantas de couve infectadas. A presença do VLC, tanto em pecíolo como em folhas e nervuras, foi detectada em praticamente todos os tecidos excetuando-se os tecidos dos vasos condutores onde praticamente não houve reação com o antissoro. Apesar de haver uma ampla distribuição entre os tecidos, não se verificou uma distribuição regular e homogênea entre as células destes tecidos nas plantas infectadas. A presença do VLC nas duas epidermes (adaxial e abaxial) e parênquima (palicádico e lacunoso) e sua ausência nos vasos condutores pode ser observada nas Figuras 12 e 13. Estes resultados estão em concordância com CHRISTIE & EDWARDSON (1977) que, através de microscopia eletrônica, verificaram a presença de vários carlavirus em células epidérmicas e do mesófilo. KITAJIMA *et al.* (1970) observaram, ao microscópio eletrônico, a presença de agregados de partículas do VLC com maior frequência no parênquima lacunoso e palicádico do que na epiderme e no parênquima vascular. Esta pequena divergência quanto à distribuição do VLC na epiderme pode ser devido ao fato de que, em microscopia eletrônica, a área que é observada é muito menor do que aquela vista na impressão de tecidos. Esses autores também não observaram partículas do VLC no interior dos vasos crivados ou lenhosos o que demonstra a sensibilidade da técnica de impressão de tecidos para a imunolocalização de vírus em diferentes órgãos da planta. Para uma inequívoca demonstração da validade da técnica de imunolocalização



associada ao método de impressão de tecidos, foram utilizados os resultados de uma imunolocalização do vírus do enrolamento da folha da batata em pecíolos de planta infectada com antissoro homólogo. Este vírus é sabidamente restrito ao floema (ROCHOW & DUFFUS, 1981). Na Figura 14, pode-se verificar a especificidade da reação serológica que evidencia marcação apenas sobre células associadas ao floema.

3. A massa molecular da proteína capsidial do vírus latente da couve, determinada em SDS-PAGE, é 38 kDa.
4. A presença de polipeptídeos adicionais na preparação purificada e estocada em geladeira é devida à degradação da proteína capsidial do vírus latente da couve por, pelo menos, uma serino-protease.
5. A adição de Fluoreto de fenilmetil sulfonila (PMSF) 10 mM em todos os tampões utilizados durante o processo de purificação do VLC inibiu, em larga escala, a atividade de proteases contaminantes.
6. O vírus latente da couve não é serologicamente relacionado aos carbovírus: "cowpea mild mottle virus", "red clover vein mosaic virus", "potato S virus" e "carnation latent virus".
7. O vírus latente da couve possui ampla distribuição pelos tecidos do pecíolo e folha de couve infectada, excetuando-se o tecido xilemático.

6. CONCLUSÕES

1. O método de purificação utilizado permitiu a purificação do vírus latente da couve em concentrações satisfatórias para estudos bioquímicos e moleculares.
2. A utilização de precipitação dupla com polietilenoglicol reduziu a presença de contaminantes na preparação purificada.
3. A massa molecular da proteína capsidial do vírus latente da couve, determinada em SDS-PAGE, é 38 kDa.
4. A presença de polipeptídeos adicionais na preparação purificada e estocada em geladeira é devida à degradação da proteína capsidial do vírus latente da couve por, pelo menos, uma serino-protease.
5. A adição de Fluoreto de fenilmetil sulfonila (PMSF) 10 mM em todos os tampões utilizados durante o processo de purificação do VLC inibiu, em larga escala, a atividade de proteases contaminantes.
6. O vírus latente da couve não é serologicamente relacionado aos carlavirus: "cowpea mild mottle virus", "red clover vein mosaic virus", "potato S virus" e "carnation latent virus".
7. O vírus latente da couve possui ampla distribuição pelos tecidos do pecíolo e folha de couve infectada, excetuando-se o tecido xilemático.



7. RESUMO

O vírus latente da couve (VLC) foi purificado a partir de folhas infectadas de couve (*Brassica oleracea* L. var *acephala*) produzindo preparações de bom grau de pureza e concentrações de 7 mg/Kg de tecido de planta infectada.

Através do método de eletroforese SDS-PAGE foi possível determinar a massa molecular da proteína capsidial (38 kDa) assim como de seus principais produtos de degradação (36 kDa e 26 kDa). Observou-se que as preparações do vírus purificado quando submetidas a estocagem a 4°C sofrem degradação progressiva, originando peptídeos de menor massa molecular que são serologicamente relacionados a proteína capsidial. Essa degradação provavelmente ocorre pela ação de proteases, que possivelmente atuam sobre as subunidades proteicas constituintes de partículas virais inteiras. A utilização de fluoreto de fenilmetil sulfonila (PMSF) 10 mM (inibidor de serino-proteases) durante todas as etapas de purificação e estocagem inibiu o aparecimento de produtos de degradação, indicando que as proteases responsáveis pela degradação provavelmente são serino-proteases.

Diferentes concentrações de SDS e 2-ME assim como a presença de uréia, não alteraram o comportamento de migração da proteína capsidial no gel de poliacrilamida, tanto para purificações obtidas com o uso de PMSF como as obtidas sem o uso desse inibidor de protease.

O VLC, quando usado como antígeno, apresentou reação serológica positiva apenas para o antissoro homólogo, não reagindo com antissoros para outros carlavirus testados (vírus do mosqueado fraco do caupi, vírus do mosaico da nervura do trevo vermelho, vírus S da batata e vírus latente do cravo) independente do estado conformacional da proteína capsidial seja nativo ou desnaturado.

Através de técnica de imunolocalização aliada a impressão de tecidos foi possível detectar a presença de VLC em vários tecidos de pecíolo e folha demonstrando sua ampla distribuição nos tecidos de planta infectada excetuando-se os tecidos dos vasos

condutores onde não foi verificada reação serológica. Verificou-se que o VLC não apresenta distribuição regular entre as células dos diversos tecidos infectados.

Cole latent virus (CoLV) was purified from infected cole leaves (*Brassica oleracea* L. var *capitata*) and yielded preparations with a good degree of purity and concentration of 7 mg/Kg of infected tissue.

Using the SDS-PAGE electrophoresis method, it was possible to determine the molecular mass of the coat protein (38 kDa) as well as its principal degradation products (36 kDa e 26 kDa). It was observed that purified viral preparations undergo progressive degradation when stored at 4° C, which results in peptides of lower molecular mass which are serologically related to the coat protein. This degradation probably occurs through the action of proteases which possibly act on protein subunits which make up the virus. The use of 10 mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF) (serine-proteases inhibitor) during all steps of purification and storage inhibited the appearance of degradation products. This is an indication that the proteases responsible for the degradation products are probably serine proteases.

Different concentrations of SDS e 2-ME, as well as the presence of urea, did not alter the migration behavior of the coat protein, in polyacrylamide gel, for both purification obtained with and without the use of PMSF.

The CoLV, when used as antigen, showed a positive serological reaction only for the homologous antiserum, not reacting with antisera for the other carlavirus tested (cowpea mild mottle virus, red clover vein mosaic virus, potato S virus and carnation latent virus) independent of the conformation state of the protein, whether native or denatured.

By the use of the technique of immunolocalization allied with tissue printing, it was possible to detect the presence of CoLV in several tissues of the petiole and leaf blade. The virus was widely distributed in the tissues of the infected plant with the exception of the vascular tissue where no serological reaction was detected. It was determined that CoLV does not show a regular distribution in the cells of the different infected tissues.

8. SUMMARY

Cole latent virus (CoLV) was purified from infected cole leaves (*Brassica oleracea* L. var *acephala*) and yielded preparations with a good degree of purity and concentration of 7 mg/Kg of infected tissue.

Using the SDS-PAGE electrophoresis method, it was possible to determine the molecular mass of the coat protein (38 kDa) as well as its principal degradation products (36 kDa e 26 kDa). It was observed that purified viral preparations undergo progressive degradation when stored at 4° C, which results in peptides of lower molecular mass which are serologically related to the coat protein. This degradation probably occurs through the action of proteases which possibly act on proteic subunits which make up the virus. The use of 10 mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF) (serine-proteases inhibitor) during all steps of purification and storage inhibited the appearance of degradation products. This is an indication that the proteases responsible for the degradation products are probably serine proteases.

Different concentrations of SDS e 2-ME, as well as the presence of urea, did not alter the migration behavior of the coat protein, in polyacrylamide gel, for both purification obtained with and without the use of PMSF.

The CoLV, when used as antigen, showed a positive serological reaction only for the homologous antiserum, not reacting with antisera for the other carlavirus tested (cowpea mild mottle virus, red clover vein mosaic virus, potato S virus and carnation latent virus) independent of the conformation state of the protein, whether native or denatured.

By the use of the technique of immunolocalization allied with tissue printing, it was possible to detect the presence of CoLV in several tissues of the petiole and leaf blade. The virus was widely distributed in the tissues of the infected plant with the exception of the vascular tissue where no serological reaction was detected. It was determined that CoLV does not show a regular distribution in the cells of the different infected tissues.

9. LITERATURA CITADA

- ADAMS, A. N., BARBARA, D. J. Host range, purification and some properties of hop mosaic virus. **Ann. Appl. Biol.**, v. 96, p. 201-208, 1980.
- ALLEN, T. C. Lily symptomless virus. **CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses**. n. 96, p. 1-4, 1972.
- ATKINSON, M. A., COOPER, J. I. Ultrastructural changes in leaf cells of poplar naturally infected with poplar mosaic virus. **Ann. Appl. Biol.**, v. 83, p. 395-398, 1976.
- BAGNALL, R. H., LARSON, R. H., WALKER, J. C. Potato viruses M, S, and X in relation to interveinal mosaic of the Irish Cobbler variety. **Res. Bull.** [University of Wisconsin], n. 198, p. 45, 1956.
- BAGNALL, R. H., WETTER, C., LARSON, R. H. Differential host and serological relationships of potato virus M, potato virus S, and carnation latent virus¹. **Phytopathology**, v. 49, p. 435-442, 1959.
- BIDDLE, P. G., TINSLEY, T. W. Poplar mosaic virus. **CMI/ AAB Descriptions of Plant viruses**, n. 75, p. 1-4, 1971.
- BOCCARDO, G., MILNE, R. G. Poplar mosaic virus: electron microscopy and polyacrylamide gel analysis. **Phytopathol. Z.**, v. 87, p. 120-131, 1976.
- BOS, L., RUBIO-HUERTOS, M. Intracellular accumulation of passiflora latent virus in *Chenopodium quinoa*. **Neth. J. Plant Pathol.**, v. 77, p. 145-154, 1971.
- BOS, L., RUBIO-HUERTOS, M. Light and electron microscopy of pea streak virus in crude sap and tissues of pea (*Pisum sativum*). **Neth. J. Plant Pathol.**, v. 78, p. 247-257, 1972.
- BRANDES, J., BERCKS, R. Gross morphology and serology as a basis for classification of elongated plant viruses. **Adv. Virus Res.**, v. 11, p. 1-24, 1965.

- BRUNT, A. A. Some hosts and properties of narcissus latent virus, a carlavirus commonly infecting narcissus and bulbous iris. **Ann. Appl. Biol.**, v. 87, p. 355-364, 1977.
- BRUNT, A. A., KENTEN, R. H. Cowpea mild mottle, a newly recognized virus infecting cowpea (*Vigna unguiculata*) in Ghana. **Ann. Appl. Biol.**, v. 74, p. 67-74, 1973.
- BRUNT, A. A., STACE-SMITH, R., LEUNG, E. Cytological evidence supporting the inclusion of poplar mosaic virus in the carlavirus group of plant viruses. **Intervirology**, v. 7, p. 303-308, 1976.
- BRUNT, A. A., ATKEY, P. T., WOODS, R. D. Intracellular occurrence of cowpea mild mottle virus in two unrelated plant species. **Intervirology**, v. 20, p. 137-142, 1983.
- CASSAB, G. I., VARNER, J. E. Immunocytochemical localization of extensin in developing soybean seed coats by immunogold-silver staining and by tissue printing on nitrocellulose paper. **J. Cell Biol.**, v. 105, p. 2581-2588, 1987.
- CAVILEER, T. D., HALPERN, B. T., LAWRENCE, D. M., PODLECKIS, E. V., MARTIN, R. R., HILLMAN, B. I. Nucleotide sequence of the carlavirus associated with blueberry scorch and similar diseases. **J. Gen. Virol.**, v. 75, p. 711-720, 1994.
- CERON, C. R., SANTOS, J. R., BICUDO, H. E. M. C. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in a embroidering hoop. **Rev. Bras. Genet.**, v. 15, p. 201-203, 1992.
- CHRISTIE, R. G., EDWARDSON, J. R. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. **Fla. Agric. Exp. Stn. Monogr.**, n 9, p. 150, 1977.
- CHU, P. W. G., FRANCKI, R. I. B. Chemical and serological comparison of the coat proteins of velvet tobacco mottle and *Solanum nodiflorum* mottle viruses. **Virology**, v. 129, p. 350-356, 1983.
- COSTA, A. S., KITAJIMA, E. W., COSTA, C. L., NAGAI, H. A couve-comum como fonte de três virus que afetam crucíferas. **Rev. de Olericult.**, v. 12, p. 82, 1972.



- COSTA, C. L., CUPERTINO, F., KITAJIMA, E. W., MATTOS, J. K. A. Occurrence of viruses in cruciferous and compositae crops at Federal District. **Fitopatol.**, v. 9, p. 49, 1974.
- COSTA, A. S., GASPAR, J. O., VEGA, J. Mosaico angular do feijoeiro Jalo causado por um vírus do grupo S transmitido por mosca branca. In: **I Seminário sobre pragas e doenças do feijoeiro**. Instituto Biológico, Campinas, SP. 1980.
- COSTA, A. S., GASPAR, J. O., VEGA, J. Mosaico angular do Feijoeiro Jalo causado por um "carlavírus" transmitido pela mosca branca *Bemisia tabaci*. **Fitopatol. Bras.**, v. 8, p. 325-337, 1983.
- DE BOKX, J. A., WATERREUS, H. A. J. I. Electron microscopy of plant tissues infected with potato viruses A and S. **Neth. J. Plant Pathol.**, v. 77, p.106-112, 1971.
- DIETZGEN, R. G., FRANCKI, R. I. B. Nonspecific binding of immunoglobulins to coat proteins of certain plant viruses in immunoblots and indirect ELISA. **J. Virol. Methods**, v. 15, p.159-164, 1987.
- FOSTER, G. D. The structure and expression of genome of carlaviruses. **Res. Virol.**, v. 143, p. 103-112, 1992.
- FOSTER, G. D., MILLS, P. R. Investigation of the 5' terminal structures of genomic and subgenomic RNAs of potato virus S. **Virus Genes**, v. 4, p. 359-366, 1990a.
- FOSTER, G. D., MILLS, P. R. Evidence for the role of subgenomic RNAs in the production of potato virus S coat protein during *in vitro* translation. **J. Gen. Virol.**, v.71, p. 1247-1249, 1990b.
- FOSTER, G. D., MILLS, P. R. Evidence for the role of subgenomic RNA species in the production of *Helenium* virus S coat protein during *in vitro* translation. **Virus Res.**, v.17, p. 61-70, 1990c.
- FOSTER, G. D., MILLS, P. R. Analysis of the coat proteins of the ordinary and andean strains of potato virus S and antigenic comparisons of carlaviruses. **Acta Virol.**, v. 35, p. 184-190, 1991a.

- FOSTER, G. D., MILLS, P. R. Cell- free translation of american hop latent virus. **Virus Genes**, v. 5, p. 327-334, 1991b.
- FOSTER, G. D., MILLS, P. R. Evidence for subgenomic RNAs in leaves infected with an andean strain of potato virus S. **Acta Virol.**, v. 35, p. 260-267, 1991c.
- FOSTER, G. D., MILLS, P. R. Occurrence of chloroplast ribosome recognition sites within conserved elements of the RNA genomes of carlaviruses. **FEBS Lett.**, v. 280, p. 341-343, 1991d.
- FOSTER, G. D., MILLS, P. R. The 3' nucleotide sequence of an ordinary strain of potato virus S. **Virus Genes**, v. 6, p. 213-220, 1992.
- FOSTER, G. D., MEEHAN, B. M., MILLAR, A. W., MILLS, P. R. Nucleotide sequence of the 3'-terminal region of *Helenium* virus S RNA. **J. Gen. Virol.**, v. 71, p. 1877-1880, 1990a.
- FOSTER, G. D., MEEHAN, B. M., MILLS, P. R. Nucleotide sequence of the 7K gene of carnation latent virus. **Plant Mol. Biol.**, v. 15, p. 937-939, 1990b.
- GASPAR, J. O., COSTA, A. S. Vírus do mosaico angular do feijoeiro: purificação e ultraestrutura dos tecidos infectados. **Fitopatol. Bras.**, v. 18, p. 534-540, 1993.
- GASPAR, J. O., BERIAM, L. O. S., ALVES, M. N., OLIVEIRA, A. R., COSTA, A. S. Serological identity of bean angular mosaic and cowpea mild mottle viruses. **Fitopatol. Bras.**, v. 10, p. 195-199, 1985.
- GIBBS, A. J., HARRISON, B. D. **Plant virology: the principles**. London: Edward Arnold, 1976. 292p.
- GOODMAN, R. M. Reconstitution of potato virus X *in vitro*. I. Properties of the dissociated protein structural subunits. **Virology**, v. 68, p. 287-298, 1975.
- GRAMSTAT, A., COURTPOZANIS, A., RHODE, W. The 12 kDa protein of potato virus M displays properties of a nucleic acid-binding regulatory protein. **FEBS Lett.**, v. 276, p. 34-38, 1990.



- HAGEDORN, D. J., HANSON, E. W. A comparative study of the viruses causing Wisconsin pea stunt and red clover vein mosaic. **Phytopathology**, v. 41, p. 813-819, 1951.
- HARRISON, B. D., FINCH, J. T., GIBBS, A. J., HOLLINGS, M., SHEPHERD, R. J., VALENTA, V., WETTER, C. Sixteen groups of plant viruses. **Virology**, v. 45, p. 356-363, 1971.
- HAYLOR, M. T. M., BRUNT, A. A., COUTTS, R. H. A. Conservation of the 3' terminal nucleotide sequence in five carlaviruses. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, p. 6127, 1990.
- HEARON, S. S. A carlavirus from *Kalanchoe blossfeldiana*. **Phytopathology**, v. 72, p. 838-844, 1982.
- HENDERSON, J., GIBBS, M. J., EDWARDS, M. L., CLARKE, V. A., GARDNER, K. A., COOPER, J. I. Partial nucleotide sequence of poplar mosaic virus RNA confirms its classification as a carlavirus. **J. Gen. Virol.**, v. 73, p. 1887-1890, 1992.
- HIRUKI, C., SHUKLA, P. Intracellular location of potato virus S in leaf tissue of *Chenopodium quinoa*. **Can. J. Bot.**, v. 51, p. 1699-1702, 1973.
- HIRUKI, C., TU, J. C. Light and electron microscopy of potato virus M lesions and marginal tissue in red kidney bean. **Phytopathology**, v. 62, p. 77-85, 1972.
- HOLLINGS, M. Investigation of *Chrysanthemum* viruses. II. Virus B (mild mosaic) and *Chrysanthemum* latent virus. **Ann. Appl. Biol.**, v. 45, p. 589-602, 1957.
- HOLLINGS, M. Chrysanthemum virus B. **CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses.**, n 110, 1972.
- HSU, H. T., KIM, J. Y., LAWSON, R. H. Purification of lily symptomless carlavirus and detection of the virus in lilies. **Plant Dis.**, v. 79, p. 912-916, 1995.
- IWAKI, M., THONGMEEARKON, P., PROMMIN, M., HONDA, Y., HIBI, T. Whitefly transmission and some properties of cowpea mild mottle virus on soybean in Thailand. **Plant Dis.**, v. 66, p. 365-368, 1982.

- JEYANANDARAJAH, P., BRUNT, A. A. The natural occurrence, transmission, properties and possible affinities of cowpea mild mottle virus. **J. Phytopathol.**, v. 137, p. 148-156, 1993.
- JOHNS, L. J. Purification and partial characterization of a carlavirus from *Taraxacum officinale*. **Phytopathology**, v. 72, p. 1239-1242, 1982.
- KASSANIS, B. Some properties of four viruses isolated from carnation plants. **Ann. App. Biol.**, v. 43, p. 103-113, 1955.
- KITAJIMA, E. W., COSTA, A. S. Rhabdovirus- like particles in tissues of five different plant species. **Fitopatol. Bras.**, v. 4, p. 55-62, 1979.
- KITAJIMA, E. W., CAMARGO, I. J. B., COSTA, A. S. Morfologia e aspectos intracelulares do vírus latente da couve. **Bragantia**, v. 29, p. 181-190, 1970.
- KITAJIMA, E. W., OLIVEIRA, A. R., COSTA, A. S. Ocorrência de vírus esférico causando faixa amarela das nervuras da couve em São Paulo. **Bragantia**, v. 24, p. 219-229, 1965.
- KOENIG, R. Carlavirus group. **CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses**, n 259, p. 1-4, 1982.
- KOENIG, R., TREMAINE, J. H., SHEPARD, J. F. *In situ* degradation of the protein chain of potato virus X at the N- and C- termini. **J. Gen. Virol.**, v. 38, p. 329-337, 1978.
- KOENIG, R., LESEMAN, D. E., LOCKHART, B., BETZOLD, J. A., WEIDEMANN, H. L. Natural occurrence of *Helenium Virus S* in *Impatiens holstii*. **Phytopathol. Z.**, v. 106, p. 133-140. 1983.
- KOONIN, E. V., DOLJA, V. V. Evolution and taxonomy of positive strand RNA viruses implications of comparative analysis of amino acids sequences. **Crit. Rev. Bioch. Mol. Biol.**, v. 28, p. 375-430, 1993.
- KUSCHKI, G. H., KOENIG, R., DUVEL, D., KUHNE, H. *Helenium virus S* and *Y*- two new viruses from commercially grown *Helenium* hybrids. **Phytopathology**, v. 68, p. 1407-1411, 1978.

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAWRENCE, D. M., HILLMAN, B. I. Synthesis of infectious transcripts of blueberry scorch carlavirus *in vitro*. **J. Gen. Virol.**, v. 75, p. 2509-2512, 1994.
- LEVAY, K., ZAVRIEV, S. Nucleotide sequence and gene organization of the 3'-terminal region of chrysanthemum virus B genomic RNA. **J. Gen. Virol.**, v. 72, p. 2333-2337, 1991.
- LIN, N. S., HSU, Y. H., HSU, H. T. Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. **Phytopathology**, v. 80, p. 824-827, 1990.
- LUISONI, E., BOCCARDO, G., MILNE, R. G. Purification and some properties of an italian isolate of poplar mosaic virus. **Phytopathol. Z.**, v. 85, p. 65-73, 1976.
- MACKENZIE, D. J., TREMAINE, J. H., STACE-SMITH, R. Organization and intervirial homologies of the 3'-terminal portion of potato virus S RNA. **J. Gen. Virol.**, v. 70, p. 1053-1063, 1989.
- MATTHEWS, R. E. F. Classification and nomenclature of viruses. Third Report of the International Committee on Taxonomy of viruses. **Intervirology**, v. 12, p. 129-296, 1979.
- MEEHAN, B. M., MILLS, P. R. Nucleotide sequence of the 3' terminal region of carnation latent virus. **Intervirology**, v. 32, p. 262-267, 1991.
- MELLO, S. C. M. **Caracterização do vírus latente da couve**. Brasília, 1981. 55p. Tese (Mestrado em Ciências-Fitopatologia) -Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.
- MEMELINK, J., VAN DER VLUGT, C. I. M., LINTHORST, H. J. M., DERKS, A. F. L. M., ASJES, C. J., BOL, J. F. Homologies between the genomes of a carlavirus (lily symptomless virus) and a potexvirus (lily virus X) from lily plants. **J. Gen. Virol.**, v. 71, p. 917-924, 1990.

- MOROZOV, S. Y., KANYUKA, K. V., LEVAY, K. E., ZAVRIEV, S. K. The putative RNA replicase of potato virus M: Obvious sequence similarity with Potex- and Tymoviruses. **Virology**, v. 179, p. 911-914, 1990a.
- MOROZOV, S. Y., MIROSHNICHENKO, N. A., ZELENINA, D. A., FEDORKIN, O. N., SOLOVYEV, A. G., LUKASHEVA, L. I., ATABEKOV, J. C. Expression of RNA transcriptions of potato virus X full-length and subgenomic cDNAs. **Biochimie**, v. 72, p. 677-684, 1990b.
- NAGAKUBO, T., KUBO, M., OEDA, K. Nucleotide sequences of the 3' regions of two major viruses from mosaic-diseased garlic: Molecular evidence of mixed infection by a Potyvirus and a Carlavirus. **Phytopathology**, v. 84, p. 640-645, 1994.
- PAUL, H. L. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of virion proteins as a tool for detecting the presence of virus in plants. **Phytopath. Z.**, v. 80, p. 330-339, 1974.
- PAUL, H. L., WETTER, C. Untersuchungen am carnation latent virus. 1. preparation, physikalische und chemische Eigenschaften. **Phytopath. Z.**, v. 49, p. 401-406, 1964.
- PROLL, E., LEISER, R. M., OSTERMANN, W. D., SPAAR, D. Some physicochemical properties of potato virus M. **Potato Res.**, v. 24, p. 1-10, 1981.
- ROCHOW, W. F., DUFFUS, J. Luteoviruses and yellows diseases. In: KURSTAK E. (Ed.) **Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis**. Amsterdam: Elsevier, North Holland Biomedical Press, 1981. p. 147-170.
- ROZANOV, M. N., KOONIN, E. V., GORBALENYA, A. E. Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the "Sindbis-like" supergroup of positive-strand RNA viruses. **J. Gen. Virol.**, v. 73, p. 2129-2134, 1992.
- RUBIO-HUERTOS, M., BOS, L. Light and electron microscopy of red clover vein mosaic virus in pea (*Pisum sativum*). **Neth. J. Plant Pathol.**, v. 79, p. 94-103, 1973.

- RUPAZOV, V. V., MOROZOV, S. Y., KANYUKA, K. V., ZAVRIEV, S. K. Partial nucleotide sequence of potato virus M RNA shows similarities to potexvirus in gene arrangement and the encoded amino acid sequences. **J. Gen. Virol.**, v. 70, p. 1861-1869, 1989.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 3v.
- SCHULTZ, E. S., FOLSOM, D. Transmission, variation, and control of certain degeneration diseases of Irish potatoes. **J. Agric. Res.**, v. 25, p. 43-117, 1923.
- SHINE, J., DALGARNO, L. Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. **Nature**, v. 254, p. 34-38, 1975.
- TAVANTZIS, S. M. Physicochemical properties of potato virus M. **Virology**, v. 133, p. 427-430, 1984.
- TAVANTZIS, S. M. Coat protein and protease activity as *in vitro* translation products of potato carlavirus M RNA. **Arch. Virol.**, v. 120, p. 241-252, 1991.
- THONGMEEARKOM, P., HONDA, Y., IWAKI, M., DEEMA, N. Ultrastructure of soybean leaf cells infected with cowpea mild mottle virus. **Phytopathol. Z.**, v. 109, p. 74-79, 1984.
- TREMAINE, J. H., AGRAWAL, H. O. Limited proteolysis of potato virus X by tripsin and plant proteases. **Virology**, v. 49, p. 735-744, 1972.
- TU, J. C., HIRUKI, C. Ultrastructure of potato infected with potato virus M. **Virology**, v. 42, p. 238-242, 1970.
- TU, J. C., HIRUKI, C. Electron microscopy of cell wall thickening in local lesions of potato virus M infected red kidney bean. **Phytopathology**, v. 61, p. 862-868, 1971.



- TUNG, J. S., KNIGHT, C. A. The coat protein subunits of potato virus X and white clover mosaic virus, a comparison of methods for determining their molecular weights and some *in situ* degradation products of potato virus X protein. **Virology**, v. 49, p. 214-223, 1972.
- TURNER, R. L., MILLS, P. R., FOSTER, G. D. Nucleotide sequence of the 7 K gene of *Helenium* virus S. **Acta Virol.**, v. 37, p. 523-528, 1993.
- VAN LENT, J. W. M., WIT, A. J., DIKSTRA, J. Characterization of a carlavirus in eldeberry (*Sambucus* spp.). **Neth. J. Plant Pathol.**, v. 86, p. 117-134, 1980.
- VARMA, A. (1970) Red clover vein mosaic virus. **CMI/ABB Descriptions of Plant Viruses**, n 22, p. 1-4, 1970.
- VARMA, A., GIBBS, A. J., WOODS, R. D., FINCH, J. T. Some observations on the structure of the filamentous particles of several plant viruses. **J. Gen. Virol.**, v. 2, p. 107-114, 1968.
- VEERISSETTY, V., BRAKKE, M. K. Differentiation of legumes carlavirus based on their biochemical properties. **Virology**, v. 83, p. 226-231, 1977a.
- VEERISSETTY, V., BRAKKE, M. K. Alfafa latent virus, a naturally occurring carlavirus in alfafa. **Phytopathology**, v. 67, p. 1202-1206, 1977b.
- VEERISSETTY, V., BRAKKE, M. K. Purification of some legume carlaviruses. **Phytopathology**, v. 68, p. 59-64, 1978.
- WETTER, C., MILNE, R. G. Carlaviruses. In: KURSTAK E. (Ed) **Handbook of plant virus infections comparative diagnosis**. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press. 1981. p. 695-730
- ZAVRIEV, S. K., KANYUKA, K. V., LEVAY, K. E. The genome organization of potato virus M RNA. **J. Gen. Virol.**, v. 72, p. 9-14, 1991.



