

Luciana Márcia Espinha-de-Sant'ana

CARACTERIZAÇÃO DAS REGIÕES TERMINAIS
5' E 3' DO GENOMA DE UM ISOLADO
BRASILEIRO DO *Southern bean mosaic virus*



1910001163





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de São José do Rio Preto

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas -IBILCE

LUCIANA MÁRCIA ESPINHA-DE-SANT'ANA

**CARACTERIZAÇÃO DAS REGIÕES TERMINAIS
5' E 3' DO GENOMA DE UM ISOLADO
BRASILEIRO DO *Southern bean mosaic virus***

Tese apresentada para a obtenção do Grau de Doutor
em Genética no Curso de Pós-Graduação do Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade
Estadual Paulista-UNESP.



Orientador: Prof. Dr. José Osmar Gaspar

São José do Rio Preto

2003



LUCIANA MÁRCIA ESPINHA-DE-SANT'ANA

**CARACTERIZAÇÃO DAS REGIÕES
TERMINAIS 5' E 3' DO GENOMA DE UM
ISOLADO BRASILEIRO DO *Southern bean
mosaic virus***

Tese apresentada para obtenção
do grau de Doutor em Genética

Orientador: Prof. Dr. José Osmar Gaspar

São José do Rio Preto

2003



7581.4
E77C

50102010

Espinha-de-Sant'Ana, Luciana Márcia.

**Caracterização das regiões terminais 5' e 3' do genoma
de um isolado brasileiro do *Southern bean mosaic virus* /
Luciana Márcia Espinha-de-Sant'Ana. – São José do Rio
Preto : [s.n.], 2003**

99 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: José Osmar Gaspar

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Fitopatologia. 2. Vírus de plantas. 3. *Southern bean mosaic virus*. 4. Vírus de plantas - Biologia molecular. 5. *Sobemovirus*. 6. Sequência de nucleotídeos. 7. Fitovirologia. I. Gaspar, José Osmar. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 581.2

LUCIANA MÁRCIA ESPINHA-DE-SANT'ANA

**CARACTERIZAÇÃO DAS REGIÕES
TERMINAIS 5' E 3' DO GENOMA DE UM
ISOLADO BRASILEIRO DO *Southern bean
mosaic virus***

TESE APRESENTADA PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM GENÉTICA
COMISSÃO JULGADORA

Presidente e Orientador:

2º Examinador.....

3º Examinador.....

4º Examinador.....

5º Examinador.....

São José do Rio Preto, ____/____/____.

Dedico este trabalho:

Às meus pais, Antonio e Helena, por
todo amor e apoio dedicados em minha
formação.

Às meus filhos, João Pedro e Jília,
crianças mágicas que ressamem-me
nos momentos com suas curiosidades e
obras, que não me deixam desistir de

**O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fitovirologia,
departamento de Zoologia-Botânica, do Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (IBILCE),
Universidade Estadual Paulista (UNESP), com auxílio-bolsa da
Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
(CAPES).**

Dedico este trabalho:

**Aos meus pais, Antonio e Helena, por
todo amor e apoio dedicados em minha
formação,**

**Aos meus filhos, João Pedro e Júlia,
criaturas mágicas que recompõem-me
num instante com suas palavrinhas e
olhares, que não me deixam desistir de
sonhar e que me impulsionam a
continuar.**

**Ao Francisco, pelo apoio, amor e
carinho,**

Dedico

Ao meu orientador
Prof. Dr. José Osmar Gaspar,
pelo convívio amigo, dedicação e
entusiasmo com que me orientou
desde o primeiro ano de
graduação, intensificando em mim
o amor pela ciência e pesquisa,

O meu muito
especial obrigado e minha eterna
gratidão.

**"Mestre, faz perdurável a minha paixão
e passageiro meu desencanto"**

Gabriela Mistral

AGRADECIMENTOS

Após esses 48 meses de trabalho, é difícil criar uma lista contendo todas as pessoas que me apoiaram e contribuíram direta e indiretamente para o desenvolvimento dessa tese e para o meu crescimento. Por isso, eu gostaria de me desculpar pelos nomes que omiti neste espaço e expresso minha eterna gratidão a todos que de alguma forma estiveram presentes neste tempo de aprendizado.

Agradeço em especial, ao Prof. Dr. **José Osmar Gaspar**, amigo e grande pesquisador, meu agradecimento pela orientação segura, dedicação, confiança, incentivo e apoio nestes 10 anos que tive o privilégio de trabalhar sob sua orientação, que muito contribuíram para a minha formação científica e que enriqueceram-me como pessoa e como profissional.

Aos professores e professoras Dra. **Paula Rahal Liberatore**, Dra. **Claudia Regina Bonini Domingos**, Dr. **Jorge Alberto Marques Rezende** e Dr. **Richard Ward** pela análise da pró-forma e valiosas sugestões que contribuíram para aprimorar esta tese.

Às professoras Dra. **Paula Rahal Liberatore** e Dra. **Heloísa Helena Tajara da Silva** (IBILCE) e ao professor Dr. **Luís Eduardo Aranha Camargo** (ESALQ-USP) pela facilidade de acesso ao laboratório e uso de equipamentos.

Ao professor **Richard Ward** e ao **Roberto Ruller** pela colaboração em algumas partes deste trabalho.

Ao professor Dr. **Petter J. Harris** pela colaboração na correção do Abstract.

À direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto-SP, pelo fornecimento de recursos materiais.

À coordenadora do Curso de Pós-graduação, Profa. Dra. **Ana Elizabete Silva** pelo auxílio quanto aos problemas burocráticos.

Aos professores dos cursos de Pós-graduação em Genética e de Graduação em Ciências Biológicas, pelos ensinamentos que muito contribuíram para meu crescimento acadêmico. Em especial à **Arif Cais**, **Carlos Roberto Ceron**, **Cláudia**



Márcia Aparecida Carareto, Gustavo Orlando Bonilla Rodrigues, Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, Marlene Kiyoni Hosaki Kobayashi, Mary Massumi Itoyama, Maria Tercília Vilela de Azevedo Oliveira, Roberto da Silva, Sebastião Taboga e Wladimir João Tadei, pela amizade, incentivo e disponibilidade para ajudar sempre que precisei.

À todos os funcionários e técnicos dos departamentos de Zoologia-Botânica, Biologia e Física, Biblioteca, Seção de Pós Graduação e Ambulatório, principalmente à **Maria Helena Carabolante, Izabelino Fávaro, Josué Rodrigues dos Santos, Kikue Kamoi de Oliveira, Maria do Carmo Junqueira, Nanci Queiroz de A. Pereira, Oscar José Marques, Rosana Miguel Gomes Ferro, Rosana Silistino de Souza e Regiane Peres**.

À **Daniela Truffi e Giovana Camarotte**, técnicas do laboratório de Biologia Molecular (ESALQ/USP).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado.

À **Juliana Polachini de Castro** pelo auxílio nas análises filogenéticas e, também pela amizade.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação, cujos nomes seriam demasiados e muitos os predcados, pelo convívio maravilhoso, companheirismo e alegria em tê-los como incentivadores constantes.

Às inesquecíveis amigas do laboratório de Fitovirologia: **Ana Cecília Bergamim Pereira, Ana Cláudia Maritan, Andréia Estela Moreira, Livia J. Regatieri e Priscila Belintani** com quem passei grande parte de todo este tempo. Obrigada por sempre poder desabafar e contar com vocês, minhas amigas.

À minha irmã **Susana** e meu sobrinho **Carlos Alberto** pelo carinho e apoio, mesmo distantes.

Os maiores agradecimentos aos meus pais, **Antonio e Helena**, principais responsáveis pela minha realização, que merecem minha eterna gratidão pelo amor, carinho e por tudo o que fizeram para que eu chegasse até aqui.



Ao meu esposo e companheiro **Francisco**, pelo amor, incentivo, compreensão e paciência. Obrigada principalmente por sempre me fazer pensar que, mesmo com essa vida agitada que temos, poderíamos realizar nossos sonhos (João Pedro e Júlia) sem termos que esperar alguns anos.

Ao meu filho **João Pedro**, que mesmo sem perceber contribuiu para o cumprimento de mais uma etapa importante da minha vida. Ter te trazido para a faculdade com dois meses de idade, não foi loucura como alguns dizem, foi sim uma maneira de te ter sempre por perto, de poder amamentá-lo até um ano, me fazendo sentir melhor, pois não poderia deixá-lo tão pequenino e te ver somente à noite.

À minha pequena **Júlia** que também me acompanhou no final desta etapa, seja no meu ventre ou com apenas alguns dias, me dando mais força e motivação.

João Pedro e Júlia, vocês me mostraram o que é felicidade. Vocês me transmitem paz.

À **Elis**, que cuidou tão bem dos meus filhos, enquanto eu trabalhava, não tenho palavras para agradecer toda a sua dedicação.

À Deus, por tudo e por mais um ideal alcançado.

Muito obrigada!!

Só se vê bem com o coração

O essencial é invisível para os olhos.

-Saint-Exupéry

Agradeco

A Deus por ter permitido eu traçar este caminho

Que tanto gosto...

E espero continuar caminhando nesta estrada.



Um dia aprendi a diferença entre ser e ter

Aprendi que, por pior que seja um problema ou uma situação, sempre existe uma saída.

Aprendi que é bobagem fugir das dificuldades. Mais cedo ou mais tarde, será preciso tirar as pedras do caminho para conseguir avançar.

Aprendi que, perdemos tempo nos preocupando com fatos que muitas vezes só existem na nossa mente.

Aprendi que, é necessário um dia de chuva, para dar valor ao Sol. Mas se ficar exposto muito tempo, o Sol queima.

Aprendi que, heróis não são aqueles que realizaram obras notáveis. Mas os que fizeram o que foi necessário e assumiram as conseqüências dos seus atos.

Aprendi que, não vale a pena se tornar indiferente ao mundo e às pessoas. Vale menos a pena, ainda, fazer coisas para conquistar migalhas de atenção.

Aprendi que, não importa em quantos pedaços meu coração já foi partido. O mundo nunca parou para que eu pudesse consertá-lo.

Aprendi que, ao invés de ficar esperando alguém me trazer flores, é melhor plantar um jardim.

Aprendi que, amar não significa transferir aos outros a responsabilidade de me fazerem feliz. Cabe a mim a tarefa de apostar nos meus talentos e realizar os meus sonhos.

Aprendi que, o que faz diferença não é o que tenho na vida, mas quem eu tenho. E que, boa família são os amigos que escolhi.

Aprendi que, as pessoas mais queridas podem às vezes me ferir. E talvez não me amem tanto quanto eu gostaria, o que não significa que não me amem muito, talvez seja o Máximo que conseguem. Isso é o mais importante.

Aprendi que, toda mudança inicia um ciclo de construção. Se você não se esquecer de deixar a porta aberta. Aprendi que, o tempo é muito precioso e não volta atrás. Por isso, não vale a pena resgatar o passado.

O que vale a pena é construir o futuro. O meu futuro ainda está por vir.

Foi, então, que aprendi que, devemos descruzar os braços, vencer o medo de tentar partir atrás dos sonhos.

Autor desconhecido

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	14
II. OBJETIVOS.....	16
III. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1. Propriedades Biológicas.....	16
2. Propriedades da partícula viral.....	24
3. Organização do Genoma	27
4. Ultraestrutura Celular.....	35
O <i>Southern bean mosaic virus</i> no Brasil.....	39
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
1. Vírus e Planta.....	42
2. Inoculação de plantas.....	42
3. Purificação do Vírus.....	42
4. Espectrofotometria.....	43
5. Extração do RNA viral.....	44
6. Síntese do cDNA.....	44
7. Construção dos oligonucleotídeos ("primers").....	45
8. Amplificação por Reação em cadeia pela polimerase.....	46
9. Purificação do Fragmento Amplificado por PCR.....	46
10. Quantificação do DNA purificado.....	47
11. Clonagem do gene em vetor de seqüenciamento.....	47
12. Preparação de célula competente.....	48
13. Transformação em <i>Escherichia coli</i>	50
14. Extração do DNA Recombinante.....	51
15. Seqüenciamento.....	52
16. Análise Filogenética.....	52
17. Produção de sonda não radioativa.....	53
18. "Southern Blotting".....	53
19. Hibridização.....	54

20. Detecção dos Híbridos DNA-cDNA.....	55
21. Fracionamento subcelular.....	56
IV. RESULTADOS.....	57
1. Sintomatologia em <i>Phaseolus vulgaris</i> L. 'Rosinha'.....	57
2. Obtenção do vírus purificado.....	57
3. Amplificação por PCR, clonagem e seqüenciamento.....	57
4. Identificação do SBMV em frações subcelulares.....	60
V. DISCUSSÃO.....	76
VI. CONCLUSÕES.....	83
VII. RESUMO.....	84
VIII. ABSTRACT.....	85
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografia eletrônica da preparação purificada do SBMV contrastada negativamente com acetato de uranila.....	25
Figura 2. Organização genômica de alguns sobemovirus.....	31
Figura 3. Célula de folha de feijoeiro mostrando partículas do SBMV.....	37
Figura 4. Sintomatologia induzida pelo isolado brasileiro do Southern bean mosaic virus (SBMV ^{SP}) em Phaseolus vulgaris "Rosinha".....	62
Figura 5. Gel nativo de agarose 1% evidenciando o fragmento de 591 pares de bases amplificado por PCR.....	63
Figura 6. Gel nativo de agarose 1% mostrando a liberação do fragmento de 591 pb, de um clone, após a digestão dupla do vetor recombinante utilizando as enzimas de restrição Eco RI e Bam HI e "Southern blot" de um gel similar hibridizado com sonda específica para o RNA genômico do SBMV.....	64
Figura 7. Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos da região 5' terminal do SBMV ^{SP}	65
Figura 8. Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidos da possível proteína do movimento do SBMV ^{SP} e outros sobemovirus.....	66
Figura 9. Gel nativo de agarose 1% evidenciando o fragmento de 972 pares de bases amplificado por PCR.....	67
Figura 10. Gel nativo de agarose 1% mostrando a liberação do fragmento de 972 pb, de um clone, após a digestão dupla do vetor recombinante utilizando as enzimas de restrição Eco RI e Bam HI e "Southern blot" de um gel similar hibridizado com sonda específica para o RNA genômico do SBMV.....	68
Figura 11. Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos da região 3' terminal do SBMV ^{SP}	69
Figura 12. Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidos da capa proteica do SBMV ^{SP} e outros sobemovirus.....	70
Figura 13. Análise filogenética com base na seqüência completa de aminoácidos da capa proteica do SBMV ^{SP} e outros Sobemovirus.....	71
Figura 14. Pareamento de bases da região 5' não codificadora de alguns Sobemovirus.....	72
Figura 15. Alinhamento do "motivo alvo para núcleos" na seqüência de nucleotídeos do SBMV ^{SP} , SBMV ^{Ark} , SBMV, SCPMV.....	73
Figura 16. Localização subcelular do SBMV ^{SP} por centrifugação diferencial de folhas de feijoeiro infectadas.....	74

I. INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), comum leguminosa da família das Fabaceas (Leguminosae) (Cronquist, 1981), constitui uma das culturas mais importantes existentes, estando generalizada por todo o mundo, o que deve-se principalmente ao seu alto valor nutritivo. A produção mundial de feijão é da ordem de 18,9 milhões de toneladas, sendo o Brasil o segundo maior produtor do mundo (2,2 milhões de toneladas), somente superado pela Índia (4,9 milhões de toneladas). A principal região produtora de feijão no Brasil é a região sul (773,3 mil toneladas), sendo seguida pela sudeste (627,1 mil toneladas), que juntas respondem por 63% da produção do país (Ficha, 2000).

No Brasil, a cultura do feijão assume um grande valor social pois constitui a base de alimentação da população, sendo fonte de proteína vegetal de baixo custo. A dupla feijão com arroz é o prato principal na alimentação da maioria da população brasileira, especialmente a de baixa renda. Além disto, a cultura de feijão é uma importante opção econômica para o modelo de agricultura familiar (Cultura, 2000).

Na maioria das regiões produtoras predomina a exploração do feijoeiro por pequenos produtores, com uso reduzido de insumos, obtendo-se baixas produções. A produtividade da cultura é grandemente afetada pela ocorrência de doenças que diminuem sensivelmente a

produção e, conseqüentemente, reduzem sua oferta, provocando um aumento nos preços de mercado (Cultura, 2000). Estas doenças têm exercido um papel relevante na baixa produtividade de feijoeiros no Brasil e outros países latino-americanos (Jayasinghe, 1982; Costa & Costa, 1983). As mais numerosas são as ocasionadas por fungos seguindo-se as de etiologia viral, algumas tendo adquirido expressiva importância econômica (Gamez, 1977; Bianchini *et al.*, 1997).

A incompleta caracterização dos vírus e suas estirpes e as variações na sintomatologia induzida em diferentes regiões por um mesmo agente fazem com que o número exato de doenças induzidas por vírus na América Latina seja desconhecido (Jayasinghe, 1982).

No Brasil foram descritas mais de dez moléstias em feijoeiros causadas por vírus (Costa *et al.*, 1972; Costa, 1975), algumas amplamente disseminadas no país, enquanto outras aparentemente restritas a determinadas áreas (Camargo *et al.*, 1968; Costa *et al.*, 1972; Camargo *et al.*, 1976; Trindade, 1979; Kitajima *et al.*, 1980). Entre os vírus que infectam o feijoeiro no Brasil está o *Southern bean mosaic virus* (SBMV), espécie tipo do gênero *Sobemovirus* (Murphy *et al.*, 1995), o qual já foi encontrado em três regiões distintas do País: Distrito Federal (Cupertino *et al.*, 1982), São Paulo (A. S. Costa, Dados não publicados) e Paraná (Gasparin, 2002). Há, entretanto, poucos estudos feitos com esses isolados, principalmente do ponto de vista molecular.

Visando uma melhor caracterização do vírus que ocorre no Brasil, um isolado fornecido pelo Dr. A. S. Costa (Instituto Agronômico de Campinas) e mantido em feijoeiro 'Rosinha', foi estudado.

II. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral expandir o conhecimento a respeito da estrutura do genoma do isolado do *Southern bean mosaic virus* encontrado no Estado de São Paulo (SBMV^{SP}). Constituíram objetivos específicos do trabalho, a purificação das partículas virais; a transcrição reversa e a reação em cadeia da polimerase (PCR) para as regiões terminais 5' e 3' do genoma do SBMV^{SP}; a clonagem dos produtos da PCR em vetor de seqüenciamento; o seqüenciamento automatizado dos genes clonados; a análise filogenética da capa proteica viral comparada com outros sobemovirus e a localização dos RNAs virais em frações subcelulares.

III. REVISÃO DE LITERATURA

1. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

Em 1977(a), Hull recomendou o estabelecimento de um novo gênero de vírus de plantas baseado nas similaridades da massa molecular da proteína capsidial, estabilidade e coeficiente de sedimentação da partícula viral e distribuição das partículas dentro das

células. O grupo foi aceito pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) com o nome de *Sobemovirus* (sigla para ***Southern bean mosaic virus***) (Matthews, 1982).

O gênero *Sobemovirus* compreende, atualmente, onze espécies distintas: *Southern bean mosaic virus* (SBMV), *Southern cowpea mosaic virus* (SCPMV - anteriormente considerado como estirpe caupi do SBMV; SBMV-C), *Cocksfoot mottle virus* (CfMV), *Rice yellow mottle virus* (RYMV), *Blueberry shoestring virus* (BSSV), *Lucerne transient streak virus* (LTSV), *Solanum nodiflorum mottle virus* (SNMoV), *Sowbane mosaic virus* (SoMV), *Subterranean clover mottle virus* (SCMoV), *Turnip rosette virus* (TRoV) e *Velvet tobacco mottle virus* (VTMoV) (Hull et al., 2000). Estes vírus apresentam similaridades na morfologia da partícula, no modo de transmissão, na organização do genoma, no comportamento *in vivo* e nas interações com os constituintes celulares, além de possuírem gama de hospedeiras relativamente restrita, que no entanto difere para cada espécie.

Outras três espécies, *Rottboellia yellow mottle virus*, *Ryegrass mottle virus* e *Sesbania mosaic virus*, possuem características que permitiriam incluí-las no gênero *Sobemovirus*, mas, até o momento, não foram reconhecidas pelo ICTV ("International Committee on Taxonomy of Viruses"). Há ainda três possíveis espécies, cujas características são similares aos sobemovirus, mas que ainda necessitam de mais informações para serem incluídas no gênero. São elas: *Cocksfoot*

mild mosaic virus (CMMV), *Cynosurus mottle virus* (CnMoV) e *Ginger chlorotic fleck virus* (GCFV) (Fauquet & Mayo, 1999).

Deve ser ainda notado que três outros vírus considerados como possíveis espécies do gênero *Sobemovirus* [*Maize chlorotic mottle virus* (gênero *Machlomovirus*), *Olive latent virus 1* (gênero *Necrovirus*) e *Panicum mosaic virus* (gênero *Panicovirus*)] foram recentemente incluídos na família *Tombusviridae* (Tamm & Truve, 2000).

O nome *Southern bean mosaic virus* deve-se ao fato de o vírus ter sido primeiramente descrito infectando feijoeiros na região sul dos Estados Unidos da América do Norte (Zaumeyer & Harter, 1942). Posteriormente, os mesmos autores forneceram uma descrição mais completa do vírus (Zaumeyer & Harter, 1943). Atualmente, sabe-se que o SBMV apresenta-se amplamente disseminado, sendo encontrado também em outras regiões da América do Norte [México (Yerkes & Patiño, 1960)], América Central [Nicarágua (Fuentes, 1990)], América do Sul [Brasil (Cupertino *et al.*, 1982) e Venezuela (Patiño & Garrido, 1996)], África [Gana (Lampitey & Hamilton, 1974), Nigéria (Shoyinka *et al.*, 1979) e Senegal (Gaikwad & Thottappilly, 1988)], Europa [França (Sehgal, 1981)] e Ásia [Índia (Singh & Singh, 1974) e Paquistão (Bashir & Hampton, 1993)].

A gama de hospedeiras do SBMV restringe-se quase que exclusivamente a poucas espécies da família Leguminosae (Tremaine & Hamilton, 1983) que, no entanto, são de interesse econômico como os

feijoeiros comuns e a soja. Na maioria das hospedeiras onde o SBMV é sistêmico, a infecção resulta na produção de mosqueado ou mosaico e, por vezes, distorção foliar e deformação da vagem, sem nenhuma necrose sistêmica (Bennet & Costa, 1961).

São conhecidas três estirpes do SBMV, que são sorologicamente relacionadas e possuem similaridades químicas e físicas e em algumas características biológicas, mas que diferem pelas hospedeiras leguminosas que infectam e pelos sintomas que induzem (Grogan & Kimble, 1964). A estirpe feijoeiro (SBMV), infecta muitos cultivares de feijoeiros comuns (*Phaseolus vulgaris* L.), a maioria dos quais sistemicamente, mas falha ao infectar caupi (*Vigna unguiculata*). Esta estirpe causa mosaico que varia de severo a médio dependendo do cultivar e, em muitos, induz distorção foliar. Em alguns cultivares, por exemplo 'Pinto', causa lesão local (Hull, 1988). Duas outras estirpes denominadas Gana (SBMV-G) e México (SBMV-M), também conhecidas como estirpes do mosaico severo do feijoeiro, são transmitidas para vários cultivares tanto de feijoeiro como caupi, sendo distinguidas entre si pelas reações induzidas em certos cultivares e também sorologicamente (Yerkes & Patiño, 1960; Lamptey & Hamilton, 1974). A estirpe SBMV-G infecta sistemicamente caupi e induz lesão local e fracos sintomas em alguns cultivares de feijoeiro. Já o SBMV-M induz sintomas mais severos em feijoeiros do que todas as outras estirpes e também infecta sistemicamente caupi (Tremaine & Hamilton, 1983). A Soja (*Glycine max*)

é a hospedeira comum à todas as estirpes (Sehgal, 1981).

A espécie SCPMV (Hull *et al.*, 2000) era, até pouco tempo, referida como estirpe caupi do SBMV (SBMV-C) (Murphy *et al.*, 1995; Brunt *et al.*, 1996). Esta espécie infecta sistemicamente *V. unguiculata* e *Pisum sativum* (ervilha) causando clareamento de nervuras, mosaico e distorção foliar, mas não infecta feijoeiros, exceto a cv. Pinto em que induz fracos sintomas restritos às folhas inoculadas (Shepherd & Fulton, 1962).

Lamphey & Hamilton (1974) sugeriram uma origem evolutiva comum para as estirpes do SBMV. Segundo os autores, elas teriam se originado por mutações da estirpe SBMV-G ou de outra estritamente relacionada, apoiado no fato desta estirpe infectar tanto caupi como feijoeiro. Dois fatores poderiam ter induzido estas mutações: altas temperaturas e passagens sucessivas através de uma única hospedeira. Altas temperaturas aparentemente aumentam as taxas de mutação e as várias estirpes do SBMV estão sujeitas à estas por serem típicas de regiões tropicais ou subtropicais (Lamphey & Hamilton, 1974). Além disto, mutações originadas pela passagem sucessiva de um vírus em uma única variedade de hospedeira já foram descritas para outros vírus (Matthews, 1949). Assumindo que SBMV-G seja a estirpe selvagem do SBMV, propagações contínuas do vírus por uma única variedade de feijoeiro associadas com as condições de temperaturas elevadas teriam originado as estirpes mutantes que não seriam mais capazes de infectar caupi

(Lampthey & Hamilton, 1974).

Os sobemovirus são fortemente imunogênicos induzindo a produção de anti-soros com alto título quando injetados em vertebrados (Sehgal, 1981). Não foram descritas relações sorológicas entre os sobemovirus e outros gêneros de vírus de plantas. Além disso, a maioria dos sobemovirus não é sorologicamente relacionada entre si, embora haja exceções (Hull, 1988). Com relação às estirpes, as relações sorológicas podem variar desde muito próximas até distantes ou não detectáveis (Grogan & Kimble, 1964; Lampthey & Hamilton, 1974; Niblett & Claflin, 1978; Torrance & Harrinson, 1981; Berger & Toler, 1983). As estirpes do SBMV, por exemplo, são sorologicamente relacionadas, apesar de não serem idênticas (Grogan & Kimble, 1964; Lampthey & Hamilton, 1974).

Quanto à transmissão, os sobemovirus são altamente infecciosos e podem ser disseminados por vários meios, tanto experimentalmente como em condições naturais. São transmitidos por meios mecânicos, por vetores e pela semente (Sehgal, 1981). Mais recentemente, foi descrita também a transmissão por enxertos e pelo pólen (Brunt *et al.*, 1996).

Os sobemovirus apresentam notável facilidade de transmissão mecânica devido, provavelmente, à acentuada estabilidade e alta concentração endógena dos vírus que fazem parte do gênero. Isto torna desnecessária a presença de agentes protetores ou de estabilização no inóculo. Uma suave fricção do inóculo viral contendo

abrasivo na superfície da folha de uma hospedeira susceptível é um simples e eficiente método de transmissão (Sehgal, 1981). Apesar das folhas serem preferidas como fontes, raízes, caule, bem como partes florais podem ser utilizadas (Zaumeyer & Harter, 1943). Transmissão mecânica espontânea pela abrasão da folhas e contato devido a ação do vento e transmissão por gutação já foram citadas (Sehgal, 1981).

Os vetores naturais da maioria dos sobemovirus são insetos. Para a maioria das espécies (SBMV, SCPMV, CfMV, CMMV, RYMV, TRoV, SNMoV, VTMoV) estes insetos transmissores são coleópteros, para algumas (BSSV, CMMV e CnMoV) estes são afídeos e, somente para o SoMV, são dípteros, homópteros e hemípteros (Hull, 1988). Além disto, duas espécies do gênero (VTMoV e SNMoV) também podem ser transmitidos por mirídeos (Greber, 1981; Francki *et al.*, 1985a).

No caso do SBMV, a transmissão por vetores ocorre através de besouros da família Chrysomelidae, citando-se as espécies *Ceratoma trifurcata* (Walters, 1969), *Epilachna varivestis* (Fulton *et al.*, 1975) e *Lesdesmodina auricollis* (Garrido & Savini, 1996). A interação entre o SBMV e os vetores *C. trifurcata* e *E. varivestis* foi estudada com mais detalhes. O período de retenção do vírus por *C. trifurcata* varia de 6-14 dias (Walters, 1969) e por *E. varivestis* de 2-4 dias (Fulton *et al.*, 1975). O vírus foi encontrado no trato intestinal dos insetos e nos fluidos regurgitantes (Walters, 1969; Scott & Fulton, 1978; Kopek & Scott, 1983), o que sugere uma interação não circulativa com o vetor, com transmissão

pela regurgitação. Entretanto, partículas virais foram também encontradas na hemolinfa (Slack & Scott, 1971; Scott & Fulton, 1978), sugerindo uma interação circulativa. Portanto, há divergências sobre o tipo de interação vírus-vetor.

Três dos sobemovirus são transmitidos pela semente: SBMV, SCPMV (Zaumeyer & Harter, 1943; Shepherd & Fulton, 1962; Lamptey & Hamilton, 1974; Givord, 1981) e SoMV (Bennett & Costa, 1961; Kado, 1967).

A transmissão das estirpes do SBMV pela semente ocorre em uma taxa de 1-5% para sementes de feijoeiro (SBMV) (Zaumeyer & Harter, 1943) e de 5-40% para sementes de caupi (SBMV-G) (Lamptey & Hamilton, 1974). No entanto, há opiniões divergentes sobre o modo de transmissão do SBMV pelas sementes de feijoeiro. Alguns autores defendem a hipótese de transmissão do vírus pelo embrião e casca da semente (Cheo, 1955; Uyemoto & Grogan, 1977), enquanto outros somente pela casca (McDonald & Hamilton, 1972).

Cheo (1955) relatou que a casca da semente contém uma maior quantidade de vírus do que o embrião. Além disto, os vírus presentes no embrião são inibidos pela maturação da semente, sendo que nas sementes completamente maduras não são mais detectadas partículas virais. No entanto, se sementes de plantas sistemicamente infectadas forem colocadas para germinar antes de sua maturação, o vírus pode ser transmitido diretamente do embrião para a plântula. A

casca da semente, embora retenha o vírus por um período mais longo, não têm uma conexão direta com o desenvolvimento da plântula, e somente por meios mecânicos durante a germinação é que os vírus presentes na casca poderiam contaminá-la.

2. PROPRIEDADES DA PARTÍCULA VIRAL

Estruturalmente, o SBMV é um vírus icosaédrico, com 28-30 nm de diâmetro (Figura 1). A massa molecular das partículas é estimada em $6,6 \times 10^6$ Da e estas compreendem cerca de 20% RNA e 80% proteína (Shepherd, 1971; Hull, 1977b).

O material genético do SBMV consiste de RNA de fita única e polaridade positiva que está envolto por 180 monômeros proteicos, cada um com massa molecular variando entre 29-30 kDa, havendo uma única proteína capsidial (Caspar & Klug, 1962; Shepherd, 1971; Sehgal, 1981; Hull, 1988).

Ligeiras diferenças existem na composição de aminoácidos da proteína capsidial das estirpes mas, em geral, cada subunidade proteica consiste de aproximadamente 270 resíduos de aminoácidos (Tremaine, 1966; Ghabrial *et al.*, 1967). O capsídio do SBMV contém também uma significativa proporção de dímeros estáveis (66 kDa) que são formados por ligações cruzadas entre resíduos de lisina das subunidades adjacentes, cuja função não foi esclarecida (Sehgal & Hsu, 1977).

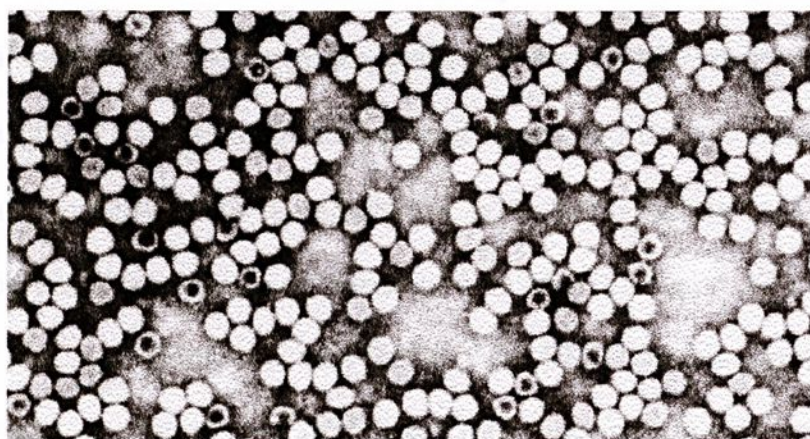


Fig. 1. Preparação purificada do SBMV contrastada negativamente com acetato de uranila 2% e observada ao microscópio eletrônico de transmissão. Aumento: 130.000x. (Figura original extraída de Moreira & Gaspar, 2002).

Os sobemovirus são extremamente estáveis *in vitro*, sendo esta estabilidade devida à associação cooperativa de muitas forças intermoleculares entre o genoma viral e o capsídeo. Além disso, uma variedade de ligações intramoleculares atuam mantendo a estrutura secundária e terciária dos componentes virais individuais (Sehgal, 1981). A estabilidade do SBMV é derivada, principalmente, de ligações dependentes de pH, interações mediadas por cátions divalentes e interações salinas entre o capsídeo e o RNA (Hsu *et al.*, 1976; Hull, 1977b, c).

Os cátions divalentes são muito importantes para a manutenção da estrutura das partículas do SBMV. Hull (1978) encontrou aproximadamente 280 íons cálcio e 380 íons magnésio por virion. A

remoção destes cátions sobre condições alcalinas provoca um "afrouxamento" no capsídio acompanhado pela redução na sedimentação do vírus (115S $\rightarrow$ 100S), o que levou a conclusão de que estes cátions constituem pontes entre subunidades proteicas vizinhas, contribuindo, assim, para a estabilização do capsídio viral (Hull, 1977c).

A importância das interações RNA-capa proteica para a manutenção das partículas do SBMV foi demonstrada por estudos de dissociação em condições de alta salinidade e pH alcalino. Esta produz um complexo ribonucleoproteico (RNPC) composto pelo RNA viral e aproximadamente seis subunidades de proteínas capsidiais. A estabilidade deste complexo em alta salinidade sugeriu uma íntima ligação entre as subunidades proteicas e o RNA viral (Erickson & Rossmann, 1982; Tremaine *et al.*, 1982; Savithri & Erickson, 1983) e, estudos posteriores (Hacker, 1995), identificaram que o sítio desta ligação no RNA viral localizava-se dentro da cadeia aberta de leitura 2 ("open reading frame" 2 -ORF2), sendo esta uma região muito conservada entre alguns sobemovirus.

Em relação à gradientes, o SBMV forma uma única banda em cloreto de cério (CsCl), cuja densidade é 1,36 g/cm³ (Sehgal, 1981; Hull, 1988). Em gradientes de sacarose também uma única banda é observada, com densidade de 1,1 g/cm³ (Brunt *et al.*, 1996). No entanto, em gradientes de sulfato de cério (Cs₂SO₄) observou-se a formação de múltiplas bandas (Magdoff-Fairchild, 1967; Hull, 1977b). As partículas

presentes nestas várias bandas não apresentam diferenças em suas propriedades (conteúdo de ácido nucleico e proteína, infectividade, etc.) e o padrão de bandas também não é devido à mistura de estirpes na preparação. Dessa forma, Hull (1977b) concluiu que a diferença entre as bandas formadas deve-se à variações na estrutura da partícula, que resulta em variações na penetração do íon sulfato (SO_4^{2-}), tornando algumas partículas mais pesadas do que outras.

3. ORGANIZAÇÃO DO GENOMA

O SBMV foi por muito tempo considerado um típico exemplo de vírus com uma única fita de RNA como seu único elemento genético (Diener, 1965; Shepherd, 1971). Este RNA genômico foi caracterizado como tendo polaridade positiva, tamanho molecular de aproximadamente 4,2 Kb e massa molecular de $1,4 \times 10^6$ Da, correspondendo a cerca de 20% do peso total da partícula (Ghabrial *et al.*, 1967). No entanto, estudos posteriores (Rutgers *et al.*, 1980; Ghosh *et al.*, 1981; Weber & Sehgal, 1982) contradisseram este conceito demonstrando que o RNA presente nos virions é muito mais complexo. Verificaram que o RNA viral é heterogêneo, ou seja, em preparações purificadas do vírus, além do RNA genômico de 4,2 Kb, outros RNAs de menor tamanho foram também encontrados, cuja função é apenas especulativa. Um destes RNAs é referido por alguns autores como subgenômico, sendo encapsidado em quantidades diminutas, apresentando tamanho molecular de

aproximadamente 1,0 Kb, e codificando para a proteína capsidial (Rutgers *et al.*, 1980; Ghosh *et al.*, 1981). As 91 bases da extremidade 3' do RNA subgenômico são idênticas às do genômico (Ghosh *et al.*, 1981). O RNA subgenômico (sgRNA) não é infeccioso por si só e não estimula e nem inibe a infectividade do RNA genômico (Weber & Sehgal, 1982).

A região 5', tanto do RNA genômico como do subgenômico, possui uma proteína covalentemente ligada ("virus protein genome linked", VPg) que é essencial para a infectividade do RNA (Veerisetty & Sehgal, 1980), apresentando massa molecular de 12 kDa (Ghosh *et al.*, 1979; Mang *et al.*, 1982). Embora faltem evidências, acredita-se que a VPg, presente em alguns gêneros de vírus de planta, atue na iniciação da síntese do RNA viral (Matthews, 1993).

Na região 5' de ambos os RNAs encontra-se a sequência VPg-ACAAA (Hacker & Sivakumaran, 1997), similar a outros dois sobemovirus, RYMV e LTSV (Ngon A Yassi *et al.*, 1994; Jeffries *et al.*, 1995). Outras seqüências 5' similares foram também observadas em vários RNAs genômicos e subgenômicos de vírus do subgrupo II dos *Luteovirus* (van Der Wilk *et al.*, 1998; Miller & Mayo, 1991). Isto sugere que estas seqüências, ou seus complementos na fita negativa do RNA, devam estar atuando na síntese do RNA viral, talvez como um sinal para a iniciação da transcrição (Hacker & Sivakumaran, 1997).

Diferente de muitos RNAs, a região 3' do RNA do SBMV não é poliadenilada (Mang *et al.*, 1982) mas contém um grupo hidroxila livre (Ghosh *et al.*, 1979).

A replicação de um vírus de RNA de fita única e polaridade positiva, como é o caso do SBMV, necessita da síntese de um RNA molde complementar de fita negativa que constitui um intermediário replicativo. Este intermediário replicativo pode se parear com o RNA genômico de polaridade positiva formando moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA) denominadas Formas Replicativas (RF) (Dodds *et al.*, 1984). A possível função destas RFs durante a replicação permanece desconhecida, embora tenha sido sugerido que elas representam apenas um produto intermediário ou final que se origina dentro da planta hospedeira (Ralph, 1969; Garnier *et al.*, 1980). Segundo Dodds *et al.* (1984), o tamanho esperado para os dsRNAs seria o dobro do genoma viral, já que este consiste de duas fitas de RNA de polaridades diferentes pareadas. O dsRNA do SBMV, quando submetido à eletroforese, apresentou uma banda que provavelmente corresponderia à forma replicativa do RNA genômico e outra que corresponderia a forma replicativa do RNA subgenômico (Morris & Dodds, 1979).

Os RNAs do SBMV foram traduzidos *in vitro* em sistemas livres de células (lisado de reticulócitos de coelho e extrato de germe de trigo) produzindo quatro polipeptídeos principais: P1 (100-105 kDa), P2 (60-75 kDa), P3 (28-29 kDa) e P4 (14-25 kDa) (Rutgers *et al.*, 1980;

Salerno-Rife *et al.*, 1980; Ghosh *et al.*, 1981; Brisco *et al.*, 1985). A capacidade codificadora do RNA do SBMV não é suficiente para produzir estas quatro proteínas, portanto alguns cistrons devem sobrepor-se. Como as proteínas P1 e P2 são relacionadas, ou seja, apresentam muitos peptídeos em comum, sugere-se que a sobreposição deva ocorrer nas seqüências codificadoras destas, na qual P1 seria um produto "read-through" (Salerno-Rife *et al.*, 1980).

A seqüência de nucleotídeos do SBMV foi determinada (4109 nucleotídeos; nt) mostrando conter três cadeias abertas de leitura (ORFs 1, 2 e 3) com regiões intercistrônicas entre as ORFs 1 e 2 e ORFs 2 e 3 (Othman & Hull, 1995). Entretanto, Lee & Anderson (1998) seqüenciaram um isolado do Arkansas do SBMV, denominado SBMV^{ARK}, bem como seu mutante espontâneo SBMV-S, nos quais observou-se a presença de quatro cadeias abertas de leitura, diferentemente das três apresentadas pelo seqüenciamento realizado por Othman & Hull (1995), mostrando uma organização genômica similar a de outros sobemovirus (Figura 2). Como a seqüência de nucleotídeos do SBMV^{ARK} apresentou 91,3% de identidade com o SBMV, os autores discutem a possibilidade de ter ocorrido mutações ou mesmo erros no seqüenciamento feito por Othman & Hull (1995) que resultaram na identificação errada das cadeias abertas de leitura do SBMV. Eles propuseram que o SBMV também deve possuir quatro cadeias abertas de leitura em posições semelhantes ao genoma de outros sobemovirus e não apenas as três descritas.

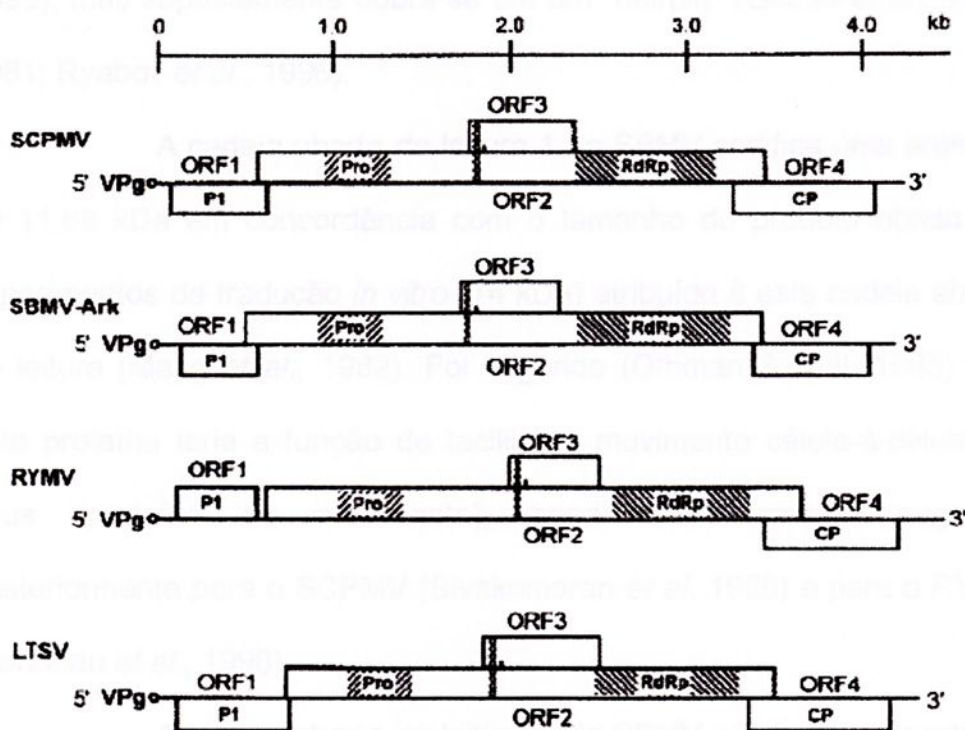


Fig. 2. Organização genômica de alguns sobemovirus. VPg, o peptídeo covalentemente ligado à região terminal 5' do RNA genômico, é mostrado como um pequeno círculo. Pro, protease. RdRp, replicase. P1, possível proteína do movimento. CP, proteína capsidial. Notar a similaridade na organização genômica entre o SBMV e outros sobemovirus. (Esquema modificado de Tamm & Truve, 2000).

Uma região 5' não codificadora de 92 bases ricas em A+U (61%) precede a primeira cadeia aberta de leitura do SBMV. Esta região é parcialmente complementar ao terminal 3' do RNA ribossômico 18S, tendo uma possível atuação na ligação a esta organela. A região 3' não codificadora do SBMV é composta por 129 nucleotídeos e não tem

potencial para formar uma estrutura semelhante à RNAt (Othman & Hull, 1995), mas supostamente dobra-se em um "hairpin" (Ghosh *et al.*, 1979, 1981; Ryabov *et al.*, 1996).

A cadeia aberta de leitura 1 do SBMV codifica uma proteína de 11,68 kDa em concordância com o tamanho do produto obtido em experimentos de tradução *in vitro* (14 kDa) atribuído à esta cadeia aberta de leitura (Mang *et al.*, 1982). Foi sugerido (Othman & Hull, 1995) que esta proteína teria a função de facilitar o movimento célula-à-célula do vírus (proteína do movimento), sendo isto também sugerido posteriormente para o SCPMV (Sivakumaran *et al.* 1998) e para o RYMV (Bonneau *et al.*, 1998).

A cadeia aberta de leitura 2 do SBMV codifica uma proteína de cerca de 100 kDa que possivelmente seria uma poliproteína que daria origem, por clivagem, aos produtos funcionais. Estes produtos seriam a serino protease, a VPg e uma RNA polimerase com atividade relacionada à replicação do RNA viral (RNA polimerase RNA-dependente, RdRp) (Gorbalenya *et al.*, 1988; van Der Wilk *et al.*, 1998). Também foi encontrado dentro da cadeia aberta de leitura 2, na região codificadora da protease, o sítio de ligação do RNA com a capa proteica, que estaria atuando na formação do complexo ribonucleoproteico (RNPC) importante para a estabilização dos virions. A presença deste sítio na cadeia aberta de leitura 2 pode estar relacionada com a regulação deste gene pela proteína capsidial (Hacker, 1995).

Opiniões divergem à respeito da cadeia aberta de leitura 3 do SBMV. Segundo Othman & Hull (1995), a cadeia aberta de leitura 3 codifica uma proteína de 28 kDa (proteína capsidial) que deveria ser expressa *in vivo* a partir de um RNA subgenômico. Entretanto, Lee & Anderson (1998) propõem que a cadeia aberta de leitura 3, similarmente ao que ocorre com outros sobemovirus, estaria contida dentro da cadeia aberta de leitura 2 e codificaria uma proteína de 15 kDa, cuja função é desconhecida. A cadeia aberta de leitura 4 sobrepõe a cadeia aberta de leitura 2 em 193 nucleotídeos e codifica a proteína capsidial com massa molecular de 28,8 kDa, expressa a partir de um RNA subgenômico (Lee & Anderson, 1998).

Foi demonstrado para a espécie SCPMV que a proteína capsidial, juntamente com a proteína codificada pela cadeia aberta de leitura 1, estaria envolvida no movimento célula-à-célula do vírus e poderia também estar atuando no movimento à longa distância (Sivakumaran *et al.*, 1998). Embora não tenha sido comprovado, é possível que para o SBMV a proteína capsidial também exerça esta função.

A proteína capsidial do SBMV, codificada pela cadeia aberta de leitura 4, possui um domínio, denominado R, localizado na porção N-terminal da cadeia polipeptídica que é rico em arginina, lisina, prolina e glutamina. Este domínio situa-se no interior da partícula e interage com o RNA (Abad-Zapatero *et al.*, 1980; Tremaine *et al.*, 1981, 1982;

Hermanson *et al.*, 1982; Kruse *et al.*, 1982). Ngou A Yassi e colaboradores (1994), notaram que as seqüências das regiões N-terminal da capa proteica do SBMV e SCPMV contêm um sinal que é um motivo bipartido de ligação ao núcleo (Dingwall & Laskey, 1991). Existem dois tipos de sinal: o monopartido, composto de poucos resíduos de aminoácidos, essencialmente lisina ou arginina (consenso: (K/R)₄₋₆) e o bipartido, constituído de dois pequenos agrupamentos separados por cerca de uma dúzia de resíduos de aminoácidos (consenso: (K/R)₂ X₁₀₋₁₂ (K/R)₃) (Christophe *et al.*, 2000).

Em relação às estratégias de tradução, sabe-se que as cadeias abertas de leitura 1 e 4, cujas proteínas se expressam do RNA genômico e subgenômico respectivamente, são traduzidas por um mecanismo de leitura dependente da extremidade 5', em que o primeiro códon AUG é reconhecido pelos ribossomos que iniciam a tradução (Hacker & Sivakumaran, 1997). Recentemente, Sivakumaran & Hacker (1998) propuseram o mecanismo pelo qual os ribossomos ganham acesso ao códon de iniciação da cadeia aberta de leitura 2 do SCPMV, que é o quarto códon AUG da extremidade 5'. Segundo os autores, os ribossomos 40S desviariam dos 3 primeiros códons AUG sem reconhecê-los, somente iniciando a tradução no códon AUG da cadeia aberta de leitura 2, sendo este processo denominado "leaky scanning" (Kozak, 1989). Isto somente seria possível porque os códons AUG antecedentes estão em um contexto subótimo para a iniciação da tradução, enquanto

que o códon AUG da cadeia aberta de leitura 2 está presente em um contexto altamente favorável para a tradução (Sivakumaran & Hacker, 1998).

4. ULTRAESTRUTURA CELULAR

Estudos ultraestruturais das espécies SBMV e SCPMV em tecido foliar revelaram diferenças quanto ao arranjo das partículas virais das duas espécies nas células de suas respectivas hospedeiras (Edwardson *et al.*, 1966; de Zoeten & Gaard, 1969; Weintraub & Ragetli, 1970).

Weintraub & Ragetli (1970) relataram para o SCPMV a presença de arranjos cristalinos, freqüentemente nos tecidos vasculares e próximo a estes, enquanto que para o SBMV estes cristais não foram observados. Os cristais apareciam 10 dias após a inoculação do vírus e, a partir daí, aumentavam em tamanho e número, estando presentes tanto no citoplasma como no núcleo das células infectadas pelo SCPMV. Alguns apareciam associados com estruturas filamentosas ou membranosas, enquanto outros ocupavam o interior dos vacúolos, podendo preencher todo o espaço vacuolar. Já no núcleo não havia uma posição aparentemente definida para os cristais, podendo ser vistos no nucleoplasma ou associados ao nucléolo. Esse foi o primeiro relato da formação de cristais por um vírus icosaédrico no núcleo das células de plantas. Como nenhum arranjo similar foi encontrado nas células sadias,

concluiu-se que aqueles eram realmente resultantes da infecção pelo SCPMV, podendo portanto serem chamados cristais virais. Os cristais observados, no entanto, não foram persistentes pois não eram mais encontrados no núcleo ou citoplasma das amostras depois de 19 dias da inoculação do vírus (Weintraub & Ragetli, 1970).

Segundo os trabalhos de de Zoeten & Gaard (1969) e Weintraub & Ragetli (1970), nenhum cristal verdadeiro foi encontrado nas células infectadas pelo SBMV. Partículas de 26 a 29 nm de diâmetro foram vistas dispersas livremente no citoplasma e no núcleo (Figura 3), ou algumas vezes cercadas por uma frouxa membrana no citoplasma. Também estavam presentes no espaço perinuclear que tornava-se entumecido para acomodar as partículas virais. Como nenhuma partícula similar foi vista nas células sadias, supôs-se que aquelas eram de fato partículas virais. Somente nas células do floema é que formações aproximadamente cristalinas foram algumas vezes encontradas, sugerindo que este pode ser um sítio de multiplicação viral e/ou de transporte a longa distância do vírus na planta hospedeira.

Quanto as anormalidades nas organelas causadas pela infecção viral, estas foram semelhantes para SBMV e SCPMV. Nos tecidos infectados foram observadas anormalidades, como mitocôndrias com corpos elétron-densos em seu interior e cloroplastos com extrusões, algumas das quais englobavam o citoplasma resultando em um vacúolo preenchido por material citoplasmático e estroma do cloroplasto, podendo

conter até mitocôndrias. Nenhuma partícula viral foi detectada nos cloroplastos ou mitocôndrias. Entretanto as alterações observadas nestas organelas podem ser um indício do envolvimento, mesmo que indireto, com a síntese viral. Além disso, as células infectadas também apresentaram intensa vacuolização (Weintraub & Ragetli, 1970; Brunt *et al.*, 1996).

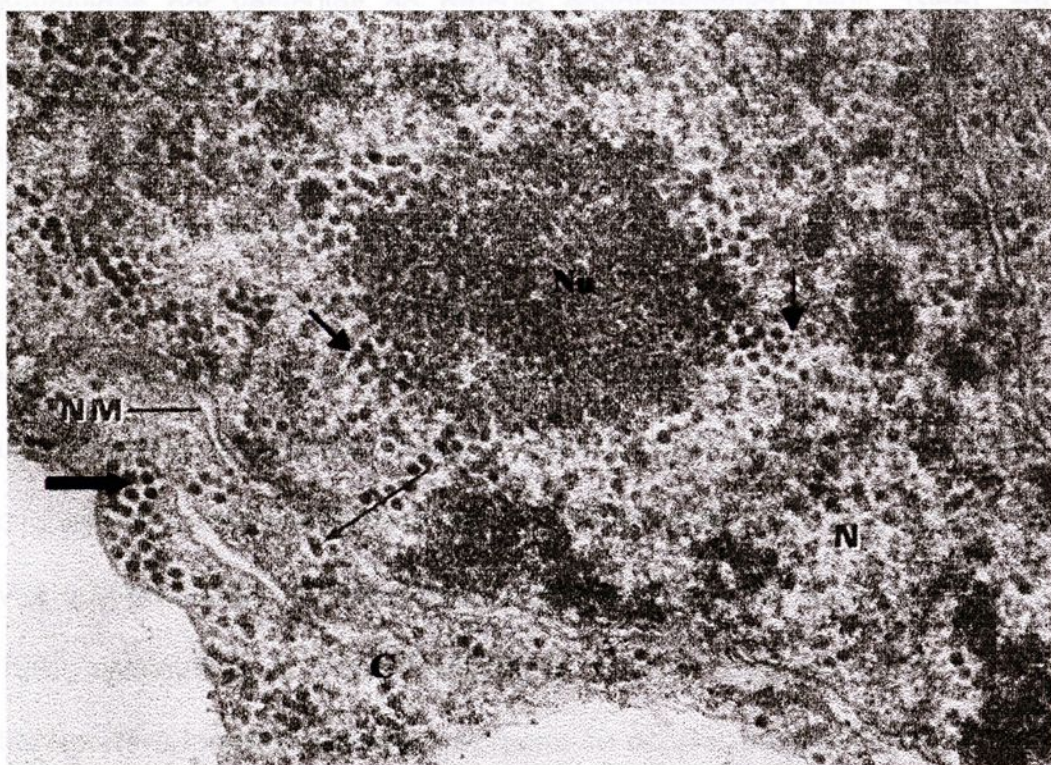


Fig. 3. Célula de folha de feijoeiro mostrando partículas do SBMV no citoplasma (seta larga), núcleo (setas curtas) e espaço perinuclear (seta longa). C, citoplasma; N, núcleo; Nu, nucléolo, NM, membrana nuclear. Aumento: 60.000 X. (Adaptado de Weintraub & Ragetli, 1970).

O significado da presença de partículas de ambas as espécies no núcleo é desconhecido. Weintraub & Ragetli (1970) descreveram o núcleo como o primeiro local onde são reconhecidas as partículas do SCPMV e sugeriram que esse seria o sítio de síntese viral. Por outro lado, fibrilas citoplasmáticas podem ser observadas no citoplasma de células infectadas por sobemovirus, algumas das quais são envolvidas por vesículas do retículo endoplasmático (Hull, 1988). Há indícios de que estas fibrilas sejam dsRNAs (Francki *et al.*, 1985b), o que sugere que a replicação viral ocorra no citoplasma, estando relacionada com o sistema de membranas.

O movimento celular do SBMV e SCPMV, como os de outros vírus de plantas, provavelmente ocorre com o auxílio do movimento citoplasmático ou ciclose (Sehgal, 1981) e o fluxo viral do núcleo para o citoplasma e vice-versa deve se dar através dos poros nucleares, uma vez que partículas do SBMV foram aí observadas (de Zoeten & Gaard, 1969; Weintraub & Ragetli, 1970; Muñoz & Kitajima, 1990). Já o transporte à longas distâncias, suspeita-se ocorrer pelo sistema vascular (xilema e floema), desde que agregados virais foram vistos em ambos tecidos (Schneider & Worley, 1959). O transporte do SBMV destes tecidos para as células vizinhas provavelmente ocorre via plasmodesmos, que conectam os elementos condutores às células adjacentes (Opalka *et al.*, 1998). O movimento à longas distâncias através de vasos condutores já

foi descrito para outros sobemovirus, como é o caso do SCPMV, BSSV e RYMV (Opalka *et al.*, 1998).

O *Southern bean mosaic virus* NO BRASIL

O SBMV foi detectado pela primeira vez no Brasil no Distrito Federal (SBMV^{DF}) (Cupertino *et al.*, 1982) e, posteriormente, foi também encontrado no Estado de São Paulo (SBMV^{SP}) (A.S. Costa. Dados não publicados). Mais recentemente, um isolado do SBMV foi encontrado no Estado do Paraná (Gasparin, 2002). No entanto, devido à facilidade de transmissão do SBMV (Zaumeyer & Harter, 1943; Sehgal, 1981; Brunt *et al.*, 1996), pode-se aventar que a distribuição geográfica do vírus pelo Brasil seja muito mais ampla.

Os besouros crisomelídeos *Diabrotica speciosa* e *Ceratoma arcuata* são os principais vetores do SBMV no Brasil (Costa & Batista, 1979; Silveira Jr. *et al.*, 1983; Meyer *et al.*, 1992), sendo que *C. arcuata* foi identificado como o vetor mais eficiente na transmissão desse vírus (Silveira Jr. *et al.*, 1983), porém as relações vírus/vetor ainda não são bem conhecidas (Meyer *et al.*, 1992).

Também foi descrita a transmissão do SBMV^{DF} pelas larvas de *C. arcuata*, do sistema radicular de plantas infectadas para o de plantas sadias, em uma taxa de 5,1% (Meyer *et al.*, 1993). Esta taxa é pequena se comparada com a taxa de transmissão pelo inseto adulto (58,3%) (Silveira Jr. *et al.*, 1983), no entanto as larvas constituem

população mais numerosa, o que torna a transmissão substancialmente importante (Meyer *et al.*, 1993). Isso evidencia a possibilidade de transmissão do vírus através do solo, fato importante para a epidemiologia do SBMV.

Os isolados SBMV^{DF} e SBMV^{SP} foram estudados do ponto de vista da estrutura dos tecidos infectados. Em relação ao SBMV^{DF}, arranjos cristalinos de partículas virais foram encontrados próximos às paredes celulares da maioria das células e, no núcleo, partículas foram vistas dispersas pelo nucleoplasma (Muñoz & Kitajima, 1990). Já em relação ao SBMV^{SP}, partículas foram encontradas dispersas pelo citoplasma e, às vezes, dispostas em um arranjo quase cristalino, sendo que estruturas membranosas foram geralmente vistas associadas com as partículas virais (Moreira, 2001). Partículas não foram encontradas no interior dos cloroplastos, mitocôndrias e núcleos de células infectadas.

O isolado descrito no Estado de São Paulo (SBMV^{SP}) teve algumas de suas propriedades determinadas (Moreira & Gaspar, 2002): o SBMV^{SP} infecta sistemicamente plantas de *Phaseolus vulgaris* L. 'Rosinha' induzindo mosaico, distorção foliar e redução do tamanho da planta. As partículas virais apresentam diâmetro de 29-30 nm e proteína capsial com massa molecular estimada em 30 kDa. Das partículas virais foram extraídos RNAs de vários tamanhos (4,2 Kb, 3,1 Kb, 2,65 Kb, 2,15 Kb, 1,64 Kb, 1,36 Kb e 1,0 Kb) sendo aquele de 4,2 Kb o RNA genômico e o de 1,0 Kb supostamente um subgenômico para a proteína capsial.

RNAs de mesmo tamanho foram também detectados *in vivo*, indicando que devam exercer alguma função no ciclo de multiplicação viral. Na análise do RNA de fita dupla (dsRNA), somente duas espécies foram detectadas (4,2 Kpb e 1,0 Kbp) correspondendo às formas replicativas do RNA genômico e do subgenômico para proteína capsidial. Estes resultados indicam que somente estes dois RNAs replicam por meio de formas replicativas (RFs) enquanto os demais devem ser formados talvez por iniciação interna da fita negativa do RNA genômico. O SBMV^{SP} apresenta propriedades moleculares análogas às daquelas do SBMV descrito na América do Norte.

Inoculação de plantas

O método para a inoculação do vírus para feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) consistiu na aplicação manual de inoculante sobre as folhas infectadas em solução (solução de potássio 0,02 M pH 7,4 contendo ácido de ácido 0,02 M). O homogenizado foi imediatamente aplicado nas folhas de feijão, utilizando Cante como vetor.

Purificação do Vírus

O SBMV^{SP} foi purificado segundo o protocolo descrito por Moreira & Cesar (2002). Em outras palavras, folhas saudáveis ou infectadas de (*Phaseolus vulgaris* L.) foram trituradas em liquidificador com 2 volumes (peso/vol.) de tampão tampão de potássio 0,1 M pH 7,2 com 0,75% de ácido de ácido. Após filtração em gaze, o suco foi centrifugado

II. MATERIAL E MÉTODOS

Vírus e Plantas

O isolado do *Southern bean mosaic virus* usado neste estudo foi encontrado no Estado de São Paulo e gentilmente cedido pelo Dr. Álvaro Santos Costa do Instituto Agronômico de Campinas (IAC). O vírus foi mantido em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*. L.) 'Rosinha' por inoculação mecânica em plantas obtidas a partir de sementes. As plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura controlada ao redor de 28 °C.

Inoculação de plantas

O inóculo para a transmissão do vírus para feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*. L.) 'Rosinha' foi preparado através de maceração de folhas infectadas em tampão fosfato de potássio 0,02 M pH 7,4 contendo sulfito de sódio 0,02 M. O homogeneizado foi manualmente aplicado nas folhas de feijoeiro, utilizando Celite como abrasivo.

Purificação do Vírus

O SBMV^{SP} foi purificado seguindo-se o protocolo descrito por Moreira & Gaspar (2002). Em linhas gerais, folhas congeladas ou frescas de (*Phaseolus vulgaris*. L.) foram trituradas em liquidificador com 2 volumes (peso/vol.) de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,2 com 0,75% de sulfito de sódio. Após filtração em gase, o suco foi clarificado

com clorofórmio (0,5 ml/g), agitado fortemente por 10 minutos e as fases separadas por centrifugação a 12.000 g por 5 minutos. A fase tamponada foi colhida, seu pH foi ajustado para 4,8 com ácido acético glacial para precipitação dos contaminantes e, então, esta foi submetida a uma centrifugação de 12.000 g por 10 minutos. O vírus foi precipitado da fase tamponada pela adição de polietilenoglicol 8000 (PEG) 10% e cloreto de sódio 1% com agitação por 2 horas à 4 °C. Após centrifugação a 16.000 g por 10 minutos, o sedimento foi ressuscitado em tampão KH_2PO_4 0,01 M, pH 7,2 sob agitação por 30 minutos à 4 °C. Novamente foi realizada centrifugação a 16.000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi colhido e ultracentrifugado por 90 minutos a 100.000 g. O sedimento foi ressuscitado em em 1 ml de tampão KH_2PO_4 0,01 M, pH 7,2 e centrifugado por 120 minutos a 150.000 g em gradiente linear de sacarose (10-50%) em tampão KH_2PO_4 0,01 M pH 7,2. A banda contendo o vírus foi coletada e diluída no tampão acima e centrifugada por 90 minutos a 100.000 g. O sedimento foi recuperado em 1 ml de tampão KH_2PO_4 0,01 M pH 7,2. Esta é a fração denominada "vírus purificado".

Espectrofotometria

O vírus purificado foi submetido à leitura em espectro de 220 a 320 nm (luz ultravioleta) para a determinação da concentração viral utilizando o coeficiente de extinção do SBMV cujo valor é 6 em leitura à 260 nm (Sehgal, 1981).



Extração do RNA viral

Tanto a água como as soluções utilizadas foram tratadas com dietil pirocarbonato de sódio (DEPC) 0,1% para eliminação de RNAses. As vidrarias foram mantidas à 200 °C por 3 horas.

Uma alíquota do vírus purificado foi tratada com SDS 2,5% e NaCl 0,1 M com aquecimento por 3 minutos à 55 °C. Em seguida foi acrescentado igual volume de fenol (equilibrado com tampão citrato de sódio 0,1 M pH 4,3), agitada manualmente por 30 segundos e, então, centrifugada para a separação das fases. A fase aquosa foi novamente extraída com fenol e, após centrifugação o ácido nucleico foi precipitado da fase aquosa pela adição de 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e três volumes de etanol por 1 hora à -70 °C. Em seguida, a mistura foi submetida à centrifugação a 12.000 g por 15 minutos e o "pellet" foi secado à 37 °C por 10 minutos e ressuspendido em água tratada com DEPC.

Síntese do cDNA

Para a produção do DNA complementar (cDNA) ao RNA viral, foi utilizado um volume de reação de 20 µl consistindo de: 50 mM Tris.Cl (pH 8,3); 75 mM KCl; 10 mM DTT; 3 mM MgCl₂; 0,1 mM cada dGTP, dATP, dCTP; 0,065 mM dTTP; 10 µg/ml hexanucleotídeos; 2 unidades de inibidor de RNase; 1-3 µg RNA viral desnaturado à 95 °C por

5 minutos; 40 unidades de Transcriptase Reversa "Superscript" (Gibco-BRL). A reação permaneceu por 2 horas à 42 °C.

Construção dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Invitrogen e foram desenhados utilizando-se os programas Primer-3 e Oligo-4 baseando-se na sequência de nucleotídeos do SBMV^{ARK} (Lee & Anderson, 1998).

Um par de oligonucleotídeos que flanqueia o gene da possível proteína do movimento foi desenhado visando posterior clonagem do gene amplificado em plasmídeo de seqüenciamento. Este par de oligonucleotídeos compreende uma sequência de 591 nucleotídeos, (nucleotídeos 1 ao 591) correspondendo a região inicial não codificadora e a cadeia aberta de leitura 1 que codifica a possível proteína do movimento.

A sequência do par de oligonucleotídeos é a seguinte:

sense (Ea39): 5'CACAAAATATAAGAAGGAAAGCTGG 3'

anti-sense (SBMV1): 5'ACGCTGCAGCCGTATGGATGTGCGAA 3'.

Para amplificar o gene da capa proteica foi desenhado um outro par de oligonucleotídeos que cobre a sequência dos nucleotídeos 3164 a 4136, compreendendo uma região de 972 pares de bases, ou seja, toda a cadeia aberta de leitura 4 que codifica o gene da capa proteica viral. A sequência do par de oligonucleotídeo é a seguinte:



sense (SeqCP): 5' CATCGCCCCACAAAATAAT 3',

anti-sense (Ea 29): 5' ACTTTTGGATTACGCTCCATC 3'.

Amplificação por Reação em cadeia da polimerase ("Polimerase chain reaction", PCR)

O volume da reação da PCR foi de 50 μ l consistindo de tampão (Tris-HCl 20mM pH 8,4; KCl 50 mM); 5 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM cada dCTP, dGTP, dATP e dTTP; 10 μ g/ml de cada primer (sense e anti-sense); 1 μ l da mistura da reação de cDNA e 2 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen - living science).

O ciclo da PCR, realizado em um termociclador MJ Reserch, envolveu uma desnaturação inicial de 94 °C por 4 minutos e 30 ciclos com 1 minuto de desnaturação à 94 °C, 1 minuto de anelamento à 45 °C e 1 minuto de extensão à 72 °C. Após os 30 ciclos, foi feita a extensão final por 10 minutos à 72 °C. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados, sob luz ultravioleta, em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (Sambrook *et al.*, 1989).

Purificação do Fragmento Amplificado por PCR

A purificação dos fragmentos amplificados do gel foi feita utilizando-se o kit de extração "Concert Gel Extration Systems" (Gibco-BRL), de acordo com as instruções do fabricante. Em linhas gerais, a área do gel de agarose 0,8% contendo o fragmento de DNA foi extraída

usando uma lâmina limpa. A este pedaço do gel foi acrescentado tampão de solubilização de gel (L1; perclorato de sódio, acetato de sódio e TBE), que acompanha o kit, e deixado à 50 °C por 15 minutos, até a completa dissolução da agarose. Essa mistura foi colocada em uma coluna de sílica e centrifugada a 12.000 g por 1 minuto. O efluente da coluna foi descartado e esta foi lavada com tampão de lavagem (L2; NaCl, EDTA e Tris-HCl) contendo etanol. Novamente, foi centrifugado a 12.000 g por 1 minuto e descartado o efluente. A coluna foi colocada em um novo tubo e foi adicionado 50 µl de tampão TE aquecido à 65 °C (Tris 10mM, EDTA 0,1mM) e, então, centrifugado por 2 minutos a 12.000 g. O efluente é o fragmento amplificado por PCR purificado.

Quantificação do DNA purificado

A determinação da quantidade de DNA foi realizada por comparação através de eletroforese em gel de agarose 1,5% utilizando o marcador "Low DNA Mass™ Ladder" (Invitrogen - living science), sendo que 4 µl deste marcador aplicado no gel resultam em bandas contendo 200, 120, 80, 40, 20 e 10 ng de DNA.

Clonagem do gene em vetor de seqüenciamento

A clonagem do fragmento obtido na reação de PCR foi feita utilizando o kit "SureClone™ Ligation Kit" (Pharmacia Biotech). Primeiramente é feita a reação de "blunting/kinasing" colocando-se os

seguintes componentes num eppendorf: 2 μ l do produto de PCR, 1 μ l DNA polimerase "Klenow", 2 μ l tampão 10X, 1 μ l polinucleotídeo kinase, 14 μ l água esterilizada. Esses componentes foram misturados e incubados à 37 °C por 30 minutos, sendo posteriormente acrescentados 20 μ l de fenol/clorofórmio e centrifugado por 1 minuto. A fase superior foi coletada e purificada na coluna de Sephacryl S-200 "MicroSpin Column" que acompanha o kit.

Em seguida, o produto de PCR foi ligado ao vetor pUC18, com extremidades desfosforiladas, numa relação equimolar 1:1 de insertos e vetor. Os componentes utilizados para a ligação foram: 2 μ l do efluente da coluna de Sephacryl S-200, 1 μ l do vetor desfosforilado, 10 μ l tampão de ligação, solução de 1 μ l DTT, 1 μ l T4 DNA ligase, 5 μ l água esterilizada. Esses componentes foram incubados à 16 °C por 2 horas.

Preparação de célula competente

Dez ml de meio SOB líquido foram inoculados com uma colônia de *E. coli* linhagem DH5- ∞ isolada em placa recente de meio LB e incubado por 16 horas à 37 °C sob agitação moderada (250 rpm), obtendo-se uma cultura saturada.

Um ml da cultura saturada foi utilizado para inocular 100 ml de meio SOB sob agitação de 250 rpm à 37 °C até atingir densidade de aproximadamente 5×10^7 células/ml (DO_{550} 0,45-0,55).



A cultura foi transferida para tubos "falcon" estéreis (50 ml), resfriada por 10 minutos em gelo e centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi decantado e o tubo mantido invertido por alguns minutos para secar o sedimento. As células foram ressuspensas em 1/3 do volume inicial da cultura (33 ml) em solução RF1, transferidas para um único tubo "falcon" e incubadas em gelo por 15 minutos, seguida de centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos à 4 °C. As células foram, então, ressuspensas em 1/12 do volume inicial em tampão RF2 (8 ml) e incubadas por 15 minutos em gelo.

Alíquotas de 110 µl foram distribuídas em eppendorf previamente resfriados em gelo e congeladas em banho de nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 °C.

Tampão RF1: Acetato de potássio 30mM; Cloreto rubídio 100mM; Cloreto Manganês 50 mM; cloreto cálcio 10 mM; glicerol 15%. O pH do tampão foi ajustado para 5,8 com ácido acético 0,2M e esterilizado por filtração em membrana de 0,22µm.

Tampão RF2: MOPS 10 mM; Cloreto rubídio 10 mM; Cloreto cálcio 75 mM; glicerol 15%. O pH do tampão foi ajustado para 6,8 com NaOH 2N e esterilizado por filtração em membrana de 0,22µm.



Transformação em *Escherichia coli*

Após a reação de ligação fez-se a transformação padrão do recombinante em *E. coli* linhagem DH5- ∞ , utilizando-se 110 μ l de células competentes e 5 μ l de vetor ligado. Essa mistura permaneceu no gelo durante 1 hora e, então, foi submetida ao choque de temperatura à 42 °C por exatos 90 segundos, para a entrada do plasmídeo recombinante na bactéria. Em seguida foram adicionados 900 μ l de meio líquido SOC (meio SOB + 200 mM de glicose) e as bactérias foram postas para regeneração (1 hora à 37 °C com agitação à 250 rpm). Posteriormente, as bactérias foram plaqueadas em meio sólido seletivo (LB + ampicilina 100 μ g/ml), contendo 40 μ l de X-gal 20 mg/ml (5 Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranoside), utilizado para a detecção colorimétrica da atividade da enzima β -galactosidase e, após o crescimento durante à noite, as colônias brancas isoladas foram salvas em outra placa de meio sólido e incubadas a 37 °C durante à noite. Estas colônias foram testadas para comprovar a existência do inserto através de PCR. Para tanto, uma amostra da colônia foi colocada em 30 μ l de água e fervida durante 15 minutos. Esta solução foi usada como cDNA na reação de PCR. As colônias que apresentaram o inserto foram inoculadas em tubos individuais de 5 ml de meio líquido seletivo (LB + ampicilina 100 μ g/ml) sob agitação e aeração constantes à 37 °C para posterior extração do DNA plasmidial.



Extração do DNA Recombinante

A extração do DNA recombinante foi realizada usando-se o kit "Concert Rapid Plasmid Miniprep System" (Gibco-BRL), onde foi utilizado o sedimento proveniente de 5 ml de cultura líquida, incubado durante a noite para crescimento bacteriano. Este sedimento foi ressuspenso em 210 μ l de tampão G1 e foram acrescentados 210 μ l de tampão G2 (Solução de lise). O tubo foi manualmente invertido cinco vezes e incubado à temperatura ambiente por cinco minutos. À esta mistura foram acrescentados 280 μ l de tampão G3 e o tubo foi novamente invertido cinco vezes e centrifugado a 12000 g por 10 minutos.

O sobrenadante resultante da centrifugação foi passado pela coluna que acompanha o kit e centrifugado por 12.000 g durante um minuto. O efluente foi descartado e ao tubo foram acrescentados 500 μ l de tampão GX. Seguiu-se outra centrifugação a 12000 g por 1 minuto. O efluente foi novamente descartado e 700 μ l de tampão G4 foi acrescentado à coluna, que foi centrifugada por 1 minuto a 12.000 g e o efluente foi descartado.

À coluna foi acrescentado 75 μ l de tampão TE aquecido à 65 °C e incubada à temperatura ambiente por 1 minuto. Seguiu-se, então, uma centrifugação de 12.000 g por 2 minutos. O efluente contém o plasmídeo purificado.

Após a extração do DNA plasmidial das células selecionadas, foram feitas digestões com enzimas de restrição (EcoRI e

BamHI) para a comprovação da formação do recombinante, através da liberação do fragmento de tamanho esperado.

Seqüenciamento

Os DNAs plasmidiais purificados foram seqüenciados pela técnica de reação de terminação em cadeia (Sanger *et al.*, 1977), utilizando-se o seqüenciador automático "ABI 377 DNA Sequencer" (Laboratório de Biologia Molecular, ESALQ/USP, Piracicaba, SP) e o "kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit - Ampli Taq DNA Polymerase", FS (Perkin Elmer) seguindo-se as recomendações do fabricante. O seqüenciamento de 5 clones de cada gene foi realizado nos dois sentidos de leitura. O alinhamento das seqüências obtidas foi feito com o auxílio do programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) e as comparações com as seqüências existentes no banco de dados GenBank, foram feitas através do programa BLAST do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Análise Filogenética

Algumas seqüências de sobemovirus depositadas no "GenBank " foram selecionadas para efetuar-se o alinhamento das seqüências pelo programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) com o objetivo de obter relações filogenéticas pelo método de agrupamento de vizinhos ("neighbor-joining"-NJ) (Saitou and Nei, 1987) como

implementado no PAUP v.4.0b10 (Swofford, 1997). A análise do teste de confiança da topologia ("bootstrap") consistiu de 500 réplicas e a árvore foi construída usando o programa Tree View 1.6.1.

Produção de sonda não radioativa para o genoma viral

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

Para a produção do DNA complementar (cDNA) ao RNA viral, foi utilizado o seguinte protocolo para um volume de reação de 20 μ l: 50 mM Tris.Cl (pH 8,3); 75 mM KCl; 10 mM DTT; 3 mM $MgCl_2$; 0,1 mM cada dGTP, dATP, dCTP; 0,065 mM dTTP; 0,035 mM DIG-dUTP; 10 μ g/ml hexanucleotídeos; 2 unidades de Inibidor de RNase; 1-3 μ g RNA viral desnaturado à 95 °C por 5 minutos; 40 unidades de Transcriptase Reversa "Superscript" (Gibco-BRL). A reação permaneceu por 4 horas à 42 °C. A sonda produzida é estável à -20 °C por até 12 meses.

"Southern Blotting"

O DNA analisado foi diluído em azul de bromofenol (TAE 1x, glicerol 50%, 0,25% azul bromofenol), sendo submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE (Tris 0,04M; Acetato de sódio 0,02M; EDTA 0,001M pH 8,3) à 80 volts. Após a eletroforese o gel foi incubado em solução de 250 mM de HCl durante cinco minutos sob

agitação, e então, foi desnaturado por duas vezes de 15 minutos em NaOH 0,5 N e NaCl 1,5 M e equilibrado por duas vezes de 15 minutos em solução Tris-HCl 0,5M, NaCl 3M pH 7,5. A membrana de nylon foi umedecida em água autoclavada e incubada em SSC 10 X por 20 minutos. A transferência foi realizada à vácuo por 90 minutos em tampão SSC 10X (NaCl 1,5M; citrato de sódio 0,15M pH 7,0), utilizando o aparelho Vacuum Blotter 785 da Bio Rad.

Após a transferência, a membrana foi lavada em SSC 6 X por 5 minutos e o DNA transferido para a membrana de nylon foi fixado por exposição à radiação ultravioleta a 150mJoules, utilizando o aparelho GS Gene Linker da Bio Rad.

Hibridização

A membrana foi pré-hibridizada à 42 °C por 1 hora em solução de pré hibridização (SDS 7%; fosfato de sódio 0,05M pH 7; formamida 50%; blocking reagente 2%; SSC 5X; N-lauroylsarcosine 0,1%). Esta solução foi substituída por solução de hibridização contendo a sonda específica para o SBMV, previamente desnaturada por aquecimento em banho-maria à 100 °C por 10 minutos seguido de imediato resfriamento. Após a incubação por 18 horas à 42 °C, a membrana foi lavada 2 vezes de 5 minutos cada com SSC 2X (SSC 1X=NaCl 0,15M; Citrato de sódio 0,015M, pH 7), contendo SDS 0,1% à

temperatura ambiente e duas vezes de 15 minutos cada com SSC 0,1X contendo SDS 0,1% à 68 °C.

Deteção dos Híbridos DNA-cDNA

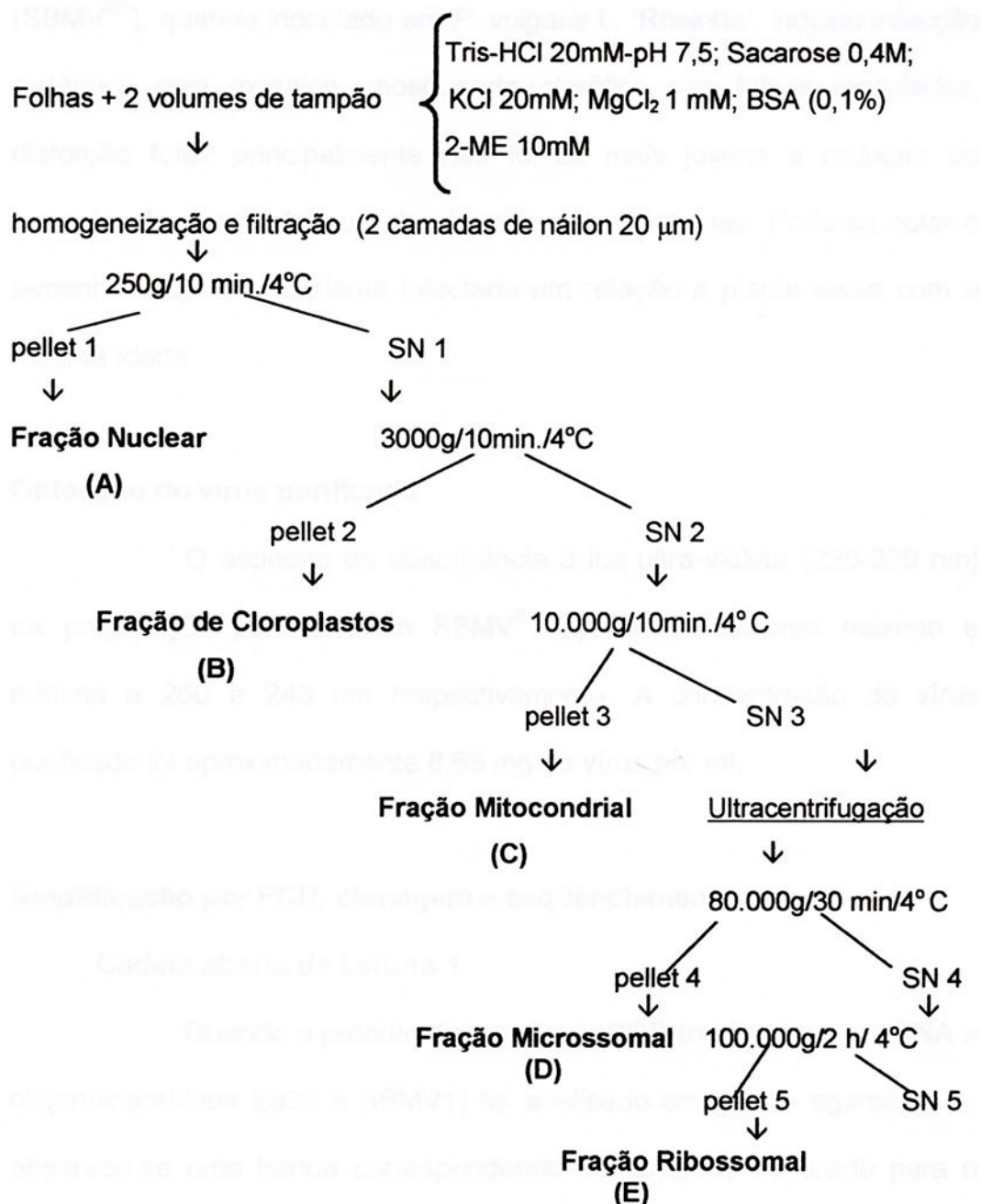
A detecção dos híbridos DNA-cDNA foi feita através de imunoensaio com antissoro monoclonal anti-digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina e posterior reação com o substrato quimioluminescente CDP-Star™, Amersham Life Science. A exposição foi realizada utilizando-se filme de raio X (X-OMAT, Kodak). Todos os passos da detecção foram realizados à temperatura ambiente e com agitação constante. Após a hibridização e lavagens de pós-hibridização, a membrana foi equilibrada em tampão 1 (ácido maleico 0,1M, NaCl 0,15M pH 7,5, Tween 20 0,3%) por 1 minuto.

A membrana foi então bloqueada em tampão 2 (tampão descrito acima com 1% de Blocking reagent) por 60 minutos. Em seguida a membrana foi incubada com anticorpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatase alcalina diluída 1:10.000 em tampão 2 por 60 minutos. A membrana foi então lavada 2 vezes de 15 minutos em tampão 1 e equilibrada por 2 minutos em tampão 3 (Tris-HCl 0,1 M pH 9,5; NaCl 0,1M, MgCl₂ 0,05M), sendo após incubada em substrato quimioluminescente CDP-Star™ e exposta à filme de raio X para visualização da marcação.

Fracionamento subcelular

O procedimento do fracionamento subcelular foi feito basicamente como descrito por Más *et al.* (2000).

Folhas de plantas inoculadas a 21 dias com o SBMV^{SP} e amostras de plantas sadias foram utilizadas conforme o esquema a seguir:



IV. RESULTADOS

Sintomatologia em *Phaseolus vulgaris* L. 'Rosinha'

O isolado brasileiro do *Southern bean mosaic virus* (SBMV^{SP}), quando inoculado em *P. vulgaris* L. 'Rosinha', induziu infecção sistêmica com mosaico, mosqueado clorótico nas folhas inoculadas, distorção foliar principalmente nas folhas mais jovens e redução do tamanho da planta. A figura 4 evidencia estes sintomas. Pode-se notar o tamanho reduzido da planta infectada em relação a planta sadia com a mesma idade.

Obtenção do vírus purificado

O espectro de absorbância à luz ultra-violeta (220-320 nm) da preparação purificada do SBMV^{SP} apresentou valores máximo e mínimo a 260 e 243 nm respectivamente. A concentração do vírus purificado foi aproximadamente 8,68 mg de vírus por ml.

Amplificação por PCR, clonagem e seqüenciamento

Cadeia aberta de Leitura 1

Quando o produto da reação de PCR (realizada com cDNA e oligonucleotídeos Ea39 e SBMV1) foi analisado em gel de agarose 1%, observou-se uma banda correspondendo ao tamanho esperado para o possível gene codificador da proteína do movimento, de

aproximadamente 591 pb (Figura 5). Após clonagem em vetor pUC18, bactérias *Escherichia coli* linhagem DH5 α foram transformadas e cinco clones selecionados. Os plasmídeos extraídos foram duplamente digeridos com as enzimas EcoRI e Bam HI liberando um fragmento de aproximadamente 591 pb (Figura 6A). A identidade viral do fragmento foi positivamente demonstrada por "Southern blot" e hibridização com sonda específica para o SBMV (Figura 6B).

O seqüenciamento do fragmento viral demonstrou a existência de uma região inicial não codificadora (92 nucleotídeos) e da cadeia aberta de leitura 1 (444 nucleotídeos, incluindo-se o códon de terminação UGA) com capacidade codificadora para uma proteína de 148 aminoácidos e massa molecular de 17080 Da. Nota-se a sobreposição das cadeias abertas de leitura 1 e 2 em 11 aminoácidos neste fragmento (Figura 7). O alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidos da possível proteína do movimento do SBMV^{SP} com outros sobemovirus é mostrado na figura 8.

Cadeia aberta de leitura 4

A reação de PCR (utilizando cDNA e os oligonucleotídeos SeqCP e Ea 29), ao ser observada em gel de agarose 1%, resultou na amplificação de um fragmento de 972 pb (Figura 9). Após clonagem em vetor pUC18, bactérias *Escherichia coli* linhagem DH5 α foram transformadas e cinco clones selecionados. Os plasmídeos extraídos foram duplamente digeridos com as enzimas EcoRI e Bam HI, resultando,

em análise em gel de agarose 1%, na liberação de dois fragmentos. Um fragmento de cerca de 422 pb e outro de 550 pb (Figura 10A), já que a sequência amplificada e clonada continha um sítio de restrição para a enzima Bam HI na posição 3714 a 3719. Estes fragmentos liberados do plasmídeo, assim como o plasmídeo contendo o gene da CP antes de ser digerido, reagiram positivamente ao serem hibridizados com uma sonda genômica específica para o SBMV (Figura 10B), comprovando serem produto de amplificação do gene da capa proteica clonado em pUC18.

A sequência de nucleotídeos e aminoácidos do fragmento viral de 972 pb é mostrado na figura 11. A figura 12 mostra o alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidos da capa proteica do SBMV^{SP} com outros sobemovirus.

A figura 13 resume os resultados da análise filogenética, realizada para as sequências de aminoácidos correspondentes às proteínas capsidiais de alguns sobemovirus, agrupando o SBMV^{SP} e SBMV^{Ark} em um mesmo ramo em 95% das réplicas. O agrupamento do SBMV^{SP} e SBMV^{Ark} apresentou-se fortemente relacionado com os isolados SBMV (92,2%) e SeMV (86,7%). Os demais sobemovirus foram agrupados mais distantemente.

A porcentagem de identidade de nucleotídeos e aminoácidos entre o isolado SBMV^{SP} e alguns outros sobemovirus está demonstrada na tabela 1.

O pareamento das primeiras bases da região 5' não codificadora do SBMV^{SP} e alguns outros sobemovirus mostrou ser complementar à região 3' terminal do RNA ribossomal de outros organismos, como mostrado na figura 14.

Na região N-terminal da sequência de nucleotídeos da cadeia aberta de leitura 4 do SBMV^{SP} não foi encontrado o "sinal de localização nuclear", existente no SBMV e SCPMV, vírus estes encontrados no núcleo. No alinhamento desta região (Figura 15) do SBMV^{SP} com as seqüências de outros sobemovirus (SBMV^{Ark}, SBMV^B e SCPMV), o SBMV^{SP} mostrou ser similar neste motivo ao SBMV^{Ark} e apresentou 5 aminoácidos a menos em relação ao SBMV^B e SCPMV.

Identificação do SBMV em frações subcelulares

A figura 16(1) refere-se à análise em gel de agarose dos RNAs presentes em cada uma das frações celulares obtidas de plantas 21 dias pós inoculação (d.p.i.) do vírus. O RNA extraído de partículas virais foi utilizado como referência. Uma banda na mesma posição do RNA genômico viral somente pode ser reconhecida na fração ribossomal e isto foi confirmado pelo "Northern blotting" e hibridização com a sonda para o genoma do SBMV (Figura 16(2)). Não houve reação com nenhuma das outras frações e nem com a fração ribossomal de planta sadia.

Tabela 1. Porcentagem de identidade de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) entre o isolado SBMV^{SP} e outras espécies e isolados do sobemovirus.

Isolado Comparado	Região 5' não Codificadora	Região 3' não Codificadora	Cadeia aberta de leitura 1(MP) nt aa	Cadeia aberta de leitura 4 (CP) nt aa
SBMV ^{ARK}	88	97	79 - 79	91- 93
SBMV	88	94	53 - 24	83 - 84
SeMV	76	29	43 - 34	76 - 75
SCPMV	43	22	21 - 12	66 - 66

Figura 4. Sintomatologia induzida pelo isolado brasileiro do Southern bean mosaic virus (SBMV^{SP}) em *Phaseolus vulgaris* "Brasilia". Planta infectada (esquerda) comparada com planta sã (direita).



Figura 5. Gel de agarose 1% evidenciando o fragmento de 891 pares de bases amplificado por PCR (gelina 1). Marcador de tamanho molecular

Figura 4. Sintomatologia induzida pelo isolado brasileiro do *Southern bean mosaic virus* (SBMV^{SP}) em *Phaseolus vulgaris* "Rosinha". Planta infectada (esquerda) comparada com planta sadia (direita).

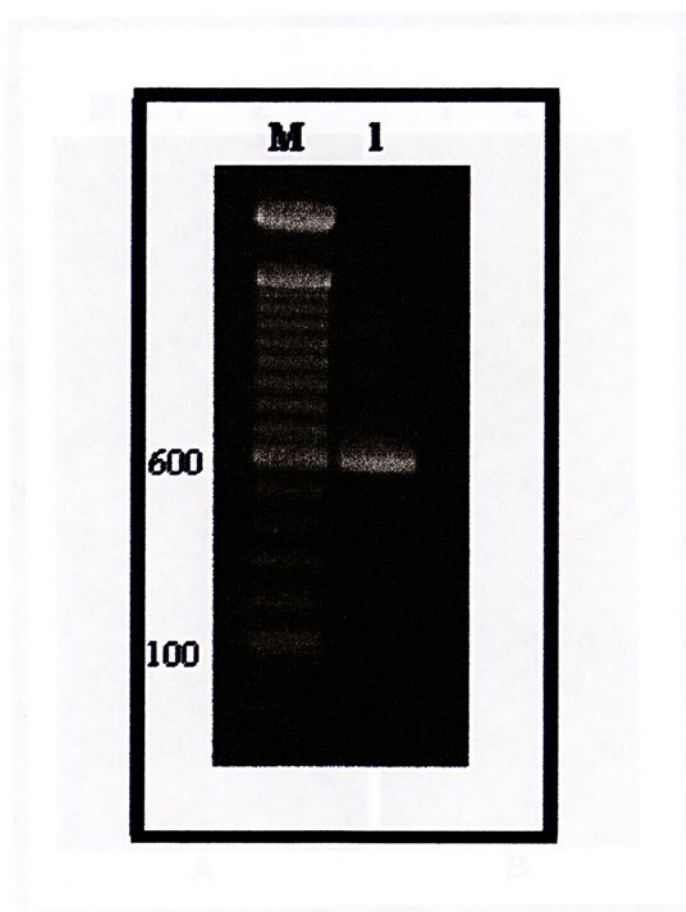


Figura 5. (A) Gel de agarose 1% mostrando a liberação do fragmento de 591 pares de bases amplificado por PCR (coluna 1). Marcador de tamanho molecular (M): 100 pares de bases (Gibco-BRL). (B) "Southern blot" no em gel similar realizado com sonda específica para o RNA genômico do SBMV.

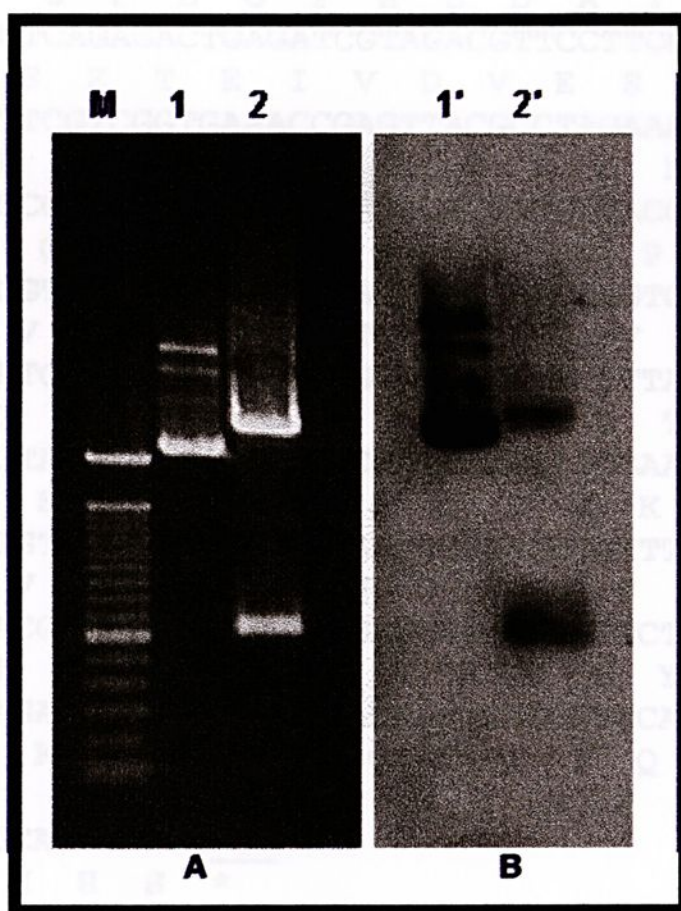


Figura 6. (A) Gel de agarose 1% mostrando a liberação do fragmento de 591 pb do plasmídeo pUC 18, utilizando as enzimas de restrição Eco RI e Bam HI. M: Marcador molecular 100pb (Gibco-BRL). 1 e 1'. Clone (Vetor recombinante) sem digerir. 2 e 2'. Clone digerido com as duas enzimas. **(B)** "Southern blot" de um gel similar hibridizado com sonda específica para o RNA genômico do SBMV.


```

001CACAAAATATAAGAAGGAAAGCTGGATTTCTACCTTTGT
041GTTTCCATTGTCGAAGCATTGGTCAATACTTATCAATTGG
081TGCATTGTTTCGCATGAGCTACCGATTCTTAGTAGTCAAAG
      M S Y R F L V V K A
121CCGTTGGTTTTCTTGGTTTCCATTCAGACGCTACTCGCAT
      V G F L G F H S D A T R I
161TCTGTCAGAGACTGAGATCGTAGACGTTCTTCGTCCATT
      L S E T E I V D V E S S I
201GATTTTCGTCGGTGAAACCGAGTTACGCCTAGAAAACGCTT
      D F V G E T E L R L E N A W
241GGCCCCAAGGTGGTGAGAGATACACTATCCTACCTAGGTT
      P Q G G E R Y T I L P R F
281CAACGTTTCAGATTGACTTCACGTACCATCCAGTGC GTGTC
      N V Q I D F T Y H P V R V
321GAGATCATCTGTAGGGTTTGTGCTACTTCCCTTACTGTTG
      E I I C R V C A T S L T V V
361TCTTTAGCAAGTGGA ACTTCCATTGCGAAAGGAAGGGCCA
      F S K W N F H C E R K G H
401TTTTGTGCCAGTAGACCAGAACGGGAATCTGTTTAGGGTT
      F V P V D Q N G N L F R V
441GGAACGCTCCGGGAGACGGGAGAGAAATACTTCTACTTCT
      G T L R E T G E K Y F Y F C
481GTGAGAAATCTATCTGCAGACAATGTATCATCCAGGCCGC
      E K S I C R Q C I I Q A A
      ORF2- M Y H P G R
521TCACCATCATTCTGA
      H H H S *
      S P S F L .....

```

Figura 7. Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da região 5' terminal do SBMV^{SP}. Os primeiros 92 nucleotídeos representam a região não codificadora. Os códons de iniciação (AUG) e de terminação (UGA) estão sublinhados. O códon de iniciação da cadeia aberta de leitura 2 (sobreposta na cadeia aberta de leitura 1) está duplamente sublinhado.

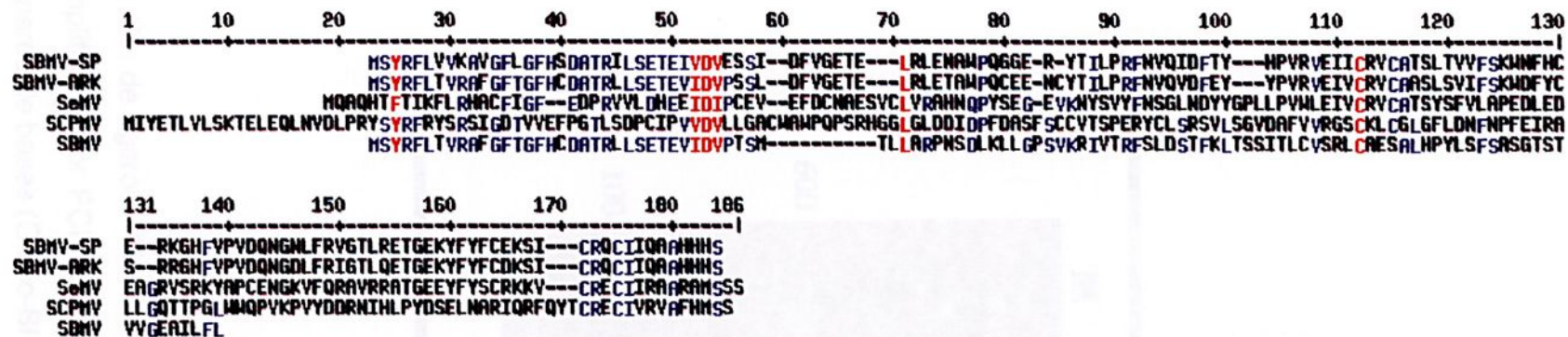


Figura 8. Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidos da possível proteína do movimento do SBMV^{SP} com outros sobemovirus realizado pelo programa Multalin do INRA (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>).

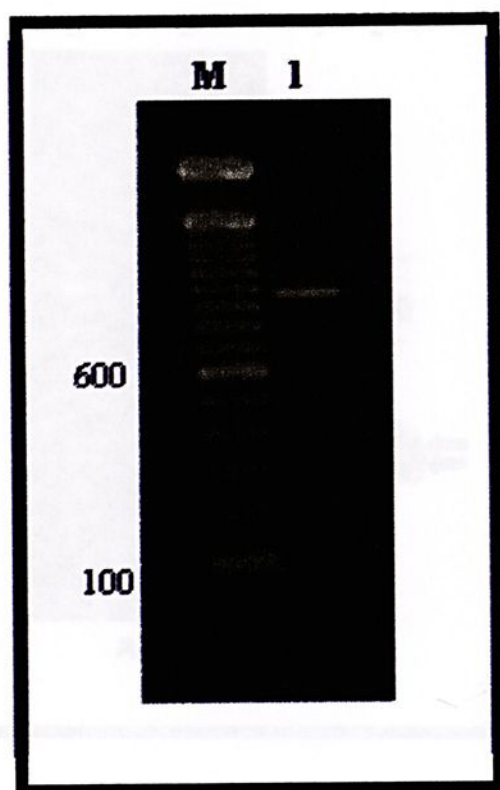


Figura 9. Gel de agarose 1% evidenciando o fragmento de 972 pares de bases amplificado por PCR (coluna 1). Marcador de tamanho molecular (M): 100 pares de bases (Gibco-BRL).

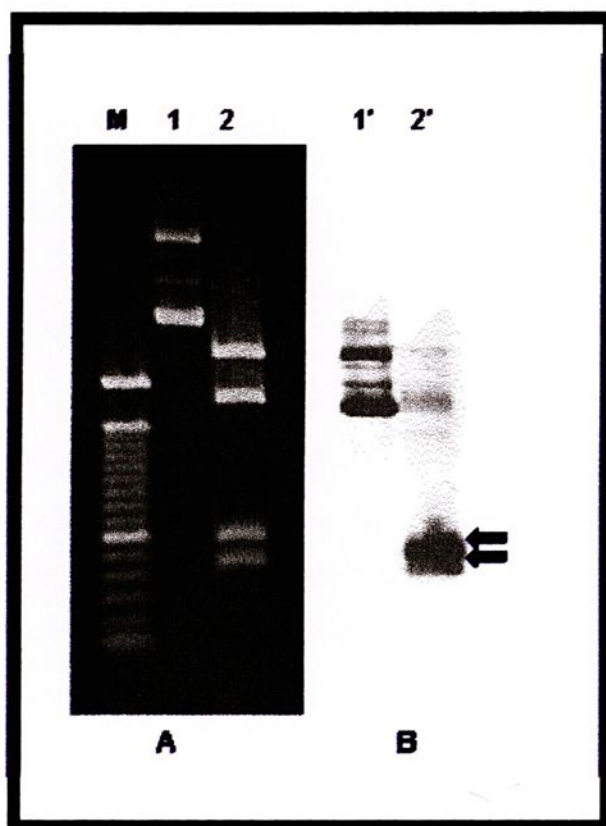


Figura 10. (A) Gel de agarose 1% mostrando a liberação de dois fragmentos (setas) de um clone, após a digestão dupla do vetor recombinante utilizando as enzimas de restrição Eco RI e Bam HI. M: Marcador molecular 100pb (Gibco-BRL). 1 e 1'. Clone (Vetor recombinante) sem digerir. 2 e 2'. Clone digerido com as duas enzimas. **(B)** "Southern blot" de um gel similar hibridizado com sonda específica para o RNA genômico do SBMV.

Figura 11. Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da região 3' terminal do 58S. Os últimos 126 nucleotídeos representam a região não codificada. Os

códons de iniciação (AUG) e de terminação (UAA, UAG, UGA) da cadeia aberta da leitura 1 estão sublinhados. Os últimos 67 aminoácidos da cadeia aberta da leitura 2 (sobrepostos na cadeia aberta da leitura 1) estão mostrados na linha inferior dos aminoácidos da cadeia aberta da leitura 1. O código de terminação da cadeia aberta da leitura 2 está duplamente sublinhado.

Figura 12. Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da região 3' terminal do 58S. Os últimos 126 nucleotídeos representam a região não codificada. Os

Figura 11. Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos da região 3' terminal do SBMV^{SP}. Os últimos 129 nucleotídeos representam a região não codificadora. Os códons de iniciação (AUG) e de terminação (UGA) da cadeia aberta de leitura 4 estão sublinhados. Os últimos 61 aminoácidos da cadeia aberta de leitura 2 (sobreposta na cadeia aberta de leitura 4) estão mostrados na linha inferior aos dos aminoácidos da cadeia aberta de leitura 4. O códon de terminação da cadeia aberta de leitura 2 está duplamente sublinhado.

001ATGGCGAAGAGGCTGACAAAACAACAGTTAGCCAAGGCTA
 M A K R L T K Q Q L A K A I
 ORF2 G E E A D K T T V S Q G Y
 041TAGCGAACACTCTGGAAGCCCCGGCCACTCAATCGAGGAG
 A N T L E A P A T Q S R R
 S E H S G S P G H S I E E
 081GCCCAGGAACCGGAGACGGCGCCGTTCTGCTGCAAGGCAG
 P R N R R R R R S A A R Q
 A Q E P E T A P F C C E A A
 121CCTCAGTCTATCCAGGCTGGGGCATCCATGGCCCCCTATTG
 P Q S I Q A G A S M A P I A
 S V Y P G W G I H G P Y C
 161CTCAGGGGGCTATGGTTTCGCTTACGTGAACCATCGCTTAG
 Q G A M V R L R E P S L R
 S G G Y G S L T *
 201AACGGCTGGAGGAGTGACTGTCTTGACGCACTCTGAGCTC
 T A G G V T V L T H S E L
 241TCAACAGAGCTTGCTGTGACGAATGCGATAGTTGTCTCTT
 S T E L A V T N A I V V S S
 281CTGAGCTTGTCATGCCCTTCACAAATGGGCACTTGGCTTCG
 E L V M P F T M G T W L R
 321AGGCGTGGCGGCCAATTGGTCGAAGTACAGTCTGTTTTCA
 G V A A N W S K Y S L F S
 361GTGAGTATACTTACCTCCCCTCTTGTCTTCAACGACAT
 V R Y T Y L P S C P S T T S
 401CTGGGTCCATTTCATATGGGTTTCCAATATGATATGGCTGA
 G S I H M G F Q Y D M A D
 441CACTCTTCCCGTATCCGTTAACCAGTTATCCAACCTTAGA
 T L P V S V N Q L S N L R
 481GGCTATGTGTCAGGGCAGGTCTGGTCTGGATCCTCTGGAT
 G Y V S G Q V W S G S S G L
 521TGTGCTATATAAATGGCACGAGGTGTTCTGACACCGCCAA
 C Y I N G T R C S D T A N
 561CGCTATCACGACCACTTTGGACGTTGCAAAGCTTGGTAAG
 A I T T T L D V A K L G K
 601AAGTGGTATCCTTTCAAGACCAGTACGGACTTCACTGCCG
 K W Y P F K T S T D F T A A
 641CTGTTGGCGTAATAGTCAACATTGCTACTCCCCTGGTCCC
 V G V I V N I A T P L V P
 681GGCTAGGCTAGTGATAGCCATGCTGGATGGGTCGAGTTCT
 A R L V I A M L D G S S S
 721ACGGCTGTGAGTACTGGACGCCTATACGTGTCGTACACTG
 T A V S T G R L Y V S Y T V
 761TACAGCTAATTGAGCCGACTGCCTTGGCCTTAAACAAC TG
 Q L I E P T A L A L N N *
 801AGGAGTTGTATAATAATACCTGCACCCTTCTCTTTGGCAG
 841GGAGGGTGTTCGTTTTTCACAATGCCACGCGCTTGAGGGA
 881GAATGCACGTTAATCATCCCTCCGCTAGTGATGGAGCGTA
 921ATCCAAAAGT

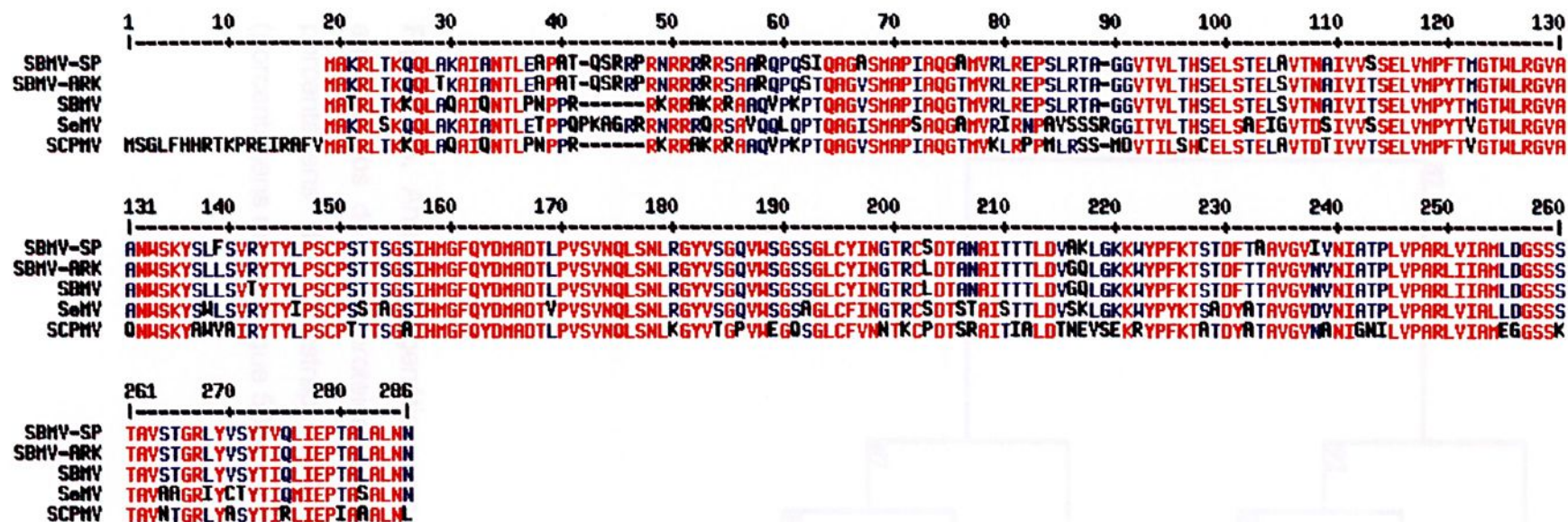


Figura 12. Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidos da capa proteica do SBMV^{SP} com outros sobemovirus realizado pelo programa Multalin do INRA (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>).

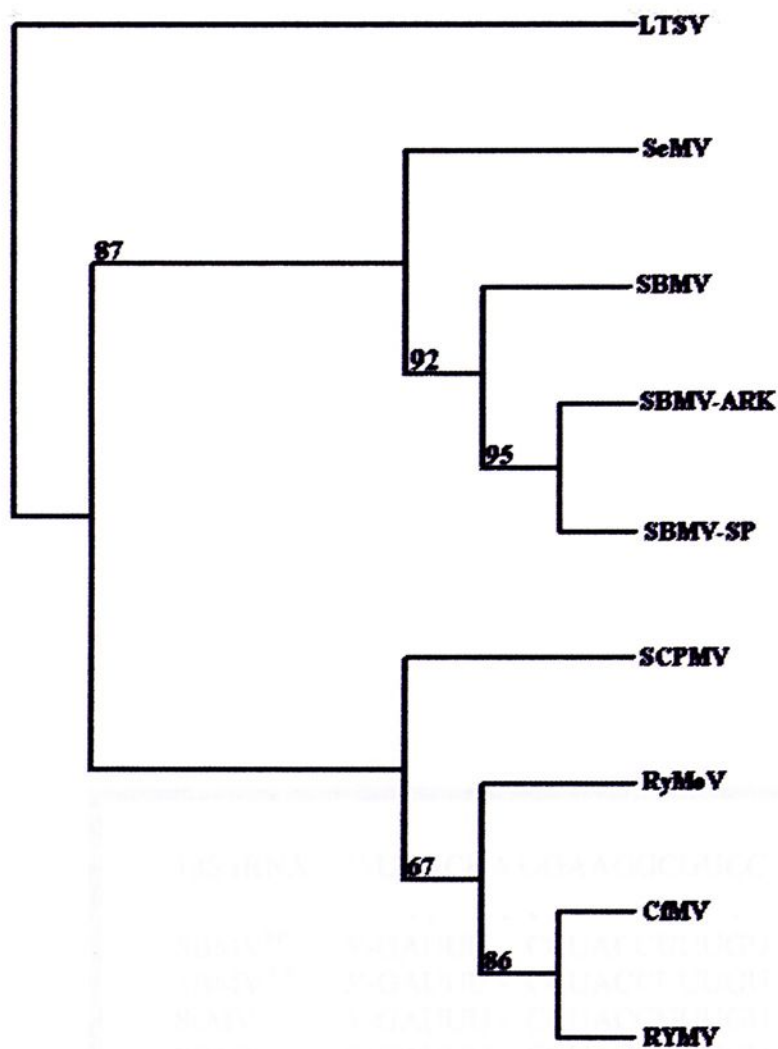


Figura 13. Análise filogenética com base na sequência completa de aminoácidos da capa proteica do SBMV^{SP} e outros sobemovirus. As porcentagens de "bootstrap" são indicadas nos braços da árvore (porcentagens menores que 50% não são mostradas).

18S rRNA	3'-UUACUA GGAAGGCGUCC
	•• • ••• •• •
SBMV ^{SP}	5'-GAUUU - CCUACCUUUGU
SBMV ^{Ark}	5'-GAUUU - CCUACCUUUGU
SeMV	5'-GAUUU - CCUACCUUUGU
SBMV	5'-GAUUU - CCUACCUUUGU
SCPMV	5'-GAUUUU CCUACCUUUGU

Figura 14. Pareamento de bases da região 5' não codificadora de alguns sobemovirus mostrando o consenso (pontos) complementar com a seqüência da região 3' terminal do RNA ribossomal de outros organismos (Hagenbüchle *et al.*, 1978).

SBMV ^{SP}	TKQQLAKAIANTLEAPATQSRRPRNRRR
SBMV ^{Ark}	TKQQLTKAIANTLEAPATQSRRPRNRRR
SBMV	TKKQLAQAIQNTLPNPP__RRKRRA__
SCPMV	TKKQLAQAIQNTLPNPP__RRKRRA__
	** *****

Figura 15. Alinhamento do "sinal de localização nuclear" na sequência de aminoácidos do SBMV^{SP}, SBMV^{Ark}, SBMV, SCPMV. Os asteriscos indicam resíduos de aminoácidos que caracterizam o sinal de localização nuclear do tipo bipartido.

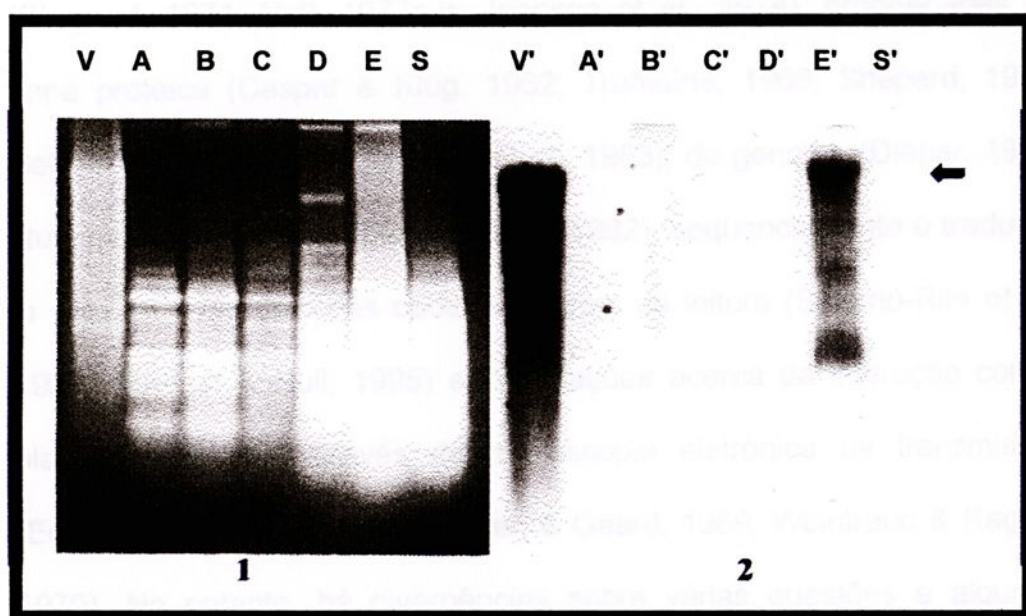


Figura 16. Localização subcelular do SBMV^{SP} por centrifugação diferencial de folhas de feijoeiro infectadas. **1.** Análise eletroforética em gel desnaturante de agarose-formaldeído do RNA viral (**V**), dos RNAs extraídos das frações subcelulares obtidas de planta 21 dias pós inoculação (d.p.i.) do SBMV (**A-E**) e da fração ribossomal de planta sadia (**S**). As linhas **A-E** correspondem respectivamente as frações: nuclear, cloroplastos, mitocondrial, microssomal, e ribossomal da planta infectada. **2.** Análise por hibridização “Northern blotting” de um gel similar ao **1** hibridizado com sonda específica ao genoma do SBMV. **V'**, alíquota do RNA extraído do vírion. **A'-E'**, RNAs extraídos das frações subcelulares obtidas de planta 21 d.p.i. **S'**, RNAs extraídos da fração ribossomal de planta sadia. A seta indica o RNA genômico viral.

V. DISCUSSÃO

O isolado americano do *Southern bean mosaic virus* já se encontra bem caracterizado, havendo relatos sobre a estrutura do virion (Sheperd, 1971; Hull, 1977a,b; Johnson *et al.*, 1974), propriedades da capa proteica (Caspar & Klug, 1962; Tremaine, 1966; Sheperd, 1971; Sehgal & Hsu, 1977; Rossmann *et al.*, 1983), do genoma (Diener, 1965; Rutgers *et al.*, 1980; Weber & Sehgal, 1982), seqüenciamento e tradução *in vitro* de cada uma das cadeias abertas de leitura (Salerno-Rife *et al.*, 1980; Othman & Hull, 1995) e informações acerca da interação com a planta hospedeira através de microscopia eletrônica de transmissão (Edwardson *et al.*, 1966; de Zoeten & Gaard, 1969; Weintraub & Ragetti, 1970). No entanto, há divergências sobre várias questões e algumas ainda não foram elucidadas como, por exemplo, o sítio de replicação do SBMV na planta hospedeira, o mecanismo de transporte viral dentro desta, o papel dos fragmentos heterogêneos de RNA presentes nas partículas virais e a função e o número correto das cadeias abertas de leitura do SBMV.

Por outro lado, em relação aos isolados brasileiros do SBMV, pouco é conhecido pois, desde a primeira descrição (Cupertino *et al.*, 1982), estes têm sido pouco estudados, principalmente do ponto de vista molecular. No Brasil, o SBMV foi detectado primeiramente no Distrito Federal (SBMV^{DF}) (Cupertino *et al.*, 1982) e, posteriormente, o vírus

também foi encontrado no Estado de São Paulo (SBMV^{SP}) (A. S. Costa. Dados não publicados) e, mais recentemente, no Estado do Paraná (Gasparin, 2002). No entanto, devido à facilidade de transmissão dos vírus pertencentes ao gênero (Zaumeyer & Harter, 1943; Sehgal, 1981; Brunt *et al.*, 1996), pode-se aventar que a distribuição geográfica do SBMV pelo Brasil seja mais ampla.

Os genes da possível proteína do movimento e da capa proteica viral, quando comparados com seqüências depositadas no GenBank (resultados apresentados na Tabela 1 e alinhamentos nas figuras 8 e 12), evidenciam que o isolado do "*Southern bean mosaic virus*" encontrado em São Paulo (SBMV^{SP}) é mais proximamente relacionado ao isolado "Arkansas" descrito nos EUA ("SBMV^{Ark}"; Lee & Anderson, 1998). Levando-se em consideração o gene da capa proteica (cadeia aberta de leitura 4), que normalmente é mais conservado entre isolados de um mesmo vírus, existe entre esses isolados 91% de identidade na seqüência de nucleotídeos e 93% de identidade na seqüência de aminoácidos (aminoácidos iguais) chegando a 95% de similaridade quando se considera os aminoácidos pertencentes a um mesmo grupo químico. Em ordem decrescente de similaridade estão o SBMV (Othman & Hull, 1995), o "*Sesbania mosaic virus*" (SeMV) e o "*Southern cowpea mosaic virus*" (SCPMV). A análise filogenética (Figura 13) realizada para as seqüências de aminoácidos correspondentes as proteínas capsidiais de alguns sobemovirus agrupou o SBMV^{SP} e SBMV^{Ark} em um mesmo ramo em 95%

das réplicas, confirmando a proximidade entre eles. O agrupamento do SBMV^{SP} e SBMV^{Ark} apresentou-se fortemente relacionado com os isolados SBMV (92,2%) e SeMV (86,7%). Os demais sobemovirus foram agrupados mais distantemente.

A análise da região 5' não codificadora do SBMV^{SP} evidencia a presença de 92 nucleotídeos precedendo o códon de iniciação da cadeia aberta de leitura 1. O RNA do SBMV^{SP} tem um conteúdo relativamente baixo de G + C (38%) semelhante às regiões 5' não codificadoras de outros sobemovirus (SBMV^{Ark}, 39%; SBMV, 37%; SCPMV, 33% e SeMV, 38%) e de outros genomas virais (Alquist *et al.*, 1981; Briand *et al.*, 1978; Koper-Zworthoff *et al.*, 1980). Dentro da região 5' não codificadora há um segmento parcialmente complementar ao RNA ribossomal 18S (Figura 14), sugerindo um possível papel na ligação do ribossomo (Hagenbüchle *et al.*, 1978). Este possível sítio de ligação ao ribossomo está localizado a distâncias variáveis do código de iniciação da cadeia aberta de leitura 1 sendo 52 nt para o SBMV^{SP}, SBMV^{Ark} e SBMV, 36 nt para o SeMV e 5 nt para o SCPMV (Lee & Anderson, 1998; Othman & Hull, 1995; Lokesh *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 1987).

A cadeia aberta de leitura 1 do SBMV^{SP} tem início no nucleotídeo 93 (códon AUG) e termina na posição 534 (códon TGA) (Figura 7). A seqüência dos 441 nucleotídeos apresenta 79% de homologia com o SBMV^{Ark} e identidade de aminoácidos de 79% (similaridade de 90%). Em relação a outros sobemovirus, há pouca

identidade de nucleotídeos e aminoácidos dentro da cadeia aberta de leitura 1 (Tabela 1). A função da proteína codificada pela cadeia aberta de leitura 1 é ainda desconhecida, mas tem sido proposta sua participação no movimento viral entre células (Othman & Hull, 1995). A baixa homologia na cadeia aberta de leitura 1 entre diferentes sobemovirus corrobora resultados anteriores para outros gêneros de vírus, onde as proteínas relacionadas com o movimento viral mostram pouca homologia, porém, apresentam funções biológicas semelhantes (Melcher, 1990). A cadeia aberta de leitura 1 do SBMV^{SP} codifica uma proteína contendo 147 aminoácidos com massa molecular estimada em 17080 Da. Isso constitui uma diferença de uma trinca de nucleotídeos e um aminoácido a menos do que o isolado SBMV^{Ark}. Se essa diferença é significativa ainda está por ser determinado mas, levando-se em conta que essa proteína está relacionada com o movimento do vírus de célula-à-célula (Othman & Hull, 1995; Sivakumaran *et al.*, 1998; Bonneau *et al.*, 1998), e os dois isolados provocam infecção sistêmica, a perda deste aminoácido não deve ser responsável pela mudança na função da proteína.

A extremidade 5' da cadeia aberta de leitura 2 do SBMV^{SP} sobrepõe a cadeia aberta de leitura 1 em 34 nucleotídeos (Figura 7), sendo semelhante ao SBMV^{Ark}. Assim, a organização genômica dos dois isolados, nessa região, se dispõe igualmente, o que reforça a idéia de Lee & Anderson (1998), de que deve ter ocorrido erros no seqüenciamento feito para o isolado americano do SBMV por Othman & Hull (1995), onde

o isolado apresenta somente 3 cadeias abertas de leitura que não se sobrepõem.

A cadeia aberta de leitura 4 do SBMV^{SP} contém 801 nucleotídeos, incluindo-se o códon de terminação TGA, com sequência deduzida de 266 aminoácidos e massa molecular de 28.800 Da (Figura 11), sendo semelhante à cadeia aberta de leitura 4 do SBMV-B^{ARK}, que codifica a proteína capsidial (Lee & Anderson, 1998). A identidade da sequência de nucleotídeos da cadeia aberta de leitura 4 entre os isolados SBMV^{SP} e SBMV^{ARK} é de 91% e a de aminoácidos 93%, com similaridade de 95%. Analisando a Tabela 1, nota-se claramente que a cadeia aberta de leitura 4 é mais conservada entre os isolados do que a cadeia aberta de leitura 1. Os 61 aminoácidos terminais da cadeia aberta de leitura 2 sobrepõem a cadeia aberta de leitura 4 e apresentam 92% de homologia com o SBMV^{ARK}.

A região 3' não codificadora do SBMV^{SP} apresenta 129 nucleotídeos (Figura 11) e, ao ser comparada com outras espécies de sobemovirus, apresentou 97% de identidade com o isolado Arkansas, 94% com o SBMV, 29% com o SeMV e 22% com o SCPMV (Tabela 1).

O domínio R, localizado próximo à região 5' da cadeia aberta de leitura 4, é uma porção da cadeia polipeptídica rica em arginina, lisina, prolina e glutamina e situa-se no interior da partícula onde interage com o RNA (Abad-Zapatero *et al.*, 1980; Tremaine *et al.*, 1981, 1982; Hermodson *et al.*, 1982; Kruse *et al.*, 1982). Nessa região, os genomas do

SBMV e do SCPMV apresentam um "sinal de localização nuclear" (Dingwall & Laskey, 1991), o qual poderia estar relacionado com a ocorrência de partículas desses vírus no núcleo celular (de Zoeten & Gaard, 1969). O alinhamento (Figura 15) das regiões do domínio R do SBMV^{SP}, SBMV^{ARK}, SBMV e SCPMV, mostrou haver diferença não só no número (cinco a mais no SBMV^{SP} e SBMV^{ARK}) como na sequência de nucleotídeos. Os vírus SBMV e SCPMV possuem o sinal de localização nuclear do tipo bipartido (consenso: (K/R)₂ X₁₀₋₁₂ (K/R)₃) enquanto o SBMV^{SP} e o SBMV^{ARK} são destituídos desse sinal.

Devido à essas diferenças, tornou-se de interesse determinar se o SBMV^{SP} ocorreria no núcleo celular. Para isso, foi realizado o fracionamento celular por centrifugação diferencial utilizando extratos de planta infectada, que possibilitou a localização subcelular de RNAs virais por posterior "Northern blotting" e hibridização com a sonda específica para o genoma do SBMV^{SP}. Os resultados mostraram que o SBMV^{SP} é localizado somente no citoplasma, corroborando resultados anteriores de microscopia eletrônica de transmissão (Moreira, 2001). Muito embora não haja estudos nessa direção com o SBMV^{ARK}, os resultados aqui obtidos parecem indicar uma estreita correlação entre a ausência de partículas do SBMV^{SP} no núcleo e a inexistência do sinal de localização nuclear na região do domínio R.

A ausência do SBMV^{SP} no núcleo é ainda mais instigante levando-se em conta o fato de que Muñoz e Kitajima (1990) citaram a

presença de partículas do isolado do SBMV, encontrado no Distrito Federal, no núcleo celular. Isso abre a possibilidade de que ocorram diferentes isolados do SBMV no Brasil. O seqüenciamento do gene da proteína capsidial do SBMV^{DF} poderá elucidar esses dados.

VI. CONCLUSÕES

- 01.** O SBMV^{SP} apresenta uma região não codificadora na extremidade 5' do genoma com 92 nucleotídeos.
- 02.** A cadeia aberta de leitura 1 possui 441 nucleotídeos com sobreposição das cadeias abertas de leitura 1 e 2 em 11 aminoácidos.
- 03.** A cadeia aberta de leitura 4 do SBMV^{SP} possui 801 nucleotídeos e há sobreposição de 61 aminoácidos das cadeias abertas de leitura 2 e 4.
- 04.** O SBMV^{SP} apresenta uma região não codificadora na extremidade 3' do genoma com 129 nucleotídeos.
- 05.** O vírus estudado é similar ao isolado "Arkansas" descrito nos E.U.A.
- 06.** O SBMV^{SP} apresenta, dentro da região 5' não codificadora, um segmento parcialmente complementar à região 3' terminal do RNA ribossomal.
- 07.** O "sinal de localização nuclear" não é encontrado na região N-terminal da sequência de nucleotídeos da cadeia aberta de leitura 4 do SBMV^{SP} diferentemente do SBMV e SCPMV.
- 08.** O SBMV^{SP} não é encontrado nos cloroplastos, microssomos, mitocôndrias e núcleos de células de feijoeiro infectados.
- 09.** RNAs associados ao SBMV^{SP} são encontrados na fração ribossomal.

VII. RESUMO

No presente trabalho, um isolado do *Southern bean mosaic virus* encontrado em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) no Estado de São Paulo (SBMV^{SP}) teve as regiões terminais 5' e 3' seqüenciadas. A extremidade 5' não codificadora possui 92 nucleotídeos e dentro dessa região há um segmento parcialmente complementar à região 3' terminal do RNA ribossomal de outros organismos. A cadeia aberta de leitura 1 que codifica para uma possível proteína do movimento possui 441 nucleotídeos e sobrepõe a cadeia aberta de leitura 2 em 11 aminoácidos. A cadeia aberta de leitura 4 codifica para a capa proteica viral, possui 801 nucleotídeos e apresenta sobreposição da cadeia aberta de leitura 2 em 61 aminoácidos, corroborando a idéia de que o SBMV possui 4 cadeias abertas de leitura (Lee & Anderson, 1998). Na região N-terminal da seqüência de nucleotídeos da cadeia aberta de leitura 4 do SBMV^{SP} não foi encontrado o "sinal de localização nuclear" existente no SBMV e SCPMV, vírus estes encontrados no núcleo. A ausência do isolado brasileiro no núcleo pode ser explicada pela ausência do sinal. O SBMV^{SP} foi encontrado somente no citoplasma, na fração ribossomal. Os resultados evidenciaram que o isolado brasileiro é mais proximamente relacionado ao isolado "Arkansas" descrito nos E.U.A., apresentando 91% de identidade na seqüência de nucleotídeos em relação à capa proteica e 80% se comparada a possível proteína do movimento.



VIII. ABSTRACT

In the present work, an isolate of *Southern bean mosaic virus* found in the bean (*Phaseolus vulgaris*) in the State of São Paulo (SBMV^{SP}) had the 5' and 3' terminal regions sequenced. The extremity 5' non-coding contains 92 nucleotides and inside this region it has a segment partially complementary to the 3' terminal region of the ribosomal RNA of other organisms. The open reading frame 1, that codifies for a putative movement protein, has 441 nucleotides and overlaps open reading frame 2 in 11 amino acids. The open reading frame 4 codifies for the coat protein and contains 801 nucleotides and overlaps open reading frame 2 in 61 amino acids, corroborating the idea that the SBMV has 4 open reading frames (Lee & Anderson, 1998). In the N-terminal region of the nucleotide sequence of the open reading frame 4 of the SBMV^{SP}, no "nuclear localization signal", similar to those of SBMV and SCPMV, found in the nucleus, was detected. The fact that the Brazilian isolate is not found inside the nucleus can be explained by the absence of that signal. The SBMV^{SP} was only found in the cytoplasm, in the ribosomal fraction. The results demonstrated that the Brazilian isolated is related to the "Arkansas" isolate described in the U.S.A, having 91% of identity in the nucleotide sequence of the coat protein and 80% if compared with the putative movement protein.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-ZAPATERO, C.; ABDEL-MEGUID, S.S.; JOHNSON, J.E.; LESLIE, A.G.W.; RAYMENT, I.; ROSSMAN, M.G.; SUCK, D.; TSUKUHARA, T. Structure of Southern bean mosaic virus at 2.8 angstrom resolution. **Nature**, v.286, p.33-39, 1980.

AHLQUIST, P.; LUCKOW, V. & KAESBERG, P. Complete nucleotide sequence of Brome mosaic virus RNA3. **Journal Molecular Biology**, v. 153, p. 23-28, 1981.

BASHIR, M.; HAMPTON R. O. Natural occurrence of five seedborne cowpea viruses in Paquistan. **Plant Disease**, v. 77, p. 948-951, 1993.

BENNETT, C. W.; COSTA, A. S. Sowbane mosaic caused by seed-transmitted virus. **Phytopatology**, v. 51, p. 546-550, 1961.

BERGER, P. H.; TOLER, R. W. Quantitative immunoelectrophoresis of panicum mosaic virus and strains of St. Augustine decline. **Phytopathology**, v. 73, p. 185, 1983.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças de feijoeiro. In: Kimati, h., Amorin, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A., Rezende, J.A.M. (Eds.) Manual de Fitopatologia, 3rd ed., Agronômica Ceres, 1997. Pp. 376-399.

BONNEAU, C.; BRUGIDOU, C.; CHEN, L.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. Expression of the rice yellow mottle virus P1 *in vitro* and *in vivo* and its involvement in virus spread. **Virology**, v. 244, p. 79-86, 1998.

BRIAND, J-P.; KEITH, G.; GUILLEY, H. Nucleotide sequence at the 5' extremity of Turnip yellow mosaic virus genome and coat mRNA. **Proceedings of National Academy of Science, USA**, v.75, p.3168-3172, 1978.

BRISCO, M. J.; HULL, R.; WILSON, T. M. A. Southern bean mosaic virus-specific proteins are synthesized an *in vitro* system supplemented with intact, treated virions. **Virology**, v. 143, p. 392-398, 1985.

BRUNT, A. A.; CRABTREE, K.; DALLWITZ, M. J.; GIBBS, A. J.; WATSON, L.; ZURKER, E. J. Bean southern mosaic *sobemovirus*. **Plant Virus Online: description and lists from VIDE Database**, Version: 20th, 1996. Disponível em: <<http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>>.

CAMARGO, I. J. B.; KITAJIMA, E. W.; COSTA, A. S. Vírus do mosaico comum e mosaico amarelo do feijoeiro. **Bragantia**, v. 27, p. 409-420, 1968.

CAMARGO, I. J. B.; KITAJIMA, E. W.; COSTA, A. S. Microscopia eletrônica do vírus do mosaico em desenho do feijoeiro *in situ*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 1, p. 207-214, 1976.

CASPAR, D. L. D.; KLUG, A. Physical principles in the construction of regular viruses. **Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology**, v. 27, p. 1-24, 1962.

CHEO, P. C. Effect of seed maturation on inhibition of southern bean mosaic virus in bean. **Phytopathology**, v. 45, p. 17-21, 1955.

CHRISTOPHE, D.; CHRISTOPHE-HOBERTUS, C.; PICHON, B. Nuclear targeting of proteins: how many different signals? **Cellular Signalling**, v. 12, p. 337-341, 2000.

COSTA, A. S. Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat of widespread virus infection of legume crops in Brazil. In: **Tropical disease of legume** (Bird, J. & Maramorosch, K., eds.). New York, Academic Press, p. 27-49, 1975.

COSTA, C. L.; BATISTA, M. F. Viroses transmitidas por coleópteros no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 4, p. 177-179, 1979.

COSTA, A. F.; COSTA, C. L. Efeitos de infecções simples e duplas de quatro vírus sobre a produção e algumas características da planta do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Fitopatologia Brasileira**, v. 8, p. 616, 1983.

COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W.; MIYASAKA, S.; ALMEIDA, L. D. Moléstias de feijoeiros causadas por vírus. In: **I Simpósio Brasileiro do Feijão/ Viçosa, Anais** (Vieira, C., ed). Imprensa Univ., p. 342-384, 1972.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification on of flowering plants**. Columbia University Press, New York, 1981. 1262p.

CULTURA-FEIJÃO; Bahia, 2000. Disponível em
<<http://www.seagri.ba.gov.br/feijão1.htm>>

CUPERTINO, F. P.; LIN, M. T.; KITAJIMA, E. W.; COSTA, C. L. Occurrence of southern bean mosaic virus in central Brazil. **Plant Disease**, v. 66, p. 742-743, 1982.

de ZOETEN, G.A.; GAARD, G. Possibilities for inter- and intracellular translocation of some icosahedral plant viruses. **Journal of Cell Biology**, v.40, p. 814-823, 1969.

DIENER, T. O. Isolation of infectious ribonucleic acid from southern bean mosaic virus. **Virology**, v. 27, p. 425-429, 1965.

DINGWALL, C.; LASKEY, R.A. Nuclear targetting sequence - A consensus. **Trends Biochemistry Science**, v.16, p.478-481, 1991.

DODDS, J. A.; MORRIS, T. J.; JORDAN, R. L. Plant viral double-stranded RNA. **Annual Review of Phytopathology**, v. 22, p. 151-168, 1984.

EDWARDSON, J. R.; PURCIFULL, D. E.; CHRISTIE, R. G. Electron microscopy of two small spherical plant viruses in thin sections. **Canadian Journal of Botany**, v. 44, p. 821-826, 1966.

ERICKSON, J. W.; ROSSMANN, M. G. Assembly and crystallization of a T = 1 icosahedral particle from trypsinized southern bean mosaic virus coat protein. **Virology**, v. 116, p. 128-136, 1982.

FAUQUET, M.C.; MAYO, M.A. Abbreviations for plant virus names. **Archives of Virology**, v.144, p.1249-1273, 1999.

FICHA TÉCNICA-FEIJÃO, 2000. Disponível em <http://www.consulcoop.com.agr.produtosfeijão.htm>.

FRANCKI, R. I. B.; RANGLES, J. W.; CHU, P. W. G.; ROHOZINSKI, J., HATTA, T. Viroid-like RNAs incorporated in conventional virus capsids. In: **Subviral Pathogens of Plants and Animals: Viroids and Prions** (Maramorosch, K., McKelcey, J. J., eds.), Academic Press, p. 265-297, 1985a.

FRANCKI, R. I. B.; MILNE, R. G.; HATTA, T. Sobemovirus group. In: **Atlas of Plant Viruses**. CRC Press, Boca Raton, Fl., v.1, p. 153-169, 1985b.

FUENTES, A. L. First report of southern bean mosaic virus in Nicaragua. **Plant Disease**, v. 74, p. 938 (res.), 1990.

FULTON, H. P.; SCOTT, H. A.; GAMEZ, R. Beetle transmission of legume viruses. In: **Tropical Diseases of Legumes** (Bird, J., Maramorosch, K., eds.), Academic Press, p. 123-31, 1975.

GAIKWAD, D. G.; THOTTAPPILLY, G. Occurrence of southern bean mosaic virus on cowpea in Senegal. **Phytopathology**, v. 121, p. 366-369, 1988.

GAMEZ, R. Las enfermedades virales como factores limitantes en la producción de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en America Latina. **Fitopatologia (Lima)**, v. 12, p. 24-26, 1977.

GARNIER, M.; MAMOUM, R.; BOVÉ, J. M. TYMV RNA replication *in vivo*: Replicative intermediate is mainly single stranded. **Virology**, v. 104, p. 357-374, 1980.

GASPARIN, M.D.G. **Deteção e caracterização parcial de um isolado do Vírus do Mosaico do Feijoeiro do Sul, no Paraná**. Maringá, 2002. 41 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá.

GHABRIAL, S. A.; SHEPHERD, R. J.; GROGAN, R. G. Chemical properties of three strains of southern bean mosaic virus. **Virology**, v. 33, p. 15-25, 1967.

GHOSH, A.; DASGUPTA, R.; SALERNO-RIFE, T.; RUTGERS, T.; KAESBERG, P. Southern bean mosaic virus has a 5'-linked protein but lacks 3' terminal poly(A). **Nucleic Acids Research**, v. 7, p. 2137-2146, 1979.

GHOSH, A.; RUTGERS, T.; MANG, K. Q.; KAESBERG, P. Characterization of coat protein mRNA of southern bean mosaic virus and its relationship to the genomic RNA. **Journal of Virology**, v. 39, p. 87-92, 1981.

GIVORD, L. Southern bean mosaic virus isolated from cowpea (*Vigna unguiculata*) in the Ivory Coast. **Plant Disease**, v. 65, p. 755, 1981.

GORBALENYA, A. E.; KOONIN, E. V.; BINOV, V. M.; DONCHENKO, A. P. Sobemovirus genome appears to encode a serine protease related to cysteine proteases of picornaviruses. **FEBS Letter**, v. 236, p. 287-290, 1988.

GREBER, R. S. Some characteristics of solanum nodiflorum virus - a beetle transmitted isometric virus from Australia. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 34, p. 369, 1981.

GROGAN, R. G.; KIMBLE, K. A. The relationship of severe bean mosaic from Mexico to southern bean mosaic virus and its related strain from cowpea. **Phytopathology**, v. 54, p. 75-78, 1964.

HACKER, D. L. Identification of a coat protein binding site on southern bean mosaic virus RNA. **Virology**, v. 207, p. 562-565, 1995.

HACKER, D. L.; SIVAKUMARAN, K. Mapping and expression of southern bean mosaic virus genomic and subgenomic RNAs. **Virology**, v. 234, p. 317-327, 1997.

HAGENBÜCHLE, O.; SANTER, M.; STEITZ, J.A.; MANS, R.J. Conservation of the primary structure at the 3' end of 18 S rRNA from eucaryotic cells. **Cell**, v.13, p.551-563, 1978.

HERMODSON, M.A.; ABAD-ZAPATERO, C.; ABDEL-MEGUID, S.S.; PINDEK, S.; ROSSMAN, M.G.; TREMAINE, J.H. Amino acid sequence of southern bean mosaic virus coat protein and its relation to the three dimensional structure of the virus. **Virology**, v.119, p.133-149, 1982.

HSU, C. H., SEHGAL, O. P.; PICKETT, E. E. Stabilizing effect of divalent metal ions on virions of southern bean mosaic virus. **Virology**, v. 69, p. 487-595, 1976.

HULL, R. The grouping of small spherical plant viruses with single RNA components. **Journal of General Virology**, v. 36, p. 289, 1977a.

HULL, R. The banding behavior of the viruses of southern bean mosaic virus group in gradients of cesium sulphate. **Virology**, v. 79, p. 50-57, 1977b.

HULL, R. The stabilization of the particles of turnip roset virus and other members of the southern bean mosaic virus group. **Virology**, v. 79, p. 58-66, 1977c.

HULL, R. The stabilization of the particles of turnip rosette virus. III. Divalent cations. **Virology**, v. 89, p. 418-422, 1978.

HULL, R. The sobemovirus group. In: **The Plant Viruses, Polyhedral virions with monopartite genomes** (Koenig R., ed.), Plenum Press, v. 3, p. 113-146, 1988.

HULL, R.; FAUQUET, C.M.; GERGERICH, R.C.; LOMMEL, S.A.; THOTTAPILLY, G. Genus *Sobemovirus*. In: **Virus Taxonomy: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Academic Press, California, USA. 2000.

JAYASINGHE, W. U. **Chlorotic mottle of bean (*Phaseolus vulgaris* L.)**. CIAT Series 09EB (2), v. 82. Cali, Colombia, 1982. 156p.

JEFFRIES, A. C.; RATHJEN, J. P.; SYMONS, R. H. Lucerne transient streak virus complete genome. **GenBank Access. Number U31286**, 1995.

JOHNSON, J. E.; ROSSMANN, M. G.; SMILEY, I. E.; WAGNER, M. A. Single crystal X-ray diffraction studies of southern bean mosaic virus. **Journal of Ultrastructural Research**, v. 46, p. 441-451, 1974.

KADO, C. I. Biological and biochemical characterization of sowbane mosaic virus. **Virology**, v.31, 217-229, 1967.

KITAJIMA, E. W.; LIN, M. T.; COSTA, C. L.; BATISTA, M. F. Ocorrência do vírus do mosaico em desenho do feijoeiro no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v. 5, p. 408, 1980.

KOPEK, J. A.; SCOTT, H. A. Southern bean mosaic virus in Mexican bean beetle and bean leaf beetle regurgitants. **Journal of General Virology**, v. 64, p. 1601, 1983.

KOPER-ZWORTHOFF, E.C.; BREDERODE, F.T.; VEENEMAN, G.; van BOOM, J.H.; BOL, J.F. Nucleotide sequences at the 5' termini of the alfafa mosaic virus RNAs and the intercistronic junction in RNA 3. **Nucleic Acids Research**, v.8, p.5635-5647, 1980.

KOZAK, M. The scanning model for translation: An update. **Journal of Cell Biology**, v. 108, p. 229-241, 1989.

KRUSE, J.; TIMMINS, P.A.; WITZ, J. A neutron scattering study of the structure of compact and swollen forms of southern bean mosaic virus. **Virology**, v.119, p.42-50, 1982.

LAMPTEY, P. N. L.; HAMILTON, R. I. A new cowpea strain of Southern Bean Mosaic Virus from Ghana. **Phytopathology**, v. 64, p. 1110-1104, 1974.

LEE, L.; ANDERSON, J. Nucleotide sequence of a resistance breaking mutant of southern bean mosaic virus. **Archives of Virology**, v. 143, p. 2189-2201, 1998.

LOKESH G.L., GOPINATH K., SATHESHKUMAR P.S. & SAVITHRI H.S.. Complete nucleotide sequence of Sesbania mosaic virus: a new virus species of the genus Sobemovirus. **Archives of Virology**, v. 146, p. 209-23, 2001.

MAGDOFF-FAIRCHILD, B. S. Electrophoretic and buoyant density variants of southern bean mosaic virus. **Virology**, v. 31, p. 142-153, 1967.

MANG, K. Q.; GHOSH, A.; KAESBERG, P. A comparative study of the cowpea and bean strains of southern bean mosaic virus. **Virology**, v. 116, p. 264-274, 1982.

MÁS, P.; SANCHEZ-PINA, M.A.; BALSALOBRE, J.M.; PALLÁS, V. Subcellular localisation of cherry leaf roll virus coat protein and genomic RNAs in tobacco leaves. **Plant Science**, v. 153, p. 113-124, 2000.

MATTHEWS, R. E. F. Studies on potato virus X. I. Types of change in potato virus X infections. **Annals of Applied Biology**, v.36, p.448-459, 1949.

MATTHEWS, R. E. F. Classification and nomenclature of viruses. Fourth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Intervirology**, v. 17, p. 1, 1982.

MATTHEWS, R. E. F. **Diagnosis of plant virus diseases**. Ed. CRC Press, 374p., 1993.

MCDONALD, J. G.; HAMILTON, R. I. Distribution of southern bean mosaic virus in the seed of *Phaseolus vulgaris*, **Phytopathology**, v.72, p. 387-389, 1972.

MELCHER, U. Similarities between putative transport proteins of plant viruses. **Journal of General Virology**, v.71, p. 1009-1018, 1990.

MEYER, M. C.; COSTA, C. L.; SANTOS, O. R. Inter-relações de *Ceratoma arcuata* (Coleoptera: Chrysomelidae) com quatro vírus de leguminosas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, p. 314-320, 1992.

MEYER, M. C.; COSTA, C. L.; SANTOS, O. R. Transmissão de quatro vírus de leguminosas pelas larvas de *Ceratoma arcuata* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Fitopatologia Brasileira**, v.18, p. 97-101, 1993.

MILLER, J. S.; MAYO, M. A. The location of the 5'end of the potato leafroll luteovirus subgenomic coat protein mRNA. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 2633-2638, 1991.

MOREIRA, A. E. **Caracterização molecular parcial e localização subcelular de um isolado brasileiro do vírus do mosaico do feijoeiro do sul dos E.U.A.** São José do Rio Preto, 2001. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP).

MOREIRA, A.E., GASPAR, J.O. Propriedades moleculares de um isolado brasileiro do *Southern bean mosaic virus*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 292-297, 2002.

MORRIS, T. J.; DODDS, J. A. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. **Phytopathology**, v. 69, p. 854-855, 1979.

MUÑOZ, J. O.; KITAJIMA, E. W. Estudo comparativo da citopatologia induzida por alguns vírus do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) em infecções simples. **Fitopatologia Brasileira**, v. 15, p. 276-284, 1990.

MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GHABRIAL, S. A.; GARVIS, A. W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A.; SUMMERS, M. D. **Virus Taxonomy: sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Springer-Verlag/Wien, 596 p., 1995.

NGON A YASSI, M.; RITZENTHALER, C.; BRUGIDOU, C.; FAUQUET, C.; BEACHY, R. N. Nucleotide sequence and genome characterization of rice yellow mottle virus RNA. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 249-257, 1994.

NIBLET, C. L.; CLAFLIN, L. E. Corn lethal necrosis-a new virus disease of corn in Kansas. **Plant Disease Reporter**, v. 62, p. 15-18, 1978.

OPALKA, N.; BRUGIDOU, C.; BONNEAU, C.; NICOLE, M.; BEACHY, R.

N.; YEAGER, M.; FAUQUET, C. Movement of rice yellow mottle virus between xylem cells through pit membranes. **Proceedings of National Academy of Science, USA**, v. 95, p. 3323-3328, 1998.

OTHMAN, Y.; HULL, R. Nucleotide sequence of the bean strain of southern bean mosaic virus. **Virology**, v. 206, p. 287-297, 1995.

PATÍÑO, Y.; GARRIDO, M. J. Identification and detection of bean southern mosaic virus in some localities of Aragua state, Venezuela. **Fitopatologia Venezuelana**, v. 9, p. 16-17, 1996.

RALPH, R. K. Double-stranded viral RNA. **Advances in Virus Research**, v.15, p. 61-158, 1969.

ROSSMANN, M. G.; ABAD-ZAPATERO, C.; HERMODSON, M. A.; ERICKSON, J. W. Subunit interactions in southern bean mosaic virus. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, p. 37-83, 1983.

RUTGERS, T.; SALERNO-RIFE, T.; KAESBERG, P. Messenger RNA for the coat protein of southern bean mosaic virus. **Virology**, v. 104, p. 506-509, 1980.

RYABOV, E. V.; KRUTOV, A. A.; NOVIKOV, V. K.; ZHELEZNIKOVA, O. V.; MOROZOV, S. Y.; ZAVRIEV, S. K. Nucleotide sequence of RNA from the sobemovirus found in infected cooksfoot shows a luteovirus-like arrangement of the putative replicase and protease genes. **Phytopathology**, v. 86, p. 391-397, 1996.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SALERNO-RIFE, T., RUTGERS, T., KAESBERG, P. Translation of southern bean mosaic virus RNA in wheat germ embryo and rabbit reticulocyte extracts. **Journal of Virology**, v. 34, p. 51-58, 1980.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATS, T. Molecular cloning: a laboratory manual 2 ed. **New York Cold Spring Harbor Laboratory 3v.**, 1989.

SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings National Academy of the Science**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SAVITHRI, H. A.; ERICKSON, J. W. The self assembly of the cowpea strain of southern bean mosaic virus: Formation of T = 1 and T = 3 nucleoprotein particles. **Virology**, v. 126, p. 328-335, 1983.

SCHNEIDER, I. B.; WORLEY, J. F. Rapid entry of infections particles of southern bean mosaic virus into living cells following transport of the particles in the water stream. **Virology**, v. 8, p.243-249, 1959.

SCOTT, H. A.; FULTON, J. P. Comparison of relationships of southern bean mosaic virus and cowpea strain of tobacco mosaic virus with the bean leaf beetle. **Virology**, v. 84, p. 207-209, 1978.

SEHGAL, O. P. Southern Bean Mosaic Virus Group. In: **Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis** (Kurstak, P., ed.) p. 91-121. Elsevier/North Holland, 1981.
SEHGAL, O. P.; HSU, C. H. Identity and location of a minor protein component in virions of southern bean mosaic virus. **Virology**, v. 77, p. 1-11, 1977.

SHEPHERD, R. J. Southern bean mosaic virus. In: **Description of Plant Viruses. Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologists** Kew, Surrey, England, n° 57, 1971.

SHEPHERD, R. J.; FULTON, R. W. Identity of a seed - borne virus of cowpea. **Phytopathology**, v. 52, p. 489-493, 1962.

SHOYINKA, S. A.; BOZARTH, R. F.; REESE, J.; OKUSANYA, B. O. Field occurrence and identification of southern bean mosaic virus (cowpea strain) in Nigeria. **Turrialba**, v.29, p. 111-116, 1979.

SILVEIRA JR, W. G.; COSTA, C. L.; COSTA, A. F.; LIN, M. T. *Diabrotica speciosa* e *Cerotoma arcuata*, vetores do vírus do mosaico do feijoeiro no

Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v. 8, p. 625, 1983.

SINGH, R. ; SINGH, R. Natural infection of sickle sena (*Cassia tora* L.) and cowpea (*Vigna sinensis* Savi) plants by some new strain of southern bean mosaic virus. **Portugalia Acta Biologica**, v.13, p. 87-89, 1974.

SIVAKUMARAN, K.; HACKER, D.L. The 105-kDa polyprotein of southern bean mosaic virus is translated by scanning ribossomes. **Virology**, v. 246, p. 34-44, 1998.

SIVAKUMARAN, K., BENJAMIN, C. F., HACKER, D. L. Identification of viral genes required for cell-to-cell movement of southern bean mosaic virus. **Virology**, v. 252, p. 376-386, 1998.

SLACK, S. A.; SCOTT, H. A. Haemolymph as a reservoir for the cowpea strain of southern bean mosaic virus in the bean leaf beetle. **Phytopathology**, v. 61, p. 538-540, 1971.

SWOFFORD, D. PAUP: Phylogenetic analysis using parcimony. Version 4.0b10. **Smithsonian Institution**, Washington, D.C., 1997.

TAMM, T.; TRUVE, E. RNA-binding activities of cocksfoot mottle sobemovirus proteins. **Virus Research**, v. 66, p. 197-207, 2000.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weigh matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TORRANCE, L.; HARRINSON, B. D. Properties of Scottish isolates of cocksfoot mild mosaic virus and their comparison with others. **Annals of Applied Biology**, v. 97, p. 285, 1981.

TREMAINE, J. H. The amino acid and nucleotide composition of the bean and cowpea strains of southern bean mosaic virus. **Virology**, v. 30, p. 348-254, 1966.

TREMAINE, J. H.; HAMILTON, R. I. Southern bean mosaic virus. In: **Descriptions of plant viruses. Commonwealth Mycological**



Institute/Association of Applied Biologists, Kew, Surrey, England, n° 308, 1983.

TREMAINE, J.H.; RONALD, W.P.; KELLEY, E.M. Comparision of highly basic cyanogen bromide peptides from strains of southern bean mosaic virus. **Canadian Journal of Microbiology**, v.27, p.654-663, 1981.

TREMAINE, J.H.; RONALD, W.P.; KELLEY, E.M. Intermediates of the assembly and disassembly of southern bean mosaic virus. **Virology**, v.118, p.35-44, 1982.

TRINDADE, D. R. **Identificação e caracterização das estirpes do vírus do mosaico comum do feijoeiro no Brasil**. Brasília, 1979. 38 f. Dissertação (Mestrado)- Universidade de Brasília.

UYEMOTO, J. K.; GROGAN, R. G. Southern bean mosaic virus: Evidence for seed transmission in beans embryos. **Phytopathology**, v. 67, p. 1190-1196, 1977.

VAN DER WILK, F.; VERBEEK, M.; DULLEMANS, A.; VAN DEN HEUVEL, J. The genome-linked protein (VPg) of southern bean mosaic virus is encoded by the ORF2. **Virus Genes**, v. 17, p. 21-24, 1998.

VEERISSETTY, V.; SEHGAL, O. P. Proteinase K-sensitive factor essential for the infectivity of southern bean mosaic virus ribonucleic acid. **Phytopathology**, v. 70, p. 282-284, 1980.

WALTERS, H. J. Beetle transmission of plant viruses. **Advances in Virus Research**, v. 15, p. 339-363, 1969.

WEBER, K. A.; SEHGAL, O. P. Subgenomic RNAs in virions of southern bean mosaic virus. **Phytopathology**, v. 72, p. 909-913, 1982.

WEINTRAUB, M.; RAGETLI, H. W. J. Electron microscopy of the bean and cowpea strains of Southern Bean Mosaic Virus within leaf cells. **Journal of Ultrastructural Research**, v. 32, p. 167-189, 1970.

WU, S.; RINEHART, C. A.; KAESBERG, P. Sequence and organization of southern bean mosaic virus genomic RNA. **Virology**, v. 161, p. 73-80, 1987.

YERKES, W. D.; PATIÑO, G. The severe bean mosaic virus, a new bean virus from Mexico. **Phytopathology**, v. 50, p. 334-338, 1960.

ZAUMEYER, W. J.; HARTER, L. L. A new virus diseases of bean. **Phytopathology**, v. 32, p. 438, 1942.

ZAUMEYER, W. J.; HARTER, L. L. Two new virus diseases of beans. **Journal Agricultural Research**, v. 67, p. 305, 1943.

Autógrafa e reprodução (fotocópia) desse trabalho

São José do Rio Preto, Março de 2003.

Professor Edilson Espindola-Sant'Ana

Autorizo a reprodução (fotocópia) deste trabalho

São José do Rio Preto, Março de 2003.

Luciana Márcia Espinha-de-Sant'Ana



