

ANDREIA ESTELA MOREIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PARCIAL E
LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE UM ISOLADO
BRASILEIRO DO VÍRUS DO MOSAICO DO
FEIJOEIRO DO SUL DOS E.U.A.**

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

Orientador: Prof. Dr. José Osmar Gaspar

São José do Rio Preto
2001

Moreira, Andreia Estela

Caracterização molecular e localização subcelular de um isolado brasileiro do vírus do mosaico do feijoeiro do sul dos E.U.A / Andreia Estela Moreira – São José do Rio Preto : [s.n.], 2001.

105 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: José Osmar Gaspar.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista.

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1. Fitopatologia. 2. Fitovirologia – Caracterização Molecular. 3. Fracionamento celular. 4. Feijoeiro. 5. Mosaico em Feijão. 6. Virologia.

I. Gaspar, José Osmar. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 581.2

Este 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 CAPES

Dedico este trabalho

Em toda a sua essência, à minha querida irmã Angela, por ter me servido de exemplo de vida e inspiração. As alegrias de hoje também são suas, pois seu auxílio, estímulo e carinho foram as armas desta vitória.

Ao meu querido Pedro, esteio de minha vida.

À minha amada mãe Tereza, por todos os anos de luta solitária e trabalho dobrado, sacrificando seus sonhos em favor dos meus.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Osmar Gaspar, que no meu primeiro ano universitário abriu as portas do mundo científico a uma menina tímida e insegura, e soube transformá-la na pesquisadora que hoje sou. Pela mão sempre disposta a aplaudir meus acertos e compreender meus erros, pelo exemplo de profissionalismo, dedicação, disponibilidade e, acima de tudo, pela valiosa amizade, a minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

São muitos os responsáveis por esta vitória, mas os que estão por trás dela nem sempre recebem o mérito justo. Sabendo de sua importância, não poderia deixar de expressar a minha gratidão a todos que me apoiaram e incentivaram, e cuja convivência agradável foi fundamental para o sucesso deste trabalho.

Agradeço, em especial, ao meu orientador Prof. Dr. José Osmar Gaspar, pela disponibilidade e dedicada orientação.

Aos Professores Dr. Gustavo Orlando R. Bonilla e Dra. Addolorata Colariccio, pela acurada análise da pró-forma e valiosas sugestões que contribuíram para aprimorar esta tese.

Ao Prof. Dr. Peter James Harris, do Departamento de Letras deste Instituto, por sua colaboração na elaboração do “Summary”.

À Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, Prof. Dr. Cláudia Márcia Aparecida Carareto, pela disponibilidade e auxílio quanto aos problemas burocráticos.

À todos os professores do Curso de Pós-Graduação, pelos valiosos ensinamentos durante o desenvolvimento de todo este curso de Mestrado e, em especial, aos Professores Dr. Carlos Roberto Ceron e Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo.

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

À CAPES, pela concessão da Bolsa de Mestrado.

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

A todos os funcionários e técnicos dos Departamentos de Zoologia-Botânica, Biologia, Física, Biblioteca, Pólo Computacional e Seção de Pós-Graduação, em especial à Maria Helena Corabolante, Izabelino Fávaro, Josué Rodrigues dos Santos, Rosana Silistino de Souza, Maria do Carmo Junqueira, Maria Luíza F. J. Froner, Nanci Queiroz A. Pereira e

Rosana Miguel Gomes Ferro, pela simpatia, presteza nas diversas tarefas que desempenharam e contribuições para a finalização deste trabalho.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação, pelo incentivo constantes e amizade, especialmente à Milla Alves Baffi, amiga de todas as ocasiões, e a Juliana Polachini de Castro.

Às queridas amigas do Laboratório de Fitovirologia, Priscila Belintani, Luciana Márcia Espinha de Sant'Ana e Ana Cláudia Maritan pela amizade, auxílio na resolução dos problemas diários, convivência agradável e pelos ensinamentos de vida. Boas amigas como vocês são a família que nos permitiram escolher.

Às amigas Fabiana Firetti e Michela Borges que me ensinaram que nem sempre estar junto é estar perto.

Aos amigos Sabrina e Márcio, por estarem presentes não só nos momentos felizes, mas também nos difíceis, sempre dispostos a ajudar.

À minha querida irmã Adriana, por sempre torcer pelo meu sucesso, pela sua bondade e carinho únicos que me acompanham desde a infância.

Ao meu irmão Aristides, pelo incentivo e senso de humor.

Ao meu sobrinho Guilherme, por iluminar a minha vida com um simples sorriso.

À minha mais que irmã Ângela, anjo protetor que me deixa em pé sempre que minhas asas se esquecem de como voar. Esta conquista também é sua.

A minha mãe Tereza, pela formação de meu caráter e pelo amor imensurável que me sustentou até aqui.

Ao meu esposo Pedro, pelo amor, incentivo, compreensão e paciência.

Muito Obrigada.

Nem sempre é possível alcançar as estrelas...
Nem sempre é possível realizar sonhos...
Mas é bom saber que se tem para onde voltar.

Agradeço...

À Deus

Por tantos momentos em que me fizeste sentir sua
presença, dando-me a certeza de que nunca estarei só.
Tudo isto, meu Senhor, é obra sua em minha vida.

“Meu Senhor, sei que não sou nada
Sem merecer fizeste em mim sua morada
Sou em ti, és em mim
Minh'alma diz meu Deus
como és lindo”

“O mistério não é um muro
onde a inteligência esbarra,
mas um oceano
onde ela mergulha”

Gustav Thibon

ABREVIÇÕES DE SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

- 2-ME: 2 β -mercaptoetanol
- anti-dig: anti-soro anti-digoxigenina conjugado a fosfatase alcalina
- BCIP/NBT: 5-bromo-4-cloro.3-indolil fosfato/nitro-blue tetrazolio
- BSA: soroalbumina bovina
- CDP-STAR: solução aquosa de <1,5% (p/v) disódium 2-cloro-5-(4metoxispiro[1,2-dioxitano-3,2'-(5'-cloro)-tríciclo[3,3,1,1,^{3,7}] decan]-4yl)fenil fosfato).
- dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP: deoxinucleotídeos (ATP: adenina trifosfato; CTP: citosina trifosfato; GTP: guanidina trifosfato; TTP: timina trifosfato; UTP: uracila trifosfato)
- DEPC: dietil pirocarbonato de sódio
- dig-dUTP: dUTP marcado com digoxigenina
- DTT: ditioneitol
- EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
- KH₂PO₄: fosfato de potássio
- MOPS: ácido morfolinopropanesulfônico
- PBS: solução salina tamponada com fosfato
- PBS-T: PBS contendo Tween 20 0,3%
- PEG 8000: polietilenoglicol
- SDS: lauril sulfato de sódio ou dodecil sulfato de sódio
Tris-HCl: tampão Tris-Base com pH ajustado com HCl

LISTA DE VÍRUS CITADOS NO TEXTO

| NOME DA ESPÉCIE | ABREVIÇÃO | |
|---|-----------|---------------|
| <i>Blueberry shoestring virus</i> | BSSV | Sobemovirus |
| <i>Cherry leaf roll virus</i> | CLRV | Nepovirus |
| <i>Cocksfoot mild mosaic virus</i> | CMMV | Sobemovirus ? |
| <i>Cocksfoot mottle virus</i> | CfMV | Sobemovirus |
| <i>Cucumber mosaic virus</i> | CMV | Cucumovirus |
| <i>Cynosurus mottle virus</i> | CnMoV | Sobemovirus ? |
| <i>Ginger chlorotic fleck virus</i> | GCFV | Sobemovirus ? |
| <i>Lucerne transient streak virus</i> | LTSV | Sobemovirus |
| <i>Rice yellow mosaic virus</i> | RYMV | Sobemovirus |
| <i>Solanum nodiflorum mottle virus</i> | SNMoV | Sobemovirus |
| <i>Southern bean mosaic virus</i> | SBMV | Sobemovirus |
| <i>Southern cowpea mosaic virus</i> | SCPMV | Sobemovirus |
| <i>Sowbane mosaic virus</i> | SoMV | Sobemovirus |
| <i>Subterranean clover mottle virus</i> | ScMoV | Sobemovirus |
| <i>Tobacco mosaic virus</i> | TMV | Tobamovirus |
| <i>Turnip rosette virus</i> | TRoV | Sobemovirus |
| <i>Velvet tobacco mottle virus</i> | VTMoV | Sobemovirus |

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).

A incompleta caracterização desses 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).

O Vírus do Mosaico do Feijoeiro do Sul dos Estados Unidos (*Southern bean mosaic virus*, SBMV) é a espécie tipo do gênero *Sobemovirus* (Murphy *et al.*, 1995). Este vírus tem uma restrita gama de hospedeiras, confinada quase que exclusivamente a espécies da família Leguminosae (Tremaine & Hamilton, 1983), algumas sendo de interesse econômico como no caso dos feijoeiros comuns e da soja.

O nome dado a esta espécie deve-se ao fato de ter sido primeiramente descrita infectando feijoeiros na região sul dos Estados Unidos (Zaumeyer & Harter, 1942). No presente, sabe-se que apresenta ampla distribuição, sendo encontrada em alguns países dos continentes africano (Lamprey & Hamilton, 1974; Shoyinka *et al.*, 1979; Gaikwad & Thottappilly, 1988), asiático (Singh & Singh, 1974; Bashir & Hampton, 1993), europeu (Sehgal, 1981) e americano (Yerkes & Patiño, 1960; Grogan & Kimble, 1964; Cupertino *et al.*, 1982; Fuentes, 1990; Patiño & Garrido, 1996).

No Brasil, um isolado do SBMV que infecta feijoeiro mas não caupi (SBMV-B) foi detectado pela primeira vez infectando feijoeiros na região do Distrito Federal, ocasionando sintomas que variam de mosaico fraco a mosaico severo, deformação da vagem e distorção foliar, dependendo da cultivar infectada (Cupertino *et al.*, 1982), sendo naturalmente transmitido por besouros crisomelídios (Silveira Jr. *et al.*, 1983). Este isolado será aqui referido como SBMV-B^{DF}.

Posteriormente, o vírus foi também encontrado no Estado de São Paulo (A. S. Costa. Dados não publicados), sendo doravante identificado

como SBMV-B^{SP}. Esses isolados não foram, entretanto, caracterizados do ponto de vista molecular. Visando uma melhor caracterização do vírus que ocorre no Brasil, um isolado fornecido pelo Dr. A. S. Costa, do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), e mantido em feijoeiro 'Rosinha' (SBMV-B^{SP}), foi estudado.

I.1 - OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral a caracterização molecular parcial e a localização subcelular de um isolado brasileiro do SBMV-B encontrado no Estado de São Paulo (SBMV- B^{SP}). Constituíram objetivos específicos do presente trabalho a purificação das partículas virais; a determinação da massa molecular da proteína capsidial; a produção de anti-soro para esta proteína; a extração, identificação e análise dos RNAs genômico e subgenômicos; a extração e análise de RNAs de fita dupla (dsRNA); a produção de sonda não radioativa para o RNA viral; o estudo ultraestrutural dos tecidos infectados pelo vírus por microscopia eletrônica de transmissão e a localização dos RNAs virais em frações subcelulares.

II. REVISÃO DE LITERATURA

1. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

Em 1977(a) Hull propôs um novo gênero de vírus de plantas baseado na espécie tipo *Southern bean mosaic virus*. Este gênero foi aceito pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTM) com o nome de *Sobemovirus* (sigla para ***Southern bean mosaic virus***) (Matthews, 1982).

Atualmente o gênero *Sobemovirus* compreende pelo menos 11 espécies distintas, sendo elas: *Southern bean mosaic virus* (SBMV), *Southern cowpea mosaic virus* [SCPMV, anteriormente conhecido 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) (van Regenmortel *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. Todos possuem gama de hospedeiras relativamente restrita, que no entanto difere para cada espécie (Hull, 1988).

Há ainda 3 possíveis espécies no gênero, cujas características são similares aos *Sobemovirus*, mas que necessitam de informações adicionais para serem incluídas. São elas: *Cocksfoot mild mosaic virus* (CMMV), *Cynosurus mottle virus* (CnMoV) e *Ginger chlorotic fleck virus* (GCFV) (van Regenmortel *et al.*, 2000).

O SBMV foi inicialmente descrito por Zaumeyer & Harter (1942) infectando feijoeiros na região sul dos Estados Unidos e, 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 (Lamprey & 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)].

No Brasil, a primeira citação de ocorrência do SBMV foi em Brasília (SBMV-B^{DF}), onde foi encontrado infectando feijoeiros, ocasionando nestes mosaico e distorção foliar (Cupertino *et al.*, 1982). Posteriormente, foi também encontrado no Estado de São Paulo (SBMV-B^{SP}) (A. S. Costa. Dados não publicados).

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 tipo, chamada de estirpe feijoeiro (SBMV-B), 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 (van Regenmortel *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).

Lamptey & 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 (Lamptey & 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 é a estirpe selvagem do SBMV, propagações contínuas do vírus por uma única variedade de feijoeiro

associadas com as condições de temperaturas elevadas teria 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, os quais são muito eficientes na transmissão (Silveira Jr. *et al.*, 1983). Já foram descritas 5 espécies de crisomelídeos que transmitem o SBMV. Estes são *Ceratoma trifurcata* (Walters, 1969), *Epilachna varivestis* (Fulton *et al.*, 1975), *Lesdesmodina auricollis* (Garrido & Savini, 1996), *Diabrotica speciosa* e *Ceratoma arcuata* (Silveira Jr. *et al.*, 1983; Meyer *et al.*, 1992). Estas duas últimas espécies são os principais vetores do SBMV no Brasil (Costa & Batista, 1979) e *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 descrito a transmissão do SBMV 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.

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-B) (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-B 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. A massa molecular das partículas é estimada em $6,6 \times 10^6$ Da e estas compreendem 20% RNA e 80% proteína, apresentando sedimentação igual a 115S (Shepherd, 1971; Hull, 1977a). Lipídios e carboidratos não participam da composição do virion (Hull, 1977a) e as partículas coradas negativamente não exibem características de superfície discerníveis, o que têm sido atribuído a uma alta densidade proteica superficial (Johnson *et al.*, 1974).

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 espécie de proteína capsidial (Caspar & Klug, 1962; Shepherd, 1971; Sehgal, 1981; Hull, 1988) com ponto isoelétrico em pH 5,5 (Brunt *et al.*, 1996). Cada subunidade proteica apresenta dois domínios: um participa da formação da capa icosaédrica com aproximadamente 3,5 nm de espessura e o outro forma uma trama parcialmente ordenada no interior do vírus (Rossmann *et al.*, 1983).

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).

Os *Sobemovirus* são extremamente estáveis *in vitro*, sendo esta estabilidade devida à associação cooperativa de muitas forças intermoleculares entre o genoma viral e o capsídio. 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 capsídeo acompanhado pela redução na sedimentação do vírus (115S → 100S), o que levou a conclusão de que estes cátions constituem pontes entre subunidades proteicas vizinhas, contribuindo, assim, para a estabilização do capsídeo 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 “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 céσιο (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 céσιο (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 SO_4^{2-} , tornando algumas partículas mais pesadas do que outras.

3. ORGANIZAÇÃO DO GENOMA

O Vírus do Mosaico do Feijoeiro do Sul dos Estados Unidos 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 à 21% 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 as 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 para a estirpe SBMV-B (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 seqüência VPg-ACAAA (Hacker & Sivakumaran, 1997). Outros dois *Sobemovirus*, RYMV e LTSV, apresentam, respectivamente, a extremidade 5' com as seqüências ACAA e ACAAAA (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.*, 1989; 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 das espécies SBMV (estirpe SBMV-B) e SCPMV 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 de ambas espécies não é suficiente para produzir estas 4 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). Os produtos de tradução foram relacionados por Wu *et al.* (1987) como “open reading frames” (ORFs) 1 (P4), 2 (P1 e P2) e 4 (P3, que é a proteína capsidial) da seqüência de nucleotídeos do SCPMV.

A seqüência de nucleotídeos foi determinada para ambas as espécies, SCPMV (Wu *et al.*, 1987) e SBMV-B (Othman & Hull, 1995). O genoma do SBMV-B compreende 4109 nucleotídeos (nt), sendo ligeiramente menor do que aquele do SCPMV (4194 nt) e possuindo apenas 55% de similaridade com a seqüência deste. A composição de bases para o RNA do SBMV-B compreende 23,7% A, 24,5% C, 25,6% G e 26,0% U. O genoma do SBMV-B, segundo Othman & Hull (1995), possui três ORFs, a ORF 1, 2 e 3, em posições similares às ORFs 1, 2 e 4 do genoma do SCPMV, entretanto, a ORF 3 encontrada neste último não foi detectada no genoma do SBMV-B. No SBMV-B há regiões intercistrônicas entre as ORFs 1 e 2 e ORFs 2 e 3, enquanto que as ORFs análogas (1 e 2, 3 e 4) se sobrepõe no SCPMV (Othman & Hull, 1995).

Em um trabalho recente, Lee & Anderson (1998) seqüenciaram um isolado do Arkansas do SBMV-B, denominado SBMV-B^{ARK}, bem como

seu mutante espontâneo SBMV-S, nos quais observou-se a presença de quatro ORFs, diferentemente das três apresentadas pelo seqüenciamento realizado por Othman & Hull (1995), tendo, portanto, uma organização genômica similar ao SCPMV. Como a seqüência de nucleotídeos do SBMV-B^{ARK} apresentou 91,3% de identidade com o SBMV-B, 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 ORFs do SBMV-B. Eles propuseram que o SBMV-B também deve possuir quatro ORFs em posições semelhantes ao genoma do SCPMV e não apenas as três descritas.

Uma região 5' não codificadora de 92 bases ricas em A+U (61%) precede a primeira ORF do SBMV-B. Esta região é consideravelmente maior do que a do SCPMV, mas ambas as espécies apresentam uma estreita similaridade entre os 43 primeiros nucleotídeos. Esta região é parcialmente complementar ao terminal 3' do RNA ribossômico 18S, tendo uma possível atuação na ligação ao ribossomo. A região 3' não codificadora do SBMV-B 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 ORF 1 do SBMV-B codifica uma proteína de 11,68 kDa, que é menor do que o produto da ORF equivalente do SCPMV (21 kDa). Entretanto o seu tamanho está de acordo com o produto obtido em experimentos de tradução *in vitro* (14 kDa) atribuído à esta ORF (Mang *et al.*, 1982). Othman & Hull (1995) sugerem 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 ORF 2 do SBMV-B codifica uma proteína de 96,5 kDa que possivelmente seria uma poliproteína clivada por uma protease viral, codificada pela própria ORF, originando os seus 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). Esta ORF2 tem arranjo genômico semelhante ao gênero *Luteovirus* com a VPg localizada entre a serino protease e a RNA polimerase viral (protease-VPg-polimerase), diferente do arranjo genômico dos *Picornavirus* (VPg-protease-polimerase) que prevalece em todos os outros RNAs com VPg. Além disto, a RNA polimerase dos *Sobemovirus* é relacionada com o subgrupo II dos *Luteovirus* o que sugere um ancestral comum para ambos os gêneros (van Der Wilk *et al.*, 1998). Também foi encontrado dentro da ORF2, 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 ORF2 pode estar relacionada com a regulação deste gene pela proteína capsidial (Hacker, 1995).

Opiniões divergem à respeito da ORF 3 do SBMV-B. Segundo Othman & Hull (1995), a ORF 3 codifica uma proteína de 28 kDa (proteína capsidial) que, entretanto, deve ser expressa *in vivo* a partir de um RNA subgenômico, mas de acordo com Lee & Anderson (1998) a ORF 3, assim como no SCPMV, estaria contida dentro da ORF 2 e codificaria uma proteína de 15 kDa, cuja função é desconhecida. A ORF 4, segundo Lee & Anderson (1998), sobrepõe a ORF 2 em 193 nucleotídeos e codifica a proteína capsidial com massa molecular de 28,8 kDa, expressa pelo RNA subgenômico.

Foi demonstrado para a espécie SCPMV que a proteína capsidial, juntamente com a proteína codificada pela ORF-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-B a proteína capsidial também exerça esta função.

Em relação às estratégias de tradução, sabe-se que a ORF 1 e 3, 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 ORF2 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 ORF2, 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 ORF2 está presente em um contexto altamente favorável para a tradução (Sivakumaran & Hacker, 1998).

4. CITOPATOLOGIA

Estudos ultraestruturais das espécies SBMV (estirpe SBMV-B) 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-B estes cristais não foram observados. Os cristais apareciam 10 dias após a inoculação do vírus e, à 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-B. Partículas de 26 a 29 nm de diâmetro foram vistas dispersas livremente no citoplasma e no núcleo, 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.

Estas observações para os tecidos infectados pelo SBMV-B contradizem às de Muñoz & Kitajima (1990), que encontraram arranjos cristalinos das partículas do isolado brasileiro SBMV-B^{DF}, geralmente próximos às paredes da maioria das células. Nas proximidades do nucléolo também foram notadas agregados de virions. Ao contrário do SCPMV, o aparecimento de cristais da estirpe feijoeiro parece ser mais tardia, pois estes somente foram vistos em tecidos com mais de 4 semanas de infecção, tempo no qual os cristais do SCPMV já teriam

desaparecido e, talvez, este seja o motivo dos cristais do SBMV-B não terem sido detectados nos relatos anteriores. Por outro lado, a presença de arranjos cristalinos para um isolado brasileiro do SBMV-B poderia sugerir uma possível diferença entre isolados, uma vez que estes não foram observados no isolado americano.

Quanto as anormalidades nas organelas causadas pela infecção viral, estas foram semelhantes para SBMV-B 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 disto, as células infectadas também apresentaram intensa vacuolização (Weintraub & Ragetli, 1970; Muñoz & Kitajima, 1990; Brunt *et al.*, 1996).

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 as células adjacentes (Opalka *et al.*, 1998). O movimento a 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).

III. MATERIAL E MÉTODOS

Basicamente a metodologia utilizada é aquela descrita no "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Sambrook *et al.*, 1989).

Nos procedimentos utilizados para extração e análise de RNA a água e as soluções utilizadas foram tratadas com dietil pirocarbonato de sódio (DEPC) para eliminação de RNAses. As vidrarias foram esterilizadas, em uma estufa a seco, a 200°C por 3 horas.

1. Vírus/Planta

- O isolado do vírus do mosaico do feijoeiro do sul dos Estados Unidos usado neste estudo foi encontrado no Estado de São Paulo e gentilmente cedido pelo Dr. Álvaro Santos Costa do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), sendo aqui denominado SBMV-B^{SP}.
- O vírus, quando inoculado mecanicamente, não infectou caupi (*Vigna unguiculata*).
- O vírus foi mantido em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*. L.) 'Rosinha' por inoculação mecânica em plantas obtidas a partir de sementes
- O vírus apresentou reação positiva com o anti-soro preparado para o isolado do SBMV descrito no Distrito Federal (Cupertino *et al*, 1982)
- As plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura controlada ao redor de 28°C

2. Purificação das partículas virais

- O SBMV-B^{SP} foi purificado seguindo-se, em parte, o protocolo descrito por Hull (1977b)
- Folhas congeladas ou frescas (100g) trituradas em liquidificador com 2 vol. de tampão KH₂PO₄ 0,1 M pH 7,2 contendo sulfito de sódio 0,75%

- Filtração em gaze e clarificação por 10 min. com clorofórmio (0,5 ml/g de folha) sob forte agitação
- Centrifugação por 5 min. a 12.000g e recuperação da fase aquosa
- Ajuste do pH da fase aquosa para 4,8 com ácido acético glacial
- Centrifugação por 10 min. a 12.000g e recuperação da fase aquosa
- Precipitação do vírus da fase aquosa pela adição de PEG 8000 a 10% e NaCl a 1% sob agitação por 120 min. a 4°C
- Centrifugação por 10 min. a 16.000g e recuperação do "pellet" em tampão KH_2PO_4 0,01 M pH 7,2 sob agitação por 30 min. a 4°C
- Centrifugação por 10 min. a 16.000g e recuperação do sobrenadante
- Ultracentrifugação por 90 min. a 100.000g e recuperação do "pellet" em 1 ml de tampão KH_2PO_4 0,01 M, pH 7,2
- Centrifugação por 120 min. a 150.000g em gradiente linear de sacarose (10-50%) em tampão KH_2PO_4 0,01 M pH 7,2
- Coleta da banda contendo vírus, diluição no tampão acima e centrifugação por 90 min. a 100.000g
- Recuperação do "pellet" em 1 ml de tampão KH_2PO_4 0,01 M pH 7,2. Esta é a fração denominada "vírus purificado"

3. Espectrofotometria

- Vírus purificado submetido a leitura em espectro de 220 a 320 nm (luz ultravioleta)
- Determinação da concentração viral utilizando o coeficiente de extinção do SBMV cujo valor é 6mg/ml por centímetro em leitura à 260 nm (Sehgal, 1981)

4. Microscopia eletrônica do vírus purificado

- Alíquotas do vírus purificado foram aplicadas sobre telinhas de microscopia eletrônica cobertas com película de carbono

- Contrastação negativa por 1 min. com acetato de uranila 2%
- Observação em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 906, operando a 80 KV

5. Produção de anti-soro para a proteína capsidial

- Produção de anti-soro segundo protocolo descrito por Hu *et al.* (1985)
- Inoculação em galinha de alíquotas de vírus purificado (170µg) em três injeções intramusculares na região da coxa, com intervalo de 7 dias entre elas
- Primeira injeção: vírus purificado mais adjuvante completo de Freund (Sigma) 1:1
- Segunda e terceira injeção: vírus purificado mais adjuvante incompleto de Freund (Sigma) 1:1
- Após a terceira injeção: extração do anti-soro da gema dos ovos produzidos
- Gema acrescida de tampão PBS (fosfato de sódio 0,01 M pH 7,2 - NaCl 0,15 M) (v/v) e igual volume de clorofórmio
- Centrifugação por 60 min. a 4.000g
- Coleta do sobrenadante e adição, gota a gota, de igual volume de sulfato de amônio 4 M
- Ajuste do pH para 7,8 com NaOH 1 N e incubação por 60 min. a temperatura ambiente
- Centrifugação por 10 min. a 8.000g e ressuspensão do “pellet” em tampão PBS
- Lavagem por filtração através de membrana (Amicon) com limite de exclusão 30 kDa com tampão PBS para retirada do sulfato de amônio
- A solução resultante foi estocada à -20°C e usada como anti-soro para a proteína capsidial do SBMV-B^{SP} (anti-SBMV)

6. Extração de proteínas totais de folhas

- Homogeneização de folhas em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,5 contendo sacarose 0,4 M, MgCl₂ 0,005 M, KCl 0,01 M e glicerol 20% (v/v) (Bradley & Zaitlin, 1971)
- Centrifugação por 5 min. a 16.000g e recuperação da fase aquosa
- Precipitação com 5 volumes de acetona à -20°C/20 horas
- Recuperação das proteínas por centrifugação por 20 min. a 16.000g
- Ressuspensão em tampão de amostra para eletroforese ou estocagem à -20°C

7. Determinação da especificidade do anti-soro por “dot-blot”

- Aplicação em membrana de nitrocelulose (Gibco-BRL) de 1 µl da preparação purificada do vírus, 1 µl de proteínas totais de planta sadia e 1 µl de proteínas totais de planta infectada pelo SBMV-B
- Secar ao ar por 30 min.
- Imunolocalização da proteína capsidial como descrito no item 8.

8. Imunolocalização da proteína capsidial (Teste Sorológico)

- Incubação da membrana de celulose por 2 horas a temperatura ambiente em tampão PBS contendo BSA 5% e Tween-20 0,3% (PBS-T)
- Incubação por 1 hora a temperatura ambiente com anti-soro primário (anti-SBMV) diluído 1:8.000 com tampão PBS-T contendo BSA 0,5% e heparina a 20 µg/ml (Dietzgen & Francki, 1987).
- Lavagens com PBS-T (3 x 15 min)
- Incubação por 60 min. a temperatura ambiente com anti-soro anti-IgG de galinha (obtido em coelho) conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) diluído (1:50.000) em PBS-T contendo BSA 0,5%

- Lavagens com PBS (3 x 5 min.)
- Incubação por 20 min. com mistura de BCIP/NBT (substrato para fosfatase alcalina).

9. Determinação do título do anti-soro por “dot-blot”

- Aplicação de 100 ng (nanogramas) de vírus purificado em cada um dos 9 pedaços (1cm/1cm) de membrana de nitrocelulose
- Secar ao ar por 30 min.
- Imunolocalização da proteína capsidial como descrito no item 8, testando 9 diluições crescentes do anti-SBMV, uma para cada membrana: 1:1000, 1:2.000, 1:4.000, 1:8.000, 1:16.000, 1:32.000, 1:64.000, 1:128.000 e 1:256.000

10. Determinação da diluição máxima do antígeno

- Aplicação em membrana de nitrocelulose de 1 µl de cada uma das concentrações do vírus purificado: 500 ng, 50 ng, 5 ng, 500 pg (picogramas), 50 pg e 5 pg; 1 µl de cada diluição de extrato de planta infectada: 5X, 10X, 50X, 100X, 500X e 1.000X e 1 µl de extrato de planta sadia diluído como acima.
- Secar ao ar por 30 min.
- Imunolocalização da proteína capsidial como descrito no item 8, utilizando o anti-SBMV, diluído 1:8.000

11. Eletroforese

- Gel desnaturante em SDS-PAGE conforme Laemmli (1970)
- Gel de empacotamento a 5% e de resolução a 15%

- Proteínas desnaturadas por fervura (3 min. a 100° C) em tampão de amostra (Tris.HCl 0,125 M pH 6,8 contendo SDS 4%, glicerol 20%, 2-ME 10% e azul de bromofenol 0,001 M)
- Eletroforese por 90 min. a 100V em aparelho Mini Protean II (BioRad)
- Fixação das proteínas em mistura de metanol, água e ácido acético (50:50:10) por 60 min
- Coloração com azul de Comassie 0,25% nessa mesma mistura por 60 min e descoloração com metanol e água (1:1) por 18 horas

12. “Western blot”

- Eletroforese das proteínas conforme os quatro primeiros passos do item 11
- Transferência para membrana de nitrocelulose em um eletrotransferidor (Mini Trans-Blot Electrophoretic Cell, BioRad) operando a 100V (constante) por 60 min.
- Tampão de transferência: Tris-Glicina (Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M) contendo metanol 20%
- Imunolocalização conforme item 8, utilizando anti-SBMV diluído 1:2.000

13. Extração do RNA viral

- Suspensão viral acrescida de SDS 2,5% e NaCl 0,1 M e aquecimento a 55°C por 3 min.
- Extração com igual volume de fenol saturado com citrato de sódio 0,1M pH 4,3
- Centrifugação 15 min. a 12.000 e nova extração com fenol
- Precipitação do RNA da fase aquosa com acetato de sódio 0,3M pH 5,2 e dois volumes de etanol a -70°C por 60 min.
- Recuperação do RNA por centrifugação a 12.000g por 20 min. a 4°C

- Lavagem do RNA com etanol 75%, ressuspensão em água-DEPC e estocagem a -20°C

14. Extração de RNAs totais de folhas

- 100 mg de folhas congeladas com N_2 líquido e trituradas a pó
- Extração com 1,0 ml de TRIzol (Gibco-BRL) e 0,2 ml de clorofórmio
- Coleta da fase aquosa (0,5 ml) após centrifugação a 12.000g por 15 min. a 4°C
- Precipitação dos RNAs com 0,5 ml de isopropanol por 10 min. a temperatura ambiente
- Recuperação do RNA por centrifugação a 12.000g por 20 min. a 4°C
- Lavagem do RNA com etanol 75%, ressuspensão em água-DEPC e estocagem a -20°C

15. Produção de sonda (cDNA) não radioativa por incorporação de digoxigenina-dUTP (DIG-dUTP)

- Volume de reação de 20 μl consistindo de 50 mM Tris.HCl (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 $\mu\text{g/ml}$ hexanucleotídeos; 2 unid. Inibidor de RNase; 1 μg RNA viral; 200 unid. Transcriptase Reversa "Superscript" (Gibco-BRL).
- Desnaturação do RNA viral e dos hexanucleotídeos por aquecimento a 95°C por 5 min; resfriamento em gelo/álcool; adição dos demais componentes da reação
- Incubação por 20 h a 37°C e término da reação pela adição 1 μl de EDTA 0,2 M
- Precipitação do cDNA com 0,1 vol. de cloreto de lítio 4 M e 3 vol. de etanol a -70°C por 60 min.
- Recuperação do cDNA por centrifugação a 13000g por 15 min. a 4°C

- Lavagem do RNA com etanol 75%, ressuspensão em tampão TE (Tris.HCl 0,01 M; EDTA 0,001 M) e estocagem a -20°C

16. Determinação da especificidade da sonda por “dot-blot”

- Desnaturação dos RNAs por aquecimento a 55°C por 15 min., resfriamento em gelo/álcool e aplicação em membrana de nailon (Hybond-N+; Amersham Pharmacia)
- Fixação dos RNAs por exposição à radiação ultravioleta a 50 mJoule (GS Gene Linker; BioRad) e hibridização com sonda específica

17. Hibridização

- Pré-hibridização a 50°C por 1-2 h em solução contendo: SDS 7%; fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0; formamida 50%; reagente bloqueador (Boehringer Mannheim) 2%; SSC 5X (SSC 1X= citrato de sódio 0,03 M pH 7,0; NaCl 0,3 M); N-lauroylsarcosina 0,1%
- Hibridização a 50°C por 20 h em solução de pré-hibridização acrescida da sonda previamente desnaturada por fervura a 100°C por 10 min. e resfriamento em gelo/álcool
- Lavagens da membrana com SSC 2X contendo SDS 0,1% (2 x 5 min; temperatura ambiente) e SSC 1X contendo SDS 0,1% (2 x 15 min.; 68°C)

18. Detecção dos híbridos RNA-cDNA

- Incubação da membrana por 1 min. a temperatura ambiente em tampão 1 (ácido maleico 0,1 M pH 7,5; NaCl 0,15 M; Tween 20 0,3%)

- Bloqueio por 60 min. a temperatura ambiente em tampão 2 (tampão 1 contendo reagente bloqueador 1%, Boehringer Mannheim)
- Incubação por 60 min. a temperatura ambiente com anti-soro (anti-digoxigenina conjugado a fosfatase alcalina; Boehringer Mannheim) diluído 1:10.000 em tampão 2
- Lavagens com tampão 1 (2 x 15 min.; temperatura ambiente) e incubação por 2 min. a temperatura ambiente com tampão 3 (Tris.HCl 0,1 M pH 9,5; NaCl 0,1 M; MgCl₂ 0,05 M)
- Incubação por 15 min. a 37°C com substrato quimioluminescente (CDP-Star, Amersham) diluído 1:100 em tampão 3 e exposição de filme de raio X (X-OMAT, Kodak)

19. Gel desnaturante de agarose-formaldeído

- Agarose 1% em tampão MOPS 0,02 M pH 7,0, acetato de sódio 0,05 M, EDTA 0,01 M contendo formaldeído 0,66 M
- Amostas de ácidos nucleicos diluídas em tampão desnaturante (MOPS 0,02 M contendo formamida 67% e formaldeído 2,46 M); aquecimento por 15 min. a 55°C; imediato resfriamento em gelo/álcool; adição de corante Orange G (EDTA 0,01 M, Ficoll 400 15% e Orange G)
- Eletroforese a 80-100 V até o corante chegar cerca de 1 cm da porção final do gel; tampão de corrida MOPS 0,02 M pH 7,0
- Incubação do gel em solução aquosa de glicina 1% por 1 h
- Ácidos nucleicos corados por 10 min. com brometo de etídio (0,05 g/ml), descorados por 16-18 h em água-DEPC a 4°C e observados e fotografados sob luz ultravioleta

20. Transferência para membrana de náilon (“Northern blot”)

- Eletroforese como no item 12 sem corar os ácidos nucleicos
- Lavagens do gel em água-DEPC (2 x 10 min.)

- Incubação por 20 min. em NaOH 0,05 N e por 2 x 15 min. em SSC 20X
- Membrana de nylon umedecida em água-DEPC e incubada por 20 min. em SSC 10X
- Transferência a vácuo dos ácidos nucleicos por 90 min. (Vacuum Blotter 785; Bio Rad) em SSC 10X
- Lavagem da membrana por 5 min. em SSC 6X
- Fixação dos ácidos nucleicos por exposição à radiação ultravioleta a 150 mJoule (GS Gene Linker; BioRad); hibridização com sonda específica (item 2.7.) e detecção da reação conforme item 2.8

21. Determinação da massa molecular dos RNAs virais

- Gel desnaturante de agarose-formaldeído (item 19.)
- Utilização de marcadores de RNA com massa molecular conhecida (0,24-9,5 Kb RNA Ladder; Gibco-BRL).

22. Extração de dsRNAs (RNAs de fita dupla)

- Método de extração descrito por Morris & Dodds (1979)
- 7 g de folhas congeladas em N₂ líquido e trituradas a pó
- Extração com 14 ml de tampão STE (STE 1X = Tris.HCl 0,05 M pH 7,0; NaCl 0,1 M; EDTA 0,001 M), 18 ml de fenol saturado com STE 2 X, 2 ml de SDS 10% e 1 ml de bentonite (40mg/ml). Agitação por 30 min.
- Coleta da fase aquosa após centrifugação por 10 min. a 4.000g.
- Adição de etanol na concentração final de 16,5%
- Passagem em coluna de celulose CF-11 (Whatman) preparada em seringa plástica com 2,5 g de celulose dissolvida em tampão STE 1X contendo etanol 16,5%

- Lavagem da coluna com 80 ml de tampão STE 1X contendo etanol 16,5%
- Eluição do dsRNA com 15 ml (1 x 5 ml e 1 x 10 ml) de tampão STE 1X sem etanol. Primeiros 5 ml descartados
- Precipitação do dsRNA por 16 h a -20°C com 0,05 vol. de acetato de sódio 3 M pH 5,5 e 2,5 vol. de etanol
- Recuperação do dsDNA por centrifugação a 8.000g por 30 min. a 4°C
- Ressuspensão em água-DEPC e estocagem a -20°C

23. Gel nativo de agarose

- Agarose 1% em tampão TAE (Tris.HCl 0,04 M; acetato de sódio 0,02 M; EDTA 0,001 M pH 8,3)
- Amostras de ácidos nucleicos diluídas em tampão IEG (TAE; glicerol 20% e Orange G)
- Eletroforese a 80-100 V até o corante chegar cerca de 1 cm da porção final do gel; tampão de corrida TAE
- Ácidos nucleicos corados por 10 min. com brometo de etídio (0,05 $\mu\text{g/ml}$), descorados em água-DEPC e observados e fotografados sob luz ultravioleta

24. Determinação da massa molecular dos dsRNAs

- Gel nativo de agarose (item 23)
- Utilização de dsRNA com tamanho molecular conhecido como marcadores (dsRNAs de TMV: 6,4 Kpb e CMV: 3,9 Kpb, 3,3 Kpb, 2,5 Kpb, 1,0 Kpb)

25. Análise dos dsRNAs em gel desnaturante de agarose-formaldeído

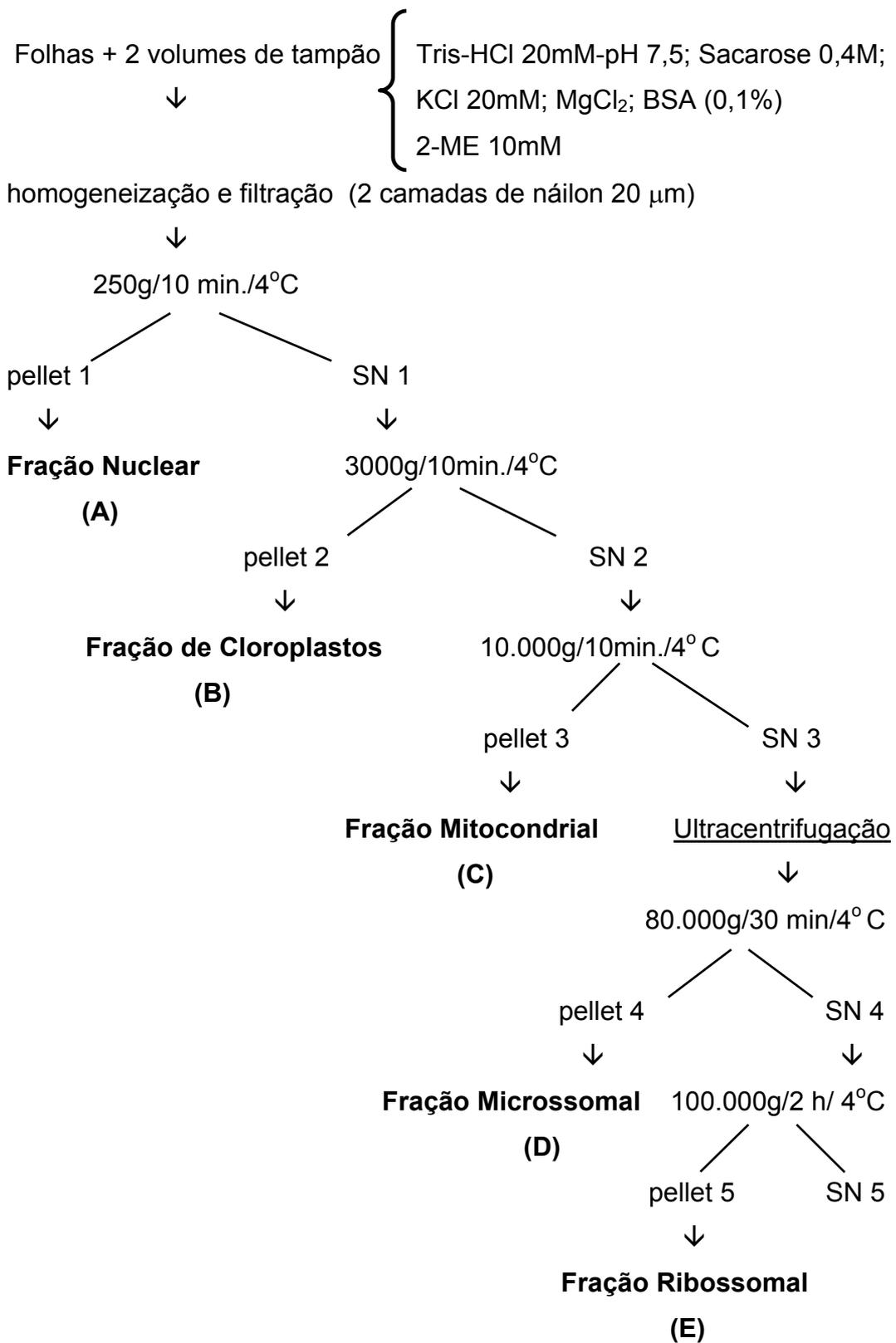
- Eletroforese, “Northern blot”, hibridização e detecção da reação respectivamente conforme itens 19; 20; 17 e 18

26. Preparação de tecidos para exame ultraestrutural (microscopia eletrônica de transmissão)

- Fixação de pequenos pedaços de folhas de feijoeiro infectadas com o SBMV-B^{SP} por 2 horas a 4°C em paraformaldeído 4% e glutaraldeído 0,5% tamponado com cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,0
- Pós-fixação por 4 horas a 4°C em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,0
- Desidratação à temperatura ambiente em série de concentração crescente de etanol: 30%/30 min., 50%, 70% e 100%/30 min., 100% 60 min.
- Infiltração com resina epoxy de baixa viscosidade conforme recomendado por Spurr (1969)
- Polimerização por 24 horas a 60°C
- Cortes ultrafinos feitos com navalha de diamante em ultramicrótomo Leica UCT e montados em telinhas de cobre
- Contrastação das secções com solução aquosa de acetato de uranila 1% (2 min) e citrato de chumbo (Venable & Coggeshall, 1965). Observação em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 906 operando a 80KV

27. Fracionamento subcelular

- Amostras de plantas (folhas inoculadas) 7 dias e 21 dias após a inoculação do SBMV- B^{SP} e amostras de plantas saudas
- Fracionamento subcelular conforme esquema a seguir:



28. Extração de ácidos nucleicos das frações subcelulares

- 250 µl das diferentes frações
- Extração conforme item 14
- Análise conforme itens 19 e 20

IV. RESULTADOS

1. SINTOMATOLOGIA

O isolado brasileiro do vírus do mosaico do feijoeiro do sul dos E.U.A. (SBMV-B^{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 1 evidencia estes sintomas. Em 1A pode-se notar o tamanho reduzido da planta infectada em relação a planta sadia com a mesma idade. Este tamanho reduzido é evidenciado comparando-se as folhas trifolioladas (figura 1B), nas quais também nota-se distorção foliar e mosaico nas folhas infectadas.

2. OBTENÇÃO DO VÍRUS PURIFICADO

O espectro de absorvância à luz ultra-violeta (220-320 nm) da preparação purificada do SBMV-B^{SP} (figura 2) apresentou picos máximo e mínimo a 260 e 243 nm respectivamente. A relação A_{260}/A_{280} foi 1,65 e a concentração do vírus purificado foi aproximadamente 70 mg/Kg de folhas.

Uma eletromicrografia da preparação purificada contrastada negativamente é mostrada na figura 3, evidenciando a presença de partículas isométricas com 30 nm de diâmetro.

3. MASSA MOLECULAR DA PROTEÍNA CAPSIDIAL

Em gel desnaturante de SDS-PAGE a proteína capsidial do SBMV-B

migrou como um componente único (figura 4) com massa molecular estimada em 30 kDa, conforme determinação comparativa feita com proteínas de massa molecular conhecida.

4. DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES DO ANTI-SORO

A concentração de imunoglobulinas, estimada pela absorbância à 280 nm, foi de 150 mg/ml. A especificidade do anti-soro produzido é evidenciada na figura 5, na qual o anti-SBMV reagiu com a proteína capsial do SBMV-B^{SP} e com as proteínas totais extraídas de planta infectada, mas não com as extraídas de planta sadia.

Como observado na figura 6, o anti-SBMV foi capaz de reconhecer e se ligar ao antígeno até a diluição de 1:128.000. Na figura 7, observa-se que o anti-SBMV reagiu com o vírus até a concentração de 50 picogramas (0,05 ng) e detectou o antígeno em extrato de planta infectada diluído até 100 vezes. Houve uma fraca reação de fundo com o extrato de planta sadia nas menores diluições (5X e 10X), desaparecendo à partir da diluição de 50X.

5. IMUNOLocalização DA PROTEÍNA CAPSIAL EM EXTRATOS DE FOLHAS

O perfil eletroforético de extratos de folhas de feijoeiro sadio e infectado pelo SBMV-B (figura 8.1) revelou um padrão de bandas similar em ambas amostras, com exceção para uma banda adicional, vista na amostra obtida de feijoeiro infectado, na altura da banda correspondente à proteína capsial do SBMV-B^{SP}. A identidade deste polipeptídeo foi confirmada por “Western blotting” de um gel similar a este utilizando o anti-SBMV diluído na proporção 1:2.000 (figura 8.2). Observou-se reação

com uma banda de aproximadamente 30 kDa tanto na amostra de vírus purificado como na amostra de proteínas totais obtidas de planta infectada pelo SBMV-B^{SP}. Não houve reação com a amostra de planta sadia.

6. ESPECIFICIDADE DA SONDA

A sonda produzida para o RNA viral hibridizou especificamente com a amostra de RNA extraído dos virions e com a de RNAs totais de planta infectada pelo SBMV-B^{SP} (figura 9). Nenhuma hibridização ocorreu com a amostra de RNAs totais de planta sadia.

7. ANÁLISE DO RNA VIRAL

A figura 10.1 refere-se à eletroforese em gel desnaturante de agarose do RNA extraído das partículas do SBMV-B^{SP} e dos RNAs totais extraídos de planta de feijoeiro infectada e de planta sadia. O RNA extraído dos virions revelou uma banda maior com tamanho molecular de 4,2 Kb além de vários outros RNAs de menor tamanho, dos quais uma banda encontra-se melhor definida, tendo tamanho molecular de aproximadamente 1,0 Kb. Na amostra de RNAs totais extraídos de planta infectada pelo SBMV-B^{SP} e na de planta sadia várias bandas são observadas.

Um gel similar a este foi transferido por “Northern-blotting” e hibridizado com sonda não radioativa específica ao genoma do SBMV (figura 10.2.). Na amostra de RNA extraído dos virions bem como na de RNAs totais extraídos de planta infectada houve reação com a banda de 4,2 Kb, bem como com vários outros RNAs de menor tamanho (3,1 Kb, 2,65 Kb, 2,15 Kb, 1,64 Kb, 1,36 Kb e 1,0 Kb). Nenhuma reação foi vista

com os RNAs totais extraídos de planta sadia.

8. EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE RNAs DE FITA DUPLA ASSOCIADOS AO SBMV-B

Os RNAs de fita dupla foram extraídos e analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (figura 11.1). Duas espécies de ds RNAs foram detectados em planta de feijoeiro infectada pelo SBMV-B^{SP}, com valores estimados de 4,2 Kpb e 1,0 Kpb.

Por “Northern-blotting” e hibridização com sonda para o genoma do vírus (figura 11.2) houve hibridização com estas duas espécies de dsRNAs

9. CITOPATOLOGIA DOS TECIDOS FOLIARES INFECTADOS PELO SBMV

A figura 12 refere-se às ultramicrografias das secções de folhas de feijoeiro ‘Rosinha’ infectadas pelo SBMV-B^{SP}. Nota-se a presença de partículas isométricas semelhantes a vírus dispersas por todo o citoplasma e, às vezes, arranjadas em um padrão regular formando uma estrutura que se assemelha a um cristal (figura 12A: inserção). O diâmetro destas partículas foi da ordem de 28-30 nm. Não foram encontradas tais partículas no núcleo celular e nem no interior de organelas como mitocôndrias e cloroplastos.

Observou-se um aumento na ocorrência de estruturas membranosas nas células infectadas (figura 12B). Tais estruturas geralmente encontravam-se próximas aos presumíveis virions e parecem conter em seu interior.

10. IDENTIFICAÇÃO DO SBMV-B EM FRAÇÕES SUBCELULARES

A figura 13.1 refere-se à análise em gel de agarose dos RNAs presentes em cada uma das frações celulares obtidas de plantas 7 dias pós inoculação (d.p.i.) do vírus. O RNA extraído de partículas virais foi utilizado como referência. Um grande número de RNAs de tamanhos variados foi observado em cada fração, mas somente na fração ribossomal foi notado um RNA de tamanho similar ao RNA genômico do SBMV. Um gel similar a este foi transferido para membrana de náilon e hibridizado com sonda para o genoma do vírus (figura 12.2). A sonda detectou o RNA viral somente nas frações microsomal e ribossomal. Não houve reação com as outras frações e nem com fração ribossomal de planta sadia.

A figura 14.1 refere-se a um experimento similar feito com as frações obtidas de plantas 21 d.p.i.. O RNA extraído das partículas virais foi novamente 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 14.2). Não houve reação com nenhuma das outras frações e nem com a fração ribossomal de planta sadia.

Em ambas as amostras (7 e 21 d.p.i.) somente as folhas inoculadas foram utilizadas.

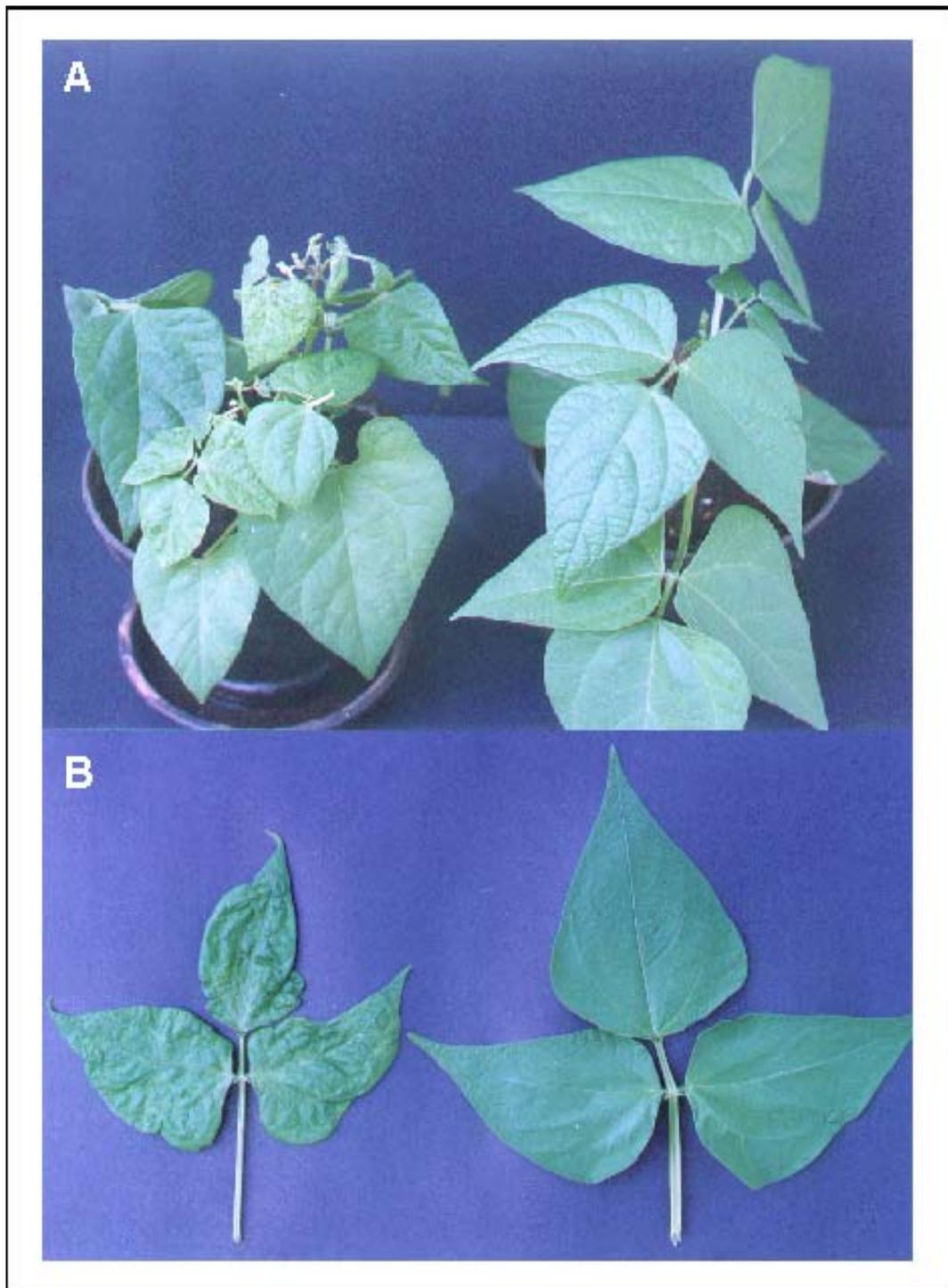


Figura 1. Sintomatologia induzida pelo isolado brasileiro do vírus do mosaico do feijoeiro do sul dos EUA (SBMV-B^{SP}) em *Phaseolus vulgaris* 'Rosinha'. (A) Planta infectada (esquerda) comparada com planta sadia (direita). (B) Comparação de folha infectada (esquerda) e sadia (direita). Plantas sadias e infectadas de mesma idade.

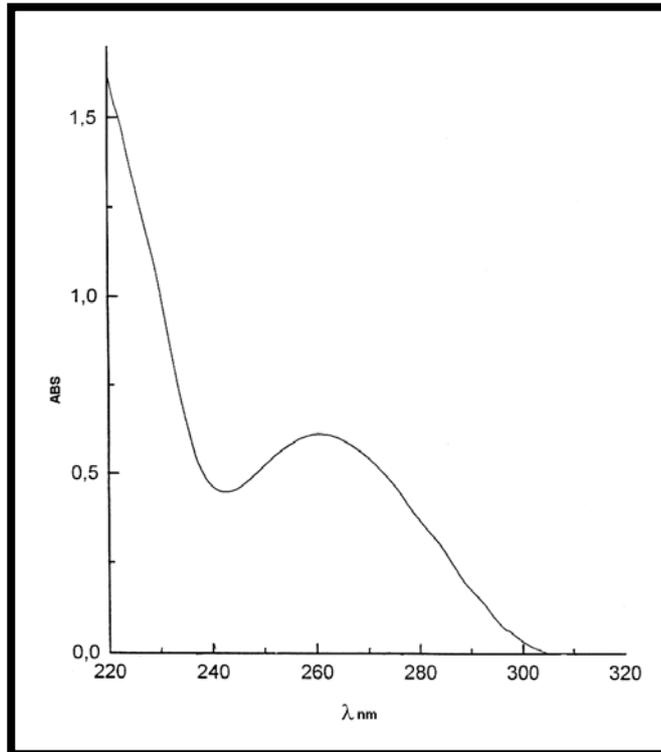


Figura 2. Espectro de absorbância em luz ultravioleta do SBMV-B^{SP} purificado.

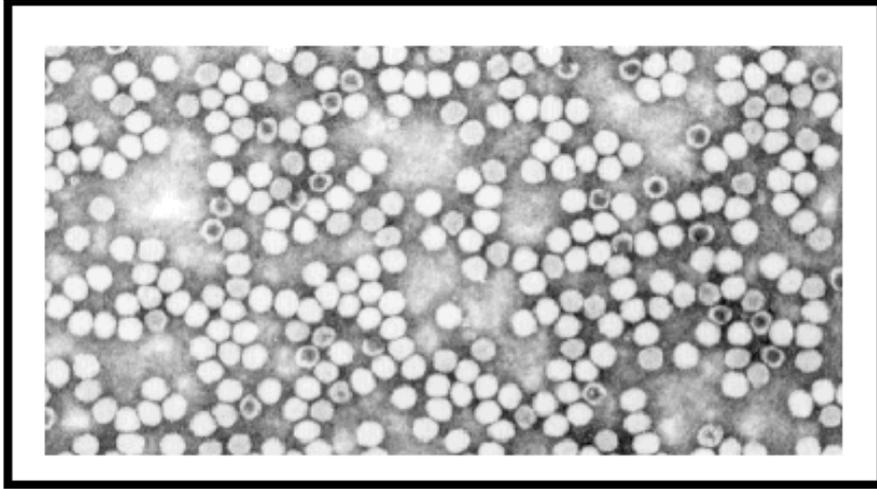


Figura 3. Preparação purificada do SBMV-B^{SP} contrastada negativamente com acetato de uranila 2% e observada ao microscópio eletrônico de transmissão, mostrando partículas virais com 30 nm de diâmetro e simetria icosaédrica. Aumento: 130.000 x

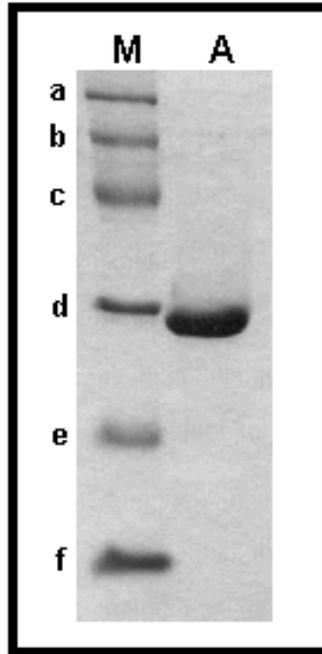


Figura 4. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida da proteína da capa do SBMV-B^{SP}. **A**, marcadores de massa molecular: **a**, fosforilase B (97,4 kDa); **b**, albumina bovina (66,2 kDa); **c**, ovoalbumina (45,0 kDa); **d**, anidrase carbônica (31,0 kDa); **e**, inibidor de tripsina de soja (21,5 kDa); **f**, lisozima (14,4 kDa). **B**, proteína capsial do SBMV-B. kDa: kilodaltons

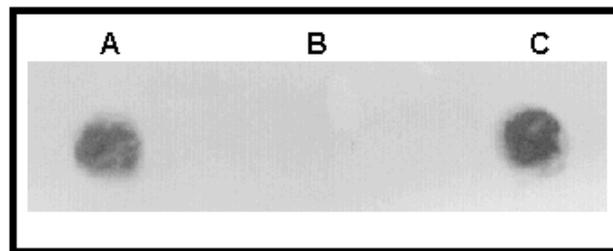


Figura 5. Especificidade do anti-soro. A membrana de nitrocelulose foi incubada com o anti-soro anti-SBMV diluído 1:8.000. **A**, alíquota do SBMV-B^{SP} purificado. **B**, alíquota de proteínas totais de planta sadia. **C**, alíquota de proteínas totais de planta infectada com o SBMV-B^{SP}.

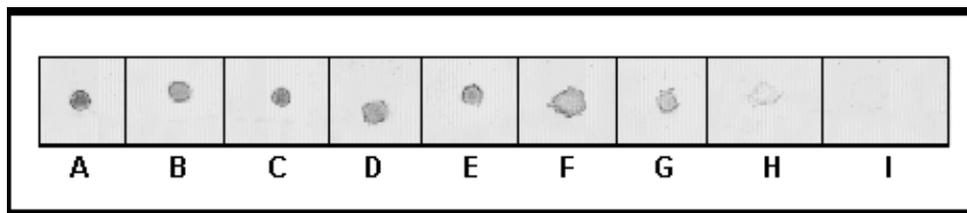


Figura 6. Determinação do título do anti-soro para a proteína capsial do SBMV-B^{SP}. Foram aplicados 100 ng de vírus purificado em cada membrana de nitrocelulose. Diluições do anti-SBMV: **A**, 1:1.000; **B**, 1:2.000; **C**, 1:4.000; **D**, 1:8.000; **E**, 1:16.000; **F**, 1:32.000; **G**, 1:64.000; **H**, 1:128.000; **I**, 1:256.000.

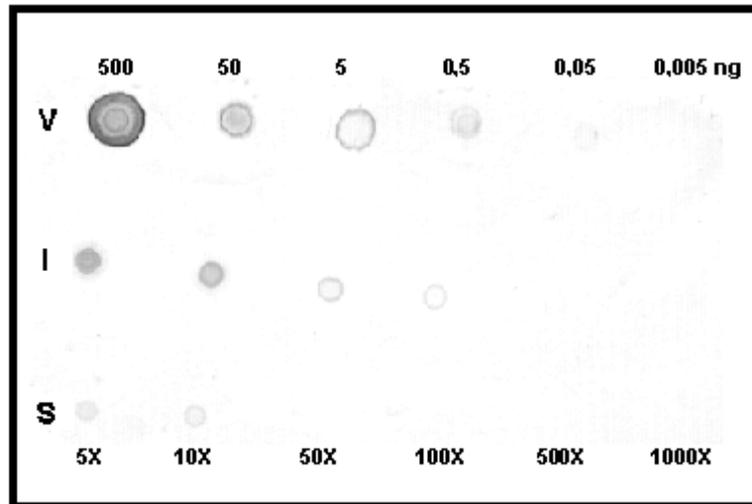


Figura 7. Determinação da diluição máxima do antígeno reconhecida pelo anti-soro. A membrana de nitrocelulose foi incubada com anti-SBMV diluído 1:8.000. **V**, SBMV-B purificado; **I**, extrato de folhas infectadas pelo SBMV-B^{SP}; **S**, extrato de folhas saudáveis.

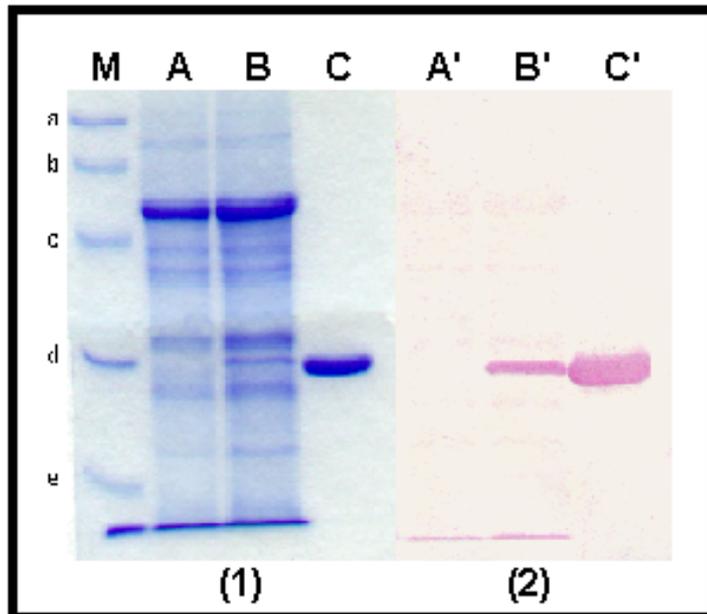


Figura 8. 1. Perfil eletroforético de extrato de planta sadia (**A**), planta infectada (**B**) e SBMV-B^{SP} purificado (**C**). **2.** "Western Blot" e reação imunológica de um gel similar ao 1 para a detecção da proteína capsial do SBMV (seta) em *P. vulgaris* pelo anti-SBMV diluído 1:2.000.

Marcadores de massa molecular (**M**): **a**, fosforilase B (97,4 kDa); **b**, albumina bovina (66,2 kDa); **c**, ovoalbumina (45,0 kDa); **d**, anidrase carbônica (31,0 kDa); **e**, inibidor de tripsina de soja (21,5 kDa).

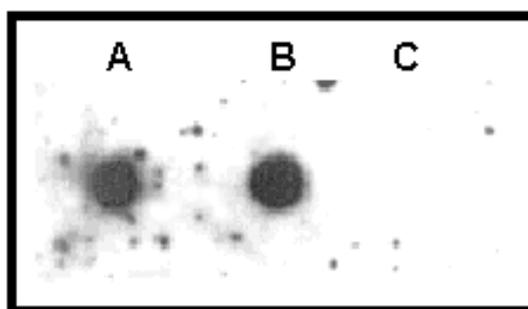


Figura 9. Especificidade da sonda. A membrana de náilon foi incubada com a sonda para o RNA genômico do SBMV. **A**, alíquota do RNA extraído do SBMV-B^{SP} purificado. **B**, alíquota de RNA total de planta infectada pelo SBMV-B^{SP}. **C**, alíquota de RNA total de planta sadia.

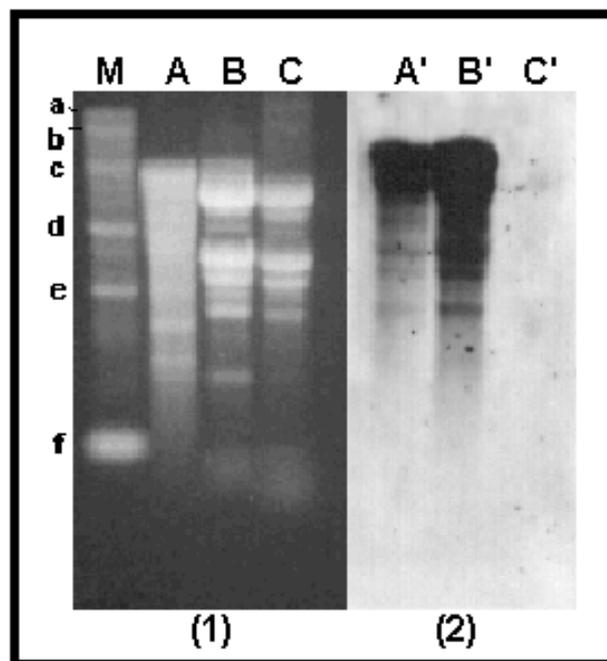


Figura 10. 1. Análise do RNA viral (**A**) e dos RNAs totais extraídos de planta infectada pelo SBMV-B^{SP} (**B**) e de planta sadia (**C**) em gel desnaturante de agarose 1% contendo formaldeído. Padrão de tamanho molecular (Gibco-BRL) (**M**): [Kb: 9,49 (**a**); 7,46 (**b**); 4,40 (**c**); 2,37 (**d**); 1,35 (**e**); 0,24 (**f**)]. **2.** Análise por hibridização “Northern blotting” de um gel similar ao **1** hibridizado com sonda específica ao genoma do SBMV. Alíquota do RNA extraído do SBMV-B^{SP} purificado (**A'**), RNAs extraídos de folha de feijoeiro infectada pelo SBMV-B^{SP} (**B'**), RNAs extraídos de folha de feijoeiro sadia (**C'**).

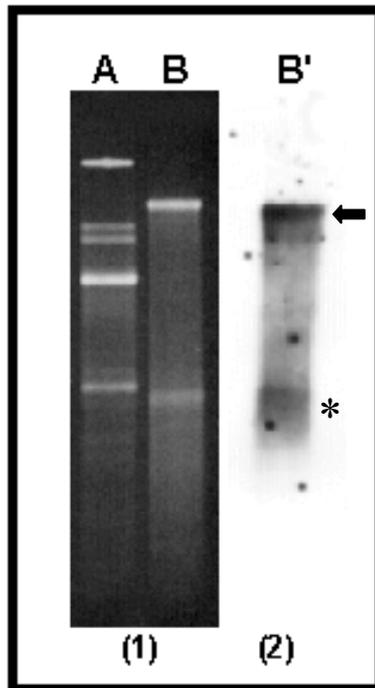


Figura 11. 1. Perfil eletroforético dos dsRNAs extraídos e purificados em celuloose CF-11. **A**, marcadores constituídos de mistura de dsRNAs de TMV (6,4 Kpb) e CMV (3,9 Kpb; 3,3 Kpb; 2,5 Kpb; e 1,0 Kpb). **B**, dsRNAs extraídos de folhas de feijoeiro infectadas pelo SBMV-B^{SP}. **2.** Análise por hibridização “Northern blotting” com sonda produzida à partir do RNA viral. **B'**, alíquota dos dsRNAs extraídos de folhas de feijoeiro infectadas pelo SBMV-B^{SP}. A seta indica o dsRNA genômico e o asterisco o provável dsRNA subgenômico.

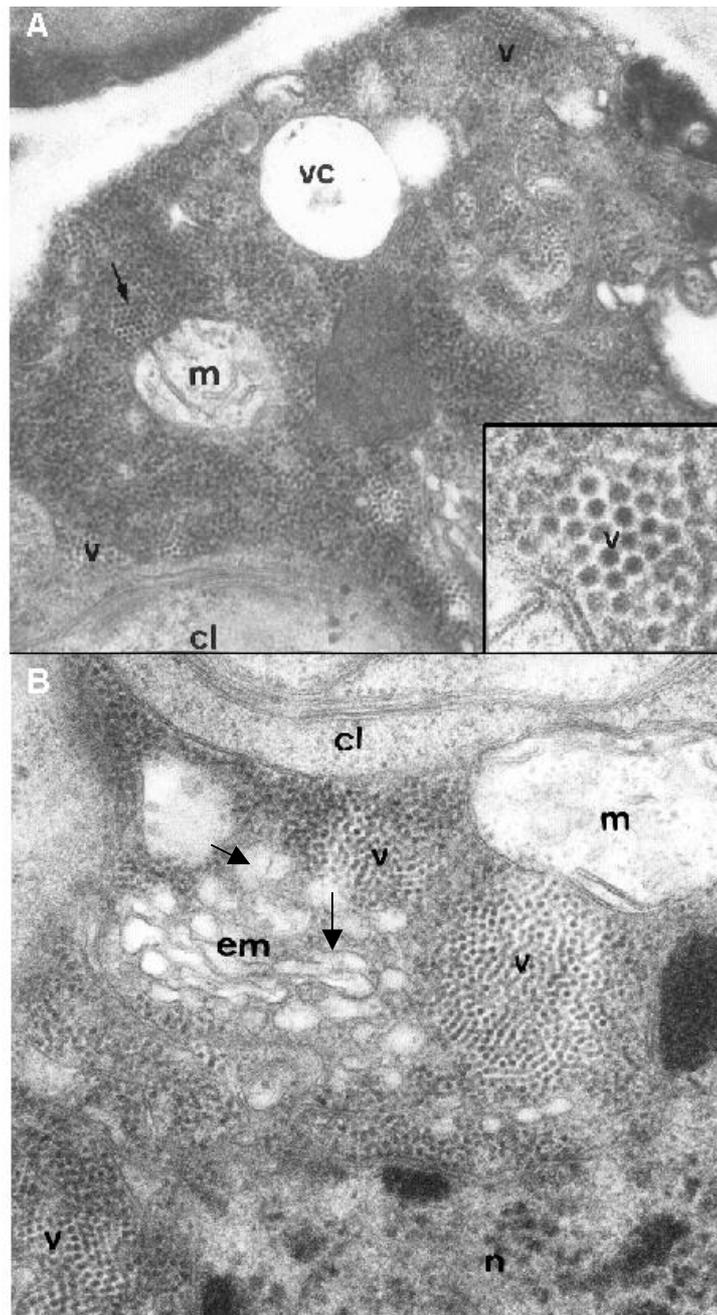


Figura 12. Micrografias eletrônicas de células de tecido foliar de feijoeiro 'Rosinha' infectado pelo SBMV-B^{SP}. **A**, Partículas virais dispersas pelo citoplasma e, às vezes, arranjadas em um padrão regular com estrutura quase cristalina (seta). Aumento 54.000X. A inserção mostra uma ampliação de região indicada pela seta. Aumento 120.000X. **B**, Associação de estruturas membranosas com partículas virais. Notar que estas estruturas parecem conter fibrilas em seu interior (setas). Aumento 120.000X. m, mitocôndria; vc, vacúolo; cl, cloroplasto; em, estruturas membranosas; v, partículas virais; n, núcleo.

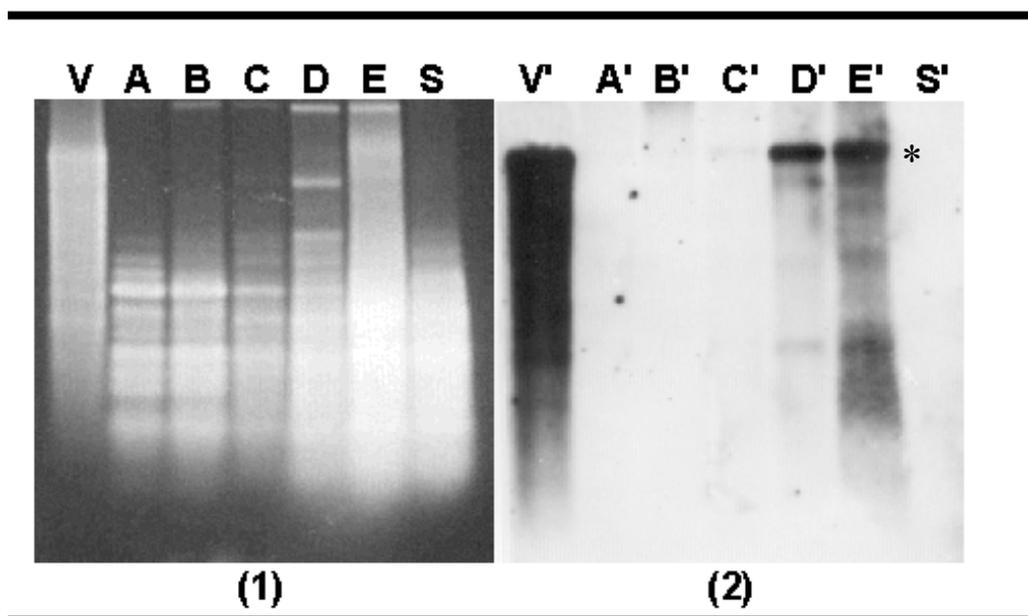


Figura 13. Localização subcelular do SBMV-B^{SP} por centrifugação diferencial de extratos de folhas de feijoeiro infectadas. **1.** Análise eletroforética em gel desnaturante de agarose-formaldeído do RNA viral (**V**), dos RNAs extraídos das frações subcelulares obtidas de planta 7 dias pós inoculação (d.p.i.) do SBMV-B^{SP} (**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 7 d.p.i. **S'**, RNAs extraídos da fração ribossomal de planta sadia. O asterisco indica o RNA genômico viral.

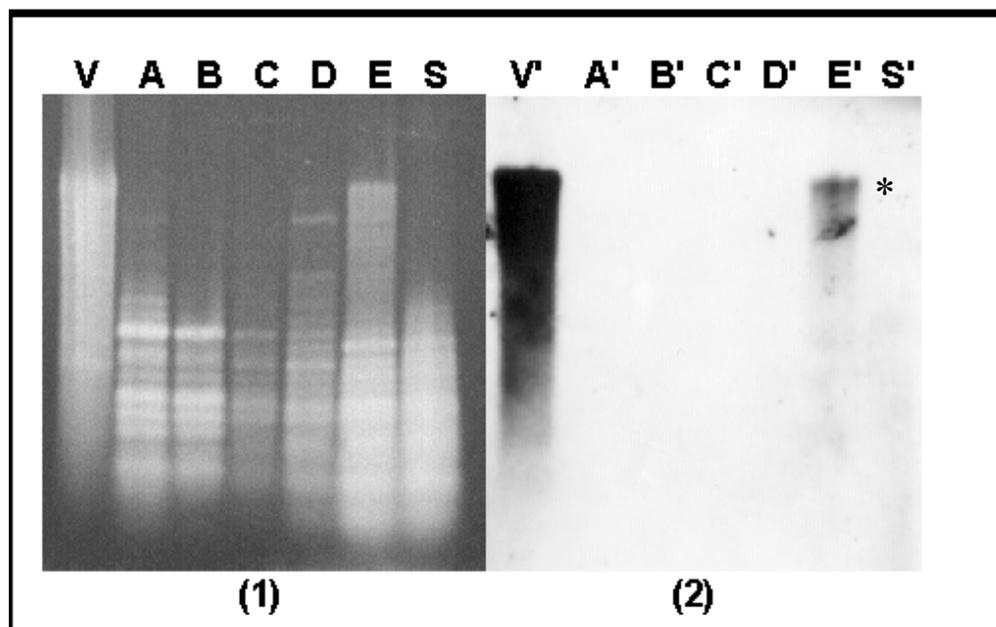


Figura 14. Localização subcelular do SBMV-B^{SP} por centrifugação diferencial de folhas de feijoeiro infectadas. **1.** Análise eletroforética em gel desnaturante de agarose-formaldeído do RNA viral (**V**), dos RNAs extraídos das frações subcelulares obtidas de planta 21 dias pós inoculação (d.p.i.) do SBMV-B (**A-E**) e da fração ribossomal de planta sadia (**S**). As linhas **A-E** correspondem respectivamente as frações: nuclear, cloroplastos, mitocondrial, microsomal, 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. O asterisco indica o RNA genômico viral.

V. DISCUSSÃO

O isolado americano do vírus do mosaico do feijoeiro do sul dos Estados Unidos 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; Rutger *et al.*, 1980; Weber & Sehgal, 1982), seqüenciamento e tradução *in vitro* de cada uma das ORFs (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 encontrados em extrações de ácido nucleico do vírus purificado e a função e o número correto das ORFs da estirpe feijoeiro do SBMV.

Por outro lado, em relação ao isolado brasileiro do SBMV-B muito pouco é conhecido pois, desde sua descrição (Cupertino *et al.*, 1982), este tem sido muito pouco estudado, principalmente do ponto de vista molecular. Um isolado do SBMV-B foi detectado primeiramente no Distrito Federal (SBMV-B^{DF}) (Cupertino *et al.*, 1982) e, posteriormente, o vírus também foi encontrado no Estado de São Paulo (SBMV-B^{SP}) (A. S. Costa. Dados não publicados). 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-B pelo Brasil seja muito mais ampla.

O presente trabalho visou a melhor caracterização do isolado brasileiro do SBMV-B encontrado no Estado de São Paulo (SBMV-B^{SP}), comparando-o com dados publicados acerca dos outros isolados do vírus.

Os resultados obtidos quanto à sintomatologia causada pelo SBMV-B^{SP} estão, em geral, de acordo com os descritos por diversos autores (Bennet & Costa, 1961; Shepherd & Fulton, 1962; Valverde & Fulton, 1982; Murphy *et al.*, 1995; Brunt *et al.*, 1996), não havendo diferenças, neste aspecto, entre este isolado brasileiro e os outros isolados do vírus descritos até então.

Em *P. vulgaris* 'Rosinha', cultivar utilizada no presente trabalho, a infecção mostrou-se sistêmica e os sintomas iniciais apareceram uma semana após a inoculação viral, correspondendo a mosqueado clorótico nas folhas primárias inoculadas. Este sintoma foi seguido por mosaico sistêmico, severa distorção foliar nas folhas mais jovens e redução no tamanho da planta. Não foram feitas comparações em relação à produtividade mas, estudos anteriores com o SBMV-B^{DF} (Caldeira & Costa, 1985) relataram não haver perdas significativas nos componentes biológicos da produção (nº de vagens por planta e nº de sementes por vagem), ocorrendo apenas uma tendência de redução do tamanho das sementes no cultivar Rosinha.

A maioria dos *Sobemovirus* ocorre em concentrações relativamente altas na planta hospedeira (Sehgal, 1981). No entanto, um bom e confiável método de purificação para o SBMV deve levar em conta o fato das partículas virais serem estabilizadas principalmente pelo pH (Hsu *et al.*, 1976) e por ligações dependentes de cátions divalentes (Hull, 1978; Rayment *et al.*, 1978; Abdel-Meguid *et al.*, 1981). Cátions divalentes atuam formando pontes entre as subunidades proteicas vizinhas e as proteínas capsidiais também estabelecem ligações dependentes de pH entre si. Ambos os tipos de ligações colaboram para manter a conformação do capsídio viral. Portanto, na purificação devem ser

utilizados tampões com pH ao redor de 7,0 e os agentes quelantes, que removem cátions, devem ser evitados.

Conhece-se, por exemplo, o efeito do EDTA sobre as partículas do SBMV (Hull, 1977c). O tratamento com este agente quelante, associado com condições de pH alcalino, induz um “afrouxamento” nas partículas, com aumento no diâmetro e redução da sedimentação (115S→100S). Isto torna as partículas sensíveis à sais, SDS em baixas concentrações, proteases e ribonucleases.

Vários protocolos foram descritos para a purificação do SBMV (Tremaine, 1966; Johnson *et al.*, 1974; Hsu *et al.*, 1976; Hull, 1977b; Sehgal & Hsu, 1977). O método de purificação utilizado neste trabalho foi essencialmente aquele descrito por Hull (1977b), exceto pelo fato de que o passo final da purificação foi em gradiente de sacarose ao invés de sulfato de céσιο. Este método, que combina extração, clarificação, precipitação com polietilenoglicol, um ciclo de centrifugação diferencial e isolamento por ultracentrifugação em gradiente, mostrou-se de grande eficácia na purificação do SBMV-B^{SP}. Em gradiente de sacarose observou-se a formação de uma única banda, visualizada por feixe de luz branca, estando de acordo com o observado por outros autores (Brunt *et al.*, 1996; van Der Wilk, 1998). O grau de purificação obtido com a metodologia utilizada pode ser visualizado pelo espectro de absorbância à luz ultravioleta que foi típico de nucleoproteína. Este espectro está de acordo com o descrito para outros isolados do SBMV, pois neste vírus não se observam picos de absorbância entre 290 e 292 nm que seriam devidos à presença de aminoácidos aromáticos, como ocorre, por exemplo, para o vírus do mosaico do fumo (*Tobacco mosaic virus*, TMV, gênero *Tobamovirus*) (Shegal, 1981). O rendimento das várias purificações realizadas durante o trabalho variou entre 50-70 mg de vírus por Kg de folhas, estando abaixo dos valores obtidos- 120 mg/Kg (SBMV-B^{DF}) e 0.5-1.0 g/Kg (isolado americano)- respectivamente por Cupertino *et al.* (1982) e Hull (1977b). Obviamente, estas diferenças devem-se as

variações entre os isolados do vírus (comparando-se, por exemplo, a alta concentração do isolado americano em relação ao brasileiro), a hospedeira utilizada, ao intervalo entre inoculação e coleta e ao método de extração. No entanto, o rendimento aqui obtido demonstra uma alta concentração viral, o que comprova que este vírus ocorre em elevadas concentrações na planta hospedeira.

A pureza da preparação foi ainda confirmada pela sua observação ao microscópio eletrônico de transmissão, na qual foram vistas partículas isométricas com diâmetro estimado em de 30 nm, valor esperado para as partículas do SBMV (Weintraub & Ragetli, 1970; Hull, 1977a.; Sehgal, 1981), sem nenhum contaminante detectável. As partículas virais visualizadas não exibiram características de superfície discerníveis, o que foi atribuído por Johnson *et al.* (1974) a uma alta densidade proteica na superfície dos vírions.

O método de purificação, aqui descrito, pode ser executado em um dia de trabalho (8-10 h), constituindo um meio bastante simples e rápido para a purificação do SBMV-B^{SP}. A ausência de contaminantes na preparação purificada foi essencial para o sucesso dos experimentos subseqüentes, entre eles a produção do anti-soro para a proteína capsidial e da sonda para o RNA viral. A presença de impurezas prejudicaria a especificidade tanto do anti-soro como da sonda, podendo originar reações inespecíficas.

Quando inoculadas em plantas sadias de *P. vulgaris* L. cv. Rosinha, as preparações purificadas mostraram-se altamente infectivas, reproduzindo os sintomas típicos da doença causada pelo vírus. Extratos de folhas destas plantas foram também infectivos quando novamente inoculados em feijoeiros sadios sendo, então, o SBMV-B^{SP} purificado à partir destas plantas. Estes dados estão de acordo com os postulados de Kock, aplicados em fitovirologia, quanto à patogenicidade do SBMV na indução de moléstias de feijoeiro.

A proteína capsidial do SBMV-B^{SP} migrou em gel desnaturante de

SDS-poliacrilamida como único polipeptídeo, com massa molecular estimada em 30 KDa. Este valor pode ser considerado dentro da média obtida por outros autores (Tremaine, 1966; Ghabrial *et al.*, 1967; Hill & Shepherd, 1971; Hull 1977b; Sehgal & Hsu, 1977; Murphy *et al.*, 1995) para os vários isolados do SBMV, que varia de 28,5 a 30 Kda e, também neste aspecto, este isolado brasileiro é similar ao isolado americano do SBMV. Deve-se ressaltar, entretanto, que dados da seqüência de aminoácidos da proteína capsidial do SBMV-B indicam a presença de 270 resíduos de aminoácidos e a massa molecular desta proteína deduzida com base nestes aminoácidos é de 29,3 KDa (Tremaine, 1966), ficando bastante próximo ao valor aqui descrito. Os dados ainda confirmam que a capa proteica do SBMV é composta por um único tipo proteico e, segundo Caspar & Klug (1962), são necessárias 180 subunidades proteicas para a formação do capsídeo completo, um número consistente com a simetria T=3 exibida pelas partículas virais. Os dímeros da proteína capsidial (66 KDa), que aparecem como uma fraca banda em géis de eletroforese (Sehgal & Hsu, 1977), não foram visualizados neste experimento provavelmente devido à pouca sensibilidade do método de coloração empregado às proteínas de concentração muito baixa (Walsh & Headon, 1996).

Um anti-soro para a proteína capsidial foi obtido de galinhas imunizadas com preparações purificadas do SBMV-B^{SP}, sendo este chamado anti-SBMV. O método utilizado para a produção deste anti-soro (Hu *et al.*, 1985) foi bastante eficiente, fornecendo uma alta concentração de imunoglobulinas (150mg/ml). Além de ser simples e de baixo custo, este método utiliza galinhas como produtoras de imunoglobulinas ao invés de coelhos que são os animais geralmente utilizados.

Vários pesquisadores têm descrito vantagens em se utilizar galinhas para produzir anticorpos contra vírus de plantas (Bar-Joseph & Malkinson, 1980; Polson & VonWechmar, 1980; van Regenmortel, 1982; Ball *et al.*, 1990; Colariccio *et al.*, 1996). Estas vantagens incluem

facilidade de manuseio, produção de grandes quantidades de anticorpos concentrados na gema do ovo após injeção de quantidades relativamente pequenas de vírus, grande quantidade de ovos dos quais o anticorpo pode ser extraído e concentrado e a apropriação do uso destes anticorpos em testes sorológicos indiretos associados com anticorpos secundários obtidos de outros animais.

A especificidade do anti-SBMV foi avaliada pela técnica “Dot-blotting” e sua diluição ótima estabelecida em 1:8000. Os resultados demonstraram que o anti-SBMV é específico para a proteína capsial e não reage com as outras proteínas da planta sendo, então, utilizado nos experimentos subseqüentes.

Quanto ao experimento para a determinação do título do anti-soro, observou-se que o anti-SBMV diluído até a proporção 1:128.000 ainda foi capaz de detectar o antígeno, apresentando, portanto, um título muito alto.

Em anti-soros policlonais, como é o caso do anti-SBMV, o título representa o conjunto dos valores de concentração e afinidade ao antígeno de cada uma das moléculas de anticorpo presente reconhecendo cada determinante do antígeno (Bjerrum & Heegaard, 1988). A produção de um anti-soro de alto título está diretamente relacionada à concentração e imunogenicidade do antígeno injetado. No caso do SBMV, além de ter sido injetado na concentração de 170µg [anti-soros de títulos adequados podem ser obtidos com apenas 50-100µg de antígeno (Matthews, 1993)], esse é dito fortemente imunogênico devido as características peculiares das proteínas que constituem sua capa proteica (Sehgal, 1981).

Um anti-soro para o isolado encontrado no Distrito Federal (SBMV-B^{DF}) já tinha sido obtido (Cupertino *et al.*, 1982) apresentando um título muito menor (1:512) do que o anti-SBMV produzido no presente trabalho. No entanto, a metodologia utilizada para determinar o título do anti-soro para o SBMV-B^{DF} foi outra (testes de imunodifusão em gel) daquela

utilizada no presente trabalho (“Dot-blotting”) e talvez esta seja uma das razões da diferença de título dos anti-soros para os isolados brasileiros.

O experimento para determinar a diluição máxima refere-se à sensibilidade do anti-SBMV em detectar o antígeno. O anti-SBMV foi capaz de detectar o vírus em preparações purificadas com concentrações tão baixas como 500 picogramas (0,5 ng). Também foi capaz de reconhecer o antígeno em extrato de planta infectada diluído até 100 vezes. Devido à sua sensibilidade, este anti-soro poderá ser utilizado para fins de diagnóstico, identificando se o vírus causador da infecção é o SBMV mesmo em hospedeiras em que este possa estar em baixa concentração. Como houve uma fraca reação de fundo com o extrato de planta sadia nas menores diluições (5X e 10X), deve-se utilizar extratos (0,1g/ml) diluídos mais de 10X para que se tenha confiança nos resultados, pois diluições menores poderão fornecer falsos positivos.

A presença do SBMV-B^{SP} em extratos de folhas de *Phaseolus vulgaris* cv. Rosinha foi também evidenciada por imunolocalização por “Western blotting”, o qual emprega proteínas desnaturadas. Observou-se reação com uma banda de aproximadamente 30 kDa, tanto na amostra de vírus purificado como na amostra de proteínas totais obtidas de planta infectada, sendo possível distinguir a proteína capsidial entre as outras proteínas presentes na planta [das quais destaca-se a enzima Ribulose Bisfosfato Carboxilase (Rubisco) presente em elevadas concentrações nos vegetais] devido à reação com o anti-soro. Houve reação com apenas uma banda em ambas as amostras, comprovando mais uma vez a presença de apenas um tipo proteico constituindo o capsídio do SBMV. Não foram detectados produtos de degradação desta proteína, estando de acordo com a acentuada estabilidade do SBMV *in vitro* (Hsu *et al.*, 1976; Hull, 1977b, Sehgal, 1981).

A sonda não radioativa produzida para detectar o genoma do SBMV-B^{SP} mostrou-se específica ao RNA viral pois hibridizou somente com amostras que continham RNAs do vírus. Devido à esta

especificidade, a sonda foi de grande utilidade para os experimentos subsequentes como as análises de “Northern blotting” do RNA viral e do RNA de fita dupla, que é obtido durante a replicação do vírus, auxiliando o melhor entendimento do genoma deste isolado brasileiro do SBMV-B.

O perfil eletroforético dos RNAs extraídos dos virions revelou a presença de uma gama de RNAs de vários tamanhos. Entre estes pode ser reconhecida a banda de 4,2 Kb, que corresponde ao RNA genômico já que possui tamanho molecular comparável à outros isolados do SBMV (Sehgal, 1981; Rutgers *et al.*, 1980), e outra banda de 1,0 Kb que é referida por alguns autores como sendo o RNA subgenômico que codifica para a proteína capsidial do vírus (Rutgers *et al.*, 1980; Ghosh *et al.*, 1981).

Na amostra de RNAs totais extraídos de folhas infectadas, por “Northern-blotting” e hibridização com a sonda do SBMV foi possível detectar os RNAs relacionados com o genoma viral. O padrão de bandas detectadas foi similar na amostra de RNA extraído dos virions e na de RNAs totais extraídos de planta infectada, sendo possível reconhecer o RNA genômico e os vários outros RNAs de menor tamanho, comprovando que estes realmente estão relacionadas com o genoma do vírus, apresentando alguma semelhança com a seqüência de bases do RNA genômico.

Por muito tempo considerou-se que o SBMV era um típico exemplo de vírus contendo uma cadeia de RNA como seu único componente genético (Diener, 1965; Shepherd, 1971). As presentes observações com o isolado brasileiro, bem como outros estudos com o isolado americano do SBMV (Rutgers *et al.*, 1980; Ghosh *et al.*, 1981, Weber & Sehgal, 1982), contradizem este conceito verificando que as estratégias de replicação do vírus provavelmente são muito mais complexas. Comprovou-se que o RNA presente nos virions é heterogêneo, havendo uma gama de RNAs de menor tamanho além do RNA genômico de comprimento total (4,2 Kb).

O presente trabalho com o SBMV-B^{SP}, além de confirmar esta heterogeneidade, demonstrou pela primeira vez que estes RNAs, além dos virions, também estão presentes em quantidades detectáveis dentro da planta hospedeira, o que sugere que devam exercer alguma função relacionada com a infecção viral.

Opiniões divergem a respeito desses RNAs. Weber & Sehgal (1982) consideram todos os RNAs de tamanho menor do que o RNA genômico como sendo subgenômicos (sgRNAs) e sugerem que todos estão envolvidos na produção das proteínas que são codificadas pelo genoma do SBMV, atuando como “cistrons”. Segundo Weber & Sehgal (1982), estes sgRNAs poderiam ter surgido pelo processamento do genoma viral, como ocorre em várias vírus que infectam animais (Rothenberg *et al.*, 1978), ou por uma transcrição preferencial de segmentos selecionados da fita negativa do RNA genômico (que é produzida durante a replicação), sendo esta última hipótese já considerada para outros vírus de plantas (Atabekov & Morozov, 1979).

No entanto, outros autores (Rutgers *et al.*, 1980; Ghosh *et al.*, 1979, 1981) consideram apenas o RNA de 1,0 Kb, e peso molecular de 0,38 kDa, como subgenômico, sendo responsável pela codificação da proteína capsidial do SBMV (29 kDa). Nestes estudos, verificou-se que o sgRNA de 1,0 Kb possui as 91 bases de sua extremidade 3' idênticas a seqüência da extremidade correspondente do RNA genômico de comprimento total e, assim como o RNA genômico, este sgRNA possui uma VPg (proteína ligada covalentemente ao RNA viral) ligada à sua extremidade 5' (Ghosh *et al.*, 1979, 1981). Devido a estas observações, suspeita-se que a informação para a proteína capsidial estaria presente no RNA genômico como um “cistron” silencioso e que este “cistron” deva se expressar através de um RNA subgenômico encapsidado em quantidades diminutas (Rutgers *et al.*, 1980; Ghosh *et al.*, 1981). “Cistrons” silenciosos para proteínas estruturais são observados em outros gêneros de vírus de plantas como, por exemplo, os *Tobamovirus* e

os *Tymovirus*, bem como em vírus de animais como os *Togavirus* e *Retrovirus*. Em todos estes casos, um mRNA subgenômico para proteínas estruturais sintetizados *in vivo*, funciona muito eficientemente como mensageiro *in vitro* (Rutgers *et al.*, 1980). Essa estratégia de replicação aumenta muito a eficiência de produção da proteína estrutural em questão que, no caso do SBMV, é a proteína capsidial necessária em grandes quantidades para a montagem de partículas virais.

Esta última hipótese explica a função do sgRNA de 1,0 Kb, mas não a função dos outros RNAs observados.

A análise do RNA de fita dupla (dsRNA) do SBMV-B^{SP} veio trazer informações adicionais para a resolução do problema em questão. Duas espécies de dsRNA foram detectadas em planta de feijoeiro infectada pelo SBMV-B^{SP} e ambas hibridizaram com a sonda mostrando estarem relacionadas com o genoma do vírus. A identificação de que os RNAs são de fita dupla vem do fato destes terem sido tratados (e não digeridos) com DNase I e Nuclease S1 ao final do processo de extração. A banda de 4,2 Kpb refere-se à forma replicativa do RNA genômico (4,2 Kb) pois apresenta o dobro do tamanho deste, enquanto que a banda de 1,0 Kpb refere-se à forma replicativa do RNA subgenômico que codifica para a proteína capsidial (1,0 Kb).

O dsRNA presente em plantas infectadas por vírus cujo genoma consiste de RNA de fita simples (ssRNA) constitui uma forma replicativa (RF) originada durante a replicação do vírus. A replicação de um vírus de ssRNA de polaridade positiva necessita da síntese de um RNA molde complementar de fita negativa que constitui um intermediário replicativo (RI). Este intermediário pode se parear com o RNA genômico de polaridade positiva formando as RFs que são moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA). 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 (Dodds *et al.*, 1984).

Duas bandas de dsRNAs já tinham sido descritas para o SBMV por Morris & Dodds (1979). O pequeno dsRNA correspondente à RF do RNA subgenômico foi referido por Dawson & Dodds (1982) como sub-RF, sendo também observado em vários outros vírus de planta que contêm RNAs subgenômicos como estratégia de replicação (Dodds *et al.*, 1977; Kaper & Diaz-Ruiz, 1977; Henriques & Morris, 1979; Zelcer *et al.*, 1981). Isto demonstra que a estratégia de replicação para o RNA subgenômico de 1,0 Kb do SBMV é semelhante à do RNA genômico (RNA polaridade positiva → RNA polaridade negativa → RNA polaridade positiva), contrariando a sugestão de Hull (1988) de que o sgRNA seria derivado da iniciação interna da fita negativa do RNA genômico.

O fato dos dsRNAs do SBMV serem apenas dois em contraposição com os vários RNAs de fita simples observados mostra que somente esses estão se replicando através da formação de um intermediário replicativo de fita negativa. Pode-se aventar duas hipóteses para explicar este fato: a de que os outros RNAs visualizados são apenas produtos de degradação do RNA genômico de comprimento total, não se replicando dentro da planta hospedeira, ou que a replicação destes RNAs heterogêneos ocorra de uma forma diferente daquela do RNA genômico como, por exemplo, pela iniciação interna da fita negativa do RNA genômico como já citado por Weber & Sehgal (1982) e também observado para os *Bromovirus* (Hull & Maule, 1985).

Outra hipótese pode ainda ser citada: a de que os RNAs heterogêneos constituem “defective interfering RNAs” (diRNAs) já descritos para o *Sobemovirus* CfMV (Makinen *et al.*, 2000). Os diRNAs são deleções internas ou complexos rearranjos derivados do RNA genômico, encontradas em vários fitovírus que possuem RNA de polaridade positiva, que geralmente conservam as regiões 3' e 5' do RNA genômico como sítios de reconhecimento para a replicase viral (Makinen *et al.*, 2000). Eles geralmente surgem depois de várias passagens do vírus nas plantas hospedeiras (Graves & Roossinck, 1995). No caso do

CfMV, o diRNA parece estar atuando na regulação do gene codificador da proteína capsidial (expresso por um RNA subgenômico) por um mecanismo de interação RNA-RNA.

O fato dos RNAs heterogêneos aparecerem como bandas tão bem definidas e de tamanho constante nas várias extrações realizadas no presente trabalho parece constatar que estes desempenham uma função definida dentro da planta hospedeira, não se tratando apenas de produtos de degradação do RNA genômico. Esta função pode ser apenas estrutural, ou seja, como interações específicas RNA-capa proteica são necessárias para a montagem das partículas virais (Sehgal, 1981), os RNAs heterogêneos poderiam desempenhar uma função na morfogênese viral. Por outro lado, eles podem estar atuando como “cistrons” para as proteínas virais como uma estratégia para otimizar a produção destas proteínas. Uma evidência que fortalece tal hipótese são os experimentos de Rutgers *et al.*, (1980), nos quais verificou-se que todos estes RNAs funcionam como mensageiros *in vitro*. A proteína P4 (12 kDa) do SBMV-B, por exemplo, teve sua tradução induzida por todos os RNAs de diferentes tamanhos observados.

O que fica evidente aqui é que estes RNAs apresentam um mecanismo de replicação diferente daquele do RNA genômico, sem formação de formas replicativas ou dsRNAs.

Componentes subgenômicos, de uma perspectiva evolutiva, poderiam representar uma forma intermediária de desenvolvimento do genoma multipartido ou vice-versa (Reijnders, 1978). Que tais componentes possam conter informações adicionais que levariam a uma melhor sobrevivência viral é desconhecido.

As observações de secções ultrafinas ao microscópio eletrônico de transmissão, de tecido foliar infectado pelo SBMV-B^{SP} revelaram a ocorrência, em grande quantidade, de partículas isométricas semelhantes à vírus dispersas por todo o citoplasma, o que está de acordo com o fato do vírus estar presente em abundância na planta hospedeira (Sehgal,

1981; Hull, 1988). Estas partículas, às vezes, dispunham-se em um padrão regular com estrutura semelhante à um cristal. Neste caso, a disposição das partículas facilita que o seu diâmetro seja medido, estando na ordem de 28-30 nm, em concordância com o diâmetro das partículas do vírus purificado e com aquele observado para outros isolados do vírus (de Zoeten & Gaard, 1969; Weintraub & Ragetli, 1970).

Partículas virais não foram encontradas no interior de mitocôndrias e cloroplastos, o que era esperado, uma vez que em outros estudos (Muñoz & Kitajima, 1990; de Zoeten & Gaard, 1969; Weintraub & Ragetli, 1970) o vírus não foi encontrado associado com estas organelas.

A presença de estruturas membranosas geralmente próximas de partículas virais foi um fato freqüente na associação do SBMV-B^{SP} com as células hospedeiras. Tais estruturas membranosas parecem conter fibrilas em seu interior. Vesículas membranosas contendo fibrilas têm sido observadas em células infectadas por diversos vírus de plantas (Martelli & Russo, 1977) e interpretadas como possíveis sítios de atividade de transcrição e/ou tradução do vírus, sendo também possível que as membranas estejam implicadas no transporte do RNA viral do sítio de síntese para sítios de montagem das partículas (Giovanni & Russo, 1977). Isto já foi sugerido para os *Sobemovirus* devido à presença de fibrilas envolvidas com o retículo endoplasmático nas células infectadas por vírus do gênero (Hull, 1988). Há indícios de que estas fibrilas sejam dsRNAs (Francki *et al.*, 1985b), intermediário formado durante a replicação viral, indicando que a replicação viral esteja relacionada com o sistema de membranas.

Em suas interações com plantas, muitos vírus induzem importantes mudanças no metabolismo que geralmente refletem em uma variedade de alterações citológicas características. Algumas destas mudanças foram descritas como sendo, direta ou indiretamente, associadas com a replicação ou acúmulo do vírus (Más *et al.*, 2000).

Algumas diferenças quanto a citopatologia entre o isolado brasileiro e o americano do SBMV-B foram observadas. A primeira é a formação de cristais verificada nos isolados brasileiros pois, no presente estudo, as partículas do SBMV-B^{SP} assumiram arranjos semelhantes a cristais e a formação de cristais também foi relatada anteriormente por Munõz & Kitajima (1990) para o SBMV-B^{DF}. No entanto, isto contradiz as observações realizadas com o isolado americano (de Zoeten & Gaard, 1969; Weintraub & Ragetli, 1970) nas quais verificou-se a presença de cristais somente para a espécie SCPMV, enquanto que para o SBMV-B as partículas eram somente vistas dispersas pelo citoplasma. Outra diferença fundamental em relação a distribuição do vírus dentro da célula é que, enquanto o isolado americano do SBMV-B foi encontrado dentro do núcleo, o SBMV-B^{SP} não o foi.

Estas observações podem indicar uma característica diferente entre esses dois isolados o que pode até mesmo levar à uma diferenciação em estirpes, ou representar apenas uma reação particular da interação do vírus com a hospedeira, uma vez que a variedade de feijoeiro utilizada para o isolado americano [feijoeiro cv. "Bontiful" (Weintraub & Ragetli, 1970)] foi outra daquela utilizada no presente estudo com o SBMV-B^{SP} (feijoeiro cv. "Rosinha").

A ausência do SBMV-B^{SP} no núcleo é ainda mais instigante levando-se em conta o fato de que Muñoz e Kitajima (1990) citaram a presença do isolado encontrado no Distrito Federal no núcleo celular. Para confirmar as observações feitas no presente trabalho quanto a distribuição das partículas virais do SBMV-B^{SP} pela célula infectada, foi realizado o fracionamento celular por centrifugação diferencial utilizando extratos de planta infectada, que possibilitaram a localização subcelular de RNAs virais por posterior "Northern blotting" e hibridização com a sonda para o genoma viral. O objetivo foi obter informações acerca do sítio de replicação ou acumulação do SBMV-B^{SP} na célula hospedeira. As

frações obtidas com o fracionamento celular foram: nuclear, cloroplastos, mitocôndrial, microsomal e ribossomal.

Os resultados diferiram em relação ao período de infecção da planta utilizada. Nas plantas infectadas 7 dias pós inoculação (d.p.i.), os RNAs do SBMV-B foram detectados nas frações microsomal e ribossomal, enquanto que nas plantas infectadas 21 d.p.i. os RNAs foram detectados apenas nesta última fração.

A fração microsomal é principalmente composta por vesículas do retículo endoplasmático (Más *et al.*, 2000) e a replicação de muitos vírus de RNA de polaridade positiva ocorre associada com membranas (Hall *et al.*, 1982). É portanto sugestivo aceitar-se que esta fração vesicular seja o sítio para a replicação do SBMV-B e/ou acúmulo, uma vez que também foi observado, no presente trabalho, por microscopia eletrônica a associação de estruturas membranosas com as partículas virais (Figura 12B).

Em vários outros trabalhos, a relação das alterações celulares com a infecção viral foi confirmada pela localização subcelular dos componentes virais individuais (Díaz-Ruiz *et al.*, 1987; Okamoto *et al.*, 1988; Marcos & Flores, 1990; Más *et al.*, 2000). Um exemplo que se assemelha com o aqui descrito é o do vírus do enrolamento da folha da cereja (*Cherry leaf roll virus*, CLRV, gênero *Nepovirus*) que também induz o acúmulo de estruturas membranosas nas células por ele infectadas (Jones *et al.*, 1973). A localização subcelular dos componentes virais (RNA e proteína capsidial) mostrou a presença destes principalmente na fração microsomal, confirmando a associação do CLRV com estruturas membranosas (Más *et al.*, 2000).

Para explicar as diferenças observadas na localização dos RNAs virais em relação ao período de infecção deve-se levar em conta a utilização de apenas folhas inoculadas no fracionamento, podendo-se sugerir que aos 7 d.p.i. o vírus está em alta atividade replicativa nestas folhas para invadir os tecidos vizinhos e infectar sistemicamente a planta hospedeira e, assumindo que sua replicação esteja envolvida com

membranas do citoplasma, é esperado que este seja detectado na fração microssomal. Já aos 21 d.p.i., o ritmo da síntese viral deve diminuir sensivelmente (e talvez até inexista) nas folhas inoculadas e, portanto, este não é mais detectado na fração microssomal. Se ainda estiver presente neste sítio, deve estar em quantidades tão pequenas que passam despercebidas pelo sistema de detecção.

A presença de RNAs do SBMV-B^{SP} na fração ribossomal, tanto em plantas 7 como 21 d.p.i., é esperado tanto pela participação dos ribossomos na síntese proteica viral como pela sedimentação das partículas virais devido à força de centrifugação (100.000g) utilizada.

A ausência de RNAs virais nas frações de cloroplastos e mitocôndrias era esperado, uma vez que nenhuma partícula viral, tanto do isolado brasileiro (Muñoz & Kitajima, 1990; presente trabalho) como do americano (de Zoeten & Gaard, 1969; Weintraub & Ragetli, 1970), foi vista associada com estas organelas. As alterações observadas nestas organelas em plantas infectadas pelo SBMV-B devem estar relacionadas com o estresse causado na planta hospedeira e não com o processo de replicação.

O fato dos RNAs do SBMV-B^{SP} não serem detectados na fração nuclear confirmou a ausência de partículas virais nesta organela. Como já citado anteriormente, isto pode representar apenas uma interação particular do vírus com a hospedeira usada, ou uma diferença entre os isolados brasileiro e americano. No entanto, o fato SBMV-B^{DF} encontrarem-se no núcleo (Muñoz & Kitajima, 1990) faz ainda prevalecer uma dúvida. Duas hipóteses podem ser sugeridas para explicar tal fato: a de que os isolados brasileiros encontrados no Distrito Federal e em São Paulo apresentam diferenças entre si ou que as partículas do SBMV-B^{SP} acumulam-se no núcleo apenas em estágios tardios da infecção (mais de três semanas), daí o fato de não serem detectadas, e portanto este seja apenas um local eventual de acúmulo e não sítio de replicação viral.

Experimentos comparativos poderão elucidar as questões relativas ao sítio de multiplicação desses isolados do SBMV-B.

VI. CONCLUSÕES

01. O método de purificação utilizado permitiu a purificação do SBMV-B^{SP} em concentrações satisfatórias para estudos bioquímicos e moleculares.
02. A massa molecular da proteína capsidial do SBMV-B^{SP}, determinada em SDS-PAGE, é 30 kDa.
03. O anti-soro para a proteína capsidial (anti-SBMV) produzido é específico e com alto título.
04. 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) são obtidos de partículas purificadas do SBMV-B^{SP}.
05. RNAs com os mesmos tamanhos (4,2 Kb; 3,1 Kb; 2,65 Kb; 2,15 Kb; 1,64 Kb; 1,36 Kb; e 1,0 Kb) são também extraídos de planta infectada pelo SBMV-B^{SP}.
06. Duas espécies de RNAs de fita dupla são detectados em plantas de feijoeiro infectadas pelo SBMV-B^{SP}, com tamanhos de 4,2 Kpb e 1,0 Kpb.
07. Partículas do SBMV-B^{SP} não são encontradas nos cloroplastos, mitocôndrias e núcleos de células de feijoeiro infectadas.
08. RNAs associados ao SBMV-B^{SP} são encontrados nas frações microsomal e ribossomal.
09. O SBMV-B^{SP} se multiplica associado a membranas no citoplasma celular.

VII. RESUMO

O presente trabalho descreve a caracterização molecular parcial e a localização subcelular de um isolado brasileiro do vírus do mosaico do feijoeiro do sul dos E.U.A. (*southern bean mosaic virus*, SBMV, gênero *Sobemovirus*) encontrado no Estado de São Paulo e aqui intitulado SBMV-B^{SP}.

O SBMV-B^{SP} infectou sistemicamente plantas de *Phaseolus vulgaris* L. 'Rosinha' induzindo mosaico, distorção foliar e redução do tamanho da planta.

O SBMV-B^{SP} foi purificado à partir de folhas de feijoeiros, cv. Rosinha, infectados produzindo preparações de bom grau de pureza e concentração viral satisfatória (50-70 mg/Kg de folhas infectadas).

Por eletroforese em gel desnaturante SDS-PAGE, foi determinada a massa molecular da proteína capsidial com valor estimado em 30 kDa. Um anti-soro para a proteína capsidial foi obtido de galinhas imunizadas com preparações purificadas do vírus (anti-SBMV), sendo este específico e de alto título (1:128.000).

Em SDS-PAGE, uma análise comparativa de extratos de planta sadia e infectada evidenciou a presença de uma banda a mais neste último que foi identificada por "Western blot" utilizando o anti-SBMV como sendo correspondente à proteína capsidial do SBMV-B^{SP}.

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) foram obtidos do SBMV-B^{SP} purificado, confirmando a heterogeneidade dos RNAs presentes nos virions. Uma sonda molecular não radioativa que reconhece especificamente os RNAs do SBMV-B^{SP} e não reconhece RNAs de planta sadia foi produzida. Através de "Northern blot" e hibridização com essa sonda todos os fragmentos de RNAs foram detectados também em extratos de plantas

infectadas pelo vírus, comprovando pela primeira vez a presença dos RNAs heterogêneos na planta hospedeira.

Duas espécies de RNAs de fita dupla foram extraídas a partir de extratos de plantas de feijoeiro infectadas pelo SBMV-B^{SP}, com tamanhos de 4,2 Kpb e 1,0 Kpb.

Nas folhas de feijoeiro, partículas do SBMV-B^{SP} foram encontradas dispersas pelo citoplasma e, às vezes, dispostas em um padrão quase cristalino, sendo que estruturas membranosas foram geralmente vistas associadas com as partículas virais. Partículas não foram encontradas no interior de cloroplastos, mitocôndrias e núcleos de células de feijoeiro infectadas.

Por fracionamento celular, os RNAs virais foram encontrados nas frações microsomal e ribossomal indicando que a replicação do SBMV-B^{SP} ocorre no citoplasma, possivelmente associado com sistemas de membranas.

VIII. SUMMARY

The present work describes the partial molecular characterization and the subcellular localization of a Brazilian isolated of Southern bean mosaic virus (SBMV, genus Sobemovirus) found in the São Paulo State and designated SBMV-B^{SP}.

The SBMV-B^{SP} infected systemically plants of *Phaseolus vulgaris* L "Rosinha" inducing mosaic, leaf distortions and reduction of the size of the plant.

The SBMV-B^{SP} was purified from infected bean leaves yielding preparations with a good degree of purity and satisfactory virus concentration (50-70 mg/kg of infected leaves).

By denaturing gel electrophoresis (SDS-PAGE), the molecular mass of the coat protein was determined to have an estimated value of 30 kDa. An antiserum for the coat protein was obtained from hens immunized with purified viral preparation (anti-SBMV), having high specificity and titre (1:120,000).

In SDS-PAGE a comparative analysis of infected and healthy plants showed the presence of an extra band in extracts of infected plants identified by Western blot, using anti-SBMV, as the coat protein of the SBMV-B^{SP}.

RNAs of many sizes (4.2 Kb; 3.1 Kb; 2.65 Kb; 2.15 Kb; 1.64 Kb; 1.36 Kb; e 1.0 Kb) were detected in SBMV-BSP purified preparations, confirming the heterogeneity of the RNAs found in virions. A non-radioactive molecular probe was produced which recognizes specifically viral RNAs but does not recognize RNAs from healthy plants. Using Northern blot and hybridization with the specific probe it was shown that the heterogenous RNA fragments were also found in extracts of infected plants providing, for the first time, evidence of their presence in the host plant.

Two species of double stranded RNAs (dsRNA) were obtained from extracts of SBMV-BSP infected plants, with sizes of 4.2 Kbp and 1.0 Kbp.

In bean leaves, SBMV-BSP particles were seen dispersed in the cytoplasm and sometimes arranged in almost crystalline patterns. Membranous structures were generally seen associated with virus particles. SBMV-BSP particles were not found inside the chloroplasts, mitochondria and nuclei of bean infected cells.

By cellular fractionation, the viral RNAs were found in microsomal and ribosomal fractions, indicating that SBMV-BSP replication occurs in the cytoplasm, probably associated with the cellular system of membranes.

XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MEGUID, S. S.; YAMANE, T.; FUKUYAMA, K.; ROSSMANN, M. G. The localization of calcium ions in southern bean mosaic virus. **Virology**, v. 114, p. 81-85, 1981.

ATABEKOV, J. G.; MOROZOV, T. Translation of plant virus messengers. **Adv. Virus Res.**, v. 25, p. 1-91, 1979.

BALL, E. M.; HAMPTON, R. O.; DE BOER, S. M.; SCHAAD, N. W. Polyclonal antibodies. In: **Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens** (Hampton, R., Ball, E. M., De Boer, S., eds.). St. Paul, APS Press, p. 33-54, 1990.

BAR-JOSEPH, M.; MALKINSON, M. Hen egg yolk as a source of antiviral antibodies in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a comparison of two plant viruses. **J. Virol. Methods**, v. 1, p. 179-183, 1980.

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.

BJERRUM, O. J.; HEEGAARD, N. H. H. **Handbook of imunoblotting of proteins**. Ed. CRC Press, v.1, 1988. 265p.

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.

BRADLEY, D. W.; ZAITLIN, M. Replication of Tobacco mosaic virus II. The *in vitro* synthesis of high molecular weight virus-specific RNAs. **Virology**, v. 45, p. 192-199, 1971.

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/>. Acesso em: 20 julho 2000.

CALDEIRA, J. C. P. C.; COSTA, C. L. Efeito da infecção com o vírus do mosaico do sul em três estágios do desenvolvimento da planta. **Fitopatol. bras.**, v. 10, p. 310, 1985.

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*. **Fitopatol. Bras.**, v. 1, p. 207-214, 1976.

CASPAR, D. L. D.; KLUG, A. Physical principles in the construction of regular viruses. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, 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.

COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; VICENTE, M.; CHAGAS, C. M.; HAKAKAVA, R. Caracterização parcial de um isolado do vírus do mosaico do pepino de *Musa* sp. 'Nanicão'. **Fitopatol. bras.**, v. 21, p. 268-274, 1996.

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.

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. **Fitopatol. bras.**, 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.). **Fitopatol. bras.**, v. 8, p. 616, 1983.

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>> Acesso em: 24 janeiro 2001.

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.

DAWSON, W. O.; DODDS, J. A. Characterization of sub-genomic double-stranded RNAs from virus infected plants. **Biochemical and Biophysical Res. Commun.**, v. 107, p. 1230-1235, 1982.

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

DÍAZ-RUIZ, J. R.; AVILA-RINCON, M. J.; GARCIA-LUQUE, I. Subcellular localization of cucumovirus-associated satellite double-stranded RNAs. **Plant Sci.**, v. 50, p. 239-248, 1987.

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

DIETZGEN, R. G.; FRANCKI, R. I. B. Nonspecific binding of immunoglobulins to coat protein of certain plant viruses in immunoblots and indirect ELISA. **J. Virol. Methods**, v. 15, p. 159-164, 1987.

DODDS, J. A.; TREMAINE, J. H.; RONALD, W. P. Some properties of carnation ringspot virus single and double-stranded ribonucleic acid. **Virology**, v. 83, p. 322-328, 1977.

DODDS, J. A.; MORRIS, T. J.; JORDAN, R. L. Plant viral double-stranded RNA. **Ann. Rev. Phytopathol.**, 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.

FICHA TÉCNICA-FEIJÃO, 2000. Disponível em <<http://www.consulcoop.com.agr.produtosfeijão.htm>>. Acesso em: 18 janeiro 2001.

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 América Latina. **Fitopatol. (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.

GARRIDO, M. J.; SAVINI, V. Nuevo insecto transmisor del virus del mosaico sureño de la caraota (BSMV). **Boletín de Entomología Venezolana**, v. 11, p. 201, 1996.

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). **Nucl. Acid Res.**, 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. **J. Virol.**, v. 39, p. 87-92, 1981.

GIOVANNI, P.; RUSSO, M. Plant virus inclusion bodies. **Adv. Virus. Res.** 21: 175 –254, 1977.

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 Lett.**, v. 236, p. 287-290, 1988.

GRAVES, M. V.; ROOSSINCK, M. J. Isolation of defective RNAs derived from RNA 3 of the Fny strain of cucumber mosaic virus. **Journal of Virology**, v. 69, p. 4746-4751, 1995.

GREBER, R. S. Some characteristics of solanum nodiflorum virus - a beetle transmitted isometric virus from Australia. **Aust. J. Biol. Sci.**, 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.

HALL, T. C.; MILLER, W. A.; BUJARSKI, J. J. Enzymes involved in the replication of plant viral RNAs. In: **Advances in Plant Pathology**, (Ingram, D., Williams, P., eds.), Academic Press, London, p. 179-189, 1982.

HENRIQUES, M. C.; MORRIS, T. J. Evidence for difference replicative strategies in the plant tombusviruses. **Virology**, v. 99, p. 66-74, 1979

HILL, J. H.; SHEPHERD, R. J. Evidence for a single coat protein in southern bean mosaic virus. **Phytopathology**, v. 61, p. 1408-1409, 1971.

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.

HU, J. S.; ROCHOW, W. F.; DIETERT, R. R. Production and use of antibodies from hen eggs for the SGV isolate of barley yellow dwarf virus. **Phytopathology**, v. 75, p. 914-919, 1985.

HULL, R. The grouping of small spherical plant viruses with single RNA components. **J. Gen. Virol.**, 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.; MAULE, A. J. Virus multiplication In: **The Plant Viruses, Polyhedral Viruses with Tripartite Genomes** (Francki, R. I. B., ed.), Plenum Press, v. 1, p. 83, 1985.

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. **J. Ultrastr. Res.**, v. 46, p. 441-451, 1974.

JONES, A. T.; KINNINMONTH, A. M.; ROBERTS, I. M. Ultrastructural changes in differentiated leaf cells infected with cherry leaf roll virus (CLR). **J. Gen. Virol.**, v. 18, p. 61-64, 1973.

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

KAPER, J. M.; DIAZ-RUIZ, J. R. Molecular weights of the double-stranded RNAs of cucumber mosaic virus strain S and its associated RNA 5. **Virology**, v. 80, p. 214-217, 1977.

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

KOPEK, J. A.; SCOTT, H. A. Southern bean mosaic virus in Mexican bean beetle and bean leaf beetle regurgitants. **J. Gen. Virol.** V. 64, p. 1601, 1983.

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

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

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.

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

MÄKINEN, K.; GENEROZOV, E.; ARSHAVA, N.; KALOSHIN, A.; MOROZOV, S.; ZAVRIEV, S. Detection and characterization of defective interfering RNAs associated with the cocksfoot mottle sobemovirus. **Molecular Biology**, v. 34, p. 291-296, 2000.

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.

MARCOS, J. F.; FLORES, R. Subcellular location of avocado sunblotch viroid in avocado leaves. **Plant Sci.**, v. 67, p. 237-244, 1990.

MARTELLI, G. P.; RUSSO, M. Plant virus inclusion bodies. **Adv. Virus Res.**, v.21, p. 175-266, 1977.

MÁS, P.; SÁNCHEZ-PINA, A.; BALSALOBRE, J. M.; PALLÁS, V. Subcellular localization 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. **Ann. App. Biol.** 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.

MEYER, M. C.; COSTA, C. L.; SANTOS, O. R. Inter-relações de *Ceratoma arcuata* (Coleoptera: Chysomelidae) com quatro vírus de leguminosas. **Fitopatol. bras.**, 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: Chysomelidae). **Fitopatol. bras.**, 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. **J. Gen. Virol.**, v. 72, p. 2633-2638, 1991.

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. **Fitopatol. Bras.**, 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. **J. Gen. Virol.**, v. 75, p. 249-257, 1994.

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

OKAMOTO, S.; YASUNORI, M.; TAKEBE, I. Subcellular localization of tobacco mosaic virus minus strand RNA in infected protoplasts. **Virology**, v.167, p. 194-200, 1988.

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. **Proc. Natl. Acad. Sci. 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.

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

POLSON, A.; VONWECHMAR, M. B. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. **Immunol. Commun.**, v. 9, p. 475-493, 1980.

RALPH, R. K. Double-stranded viral RNA. **Adv. Virus Res.**, v.15, p. 61-158, 1969.

RAYMENT, L.; JOHNSON, J. F.; SUCK, D.; AKIMOTO, T.; ROSSMANN, M. G. An 11 Å-resolution electron density map of southern bean mosaic virus. **Acta Cryst.**, v. B34, p. 567, 1978.

REIJINDERS, L. The origin of multicomponent small ribonucleoprotein viruses. **Adv. Virus. Res.**, v. 23, p. 79-102, 1978.

ROTHENBERG, E.; DONOHUE, D. J.; BALTIMORE, D. Analysis of a 5'-leader sequence on murine leukemia virus 21 S RNA: heteroduplex mapping with long reverse transcriptase products. **Cell**, v. 13, p. 435-451, 1978.

ROSSMANN, M. G.; ABAD-ZAPATERO, C.; HERMODSON, M. A.; ERICKSON, J. W. Subunit interactions in southern bean mosaic virus. **J. Mol. Biol.**, 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.

SALERNO-RIFE, T.; RUTGERS, T.; KAESBERG, P. Translation of southern bean mosaic virus RNA in wheat germ embryo and rabbit reticulocyte extracts. **J. Virol.**, 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.

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.; 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.

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.

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

SHEPHERD, R. J. Southern bean mosaic virus. In: **Descriptions of plant viruses. Commonw. Mycol. Inst./ Assoc. Appl. Biol.**, Kew, Surrey, England, n° 57, 1971.

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. **Fitopatol. bras.**, 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.; 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.

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

SPURR, A. R. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **J. Ultr. Res.**, v. 26, p. 31-43, 1969.

TORRANCE, L.; HARRINSON, B. D. Properties of Scottish isolates of cocksfoot mild mosaic virus and their comparison with others. **Ann. Appl. Biol.**, 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.; RONALD, W. P.; KELLY, E. M. Intermediates of *in vitro* assembly and disassembly of southern bean mosaic virus. **Virology**, v. 118, p. 35-44, 1982.

TREMAINE, J. H.; HAMILTON, R. I. Southern bean mosaic virus. In: **Description of Plant Viruses. Commonw. Mycol. Inst., Assoc. Appl. Biologists**, Kew, Surrey, England, n° 308, 1983.

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

VALVERDE, R. A.; FULTON, J. P. Characterization and variability of strains of southern bean mosaic virus. **Phytopathology**, v. 72, p. 1265-1268, 1982.

VAN DER WILK, F.; HUISMAN, M. J.; CORNELISSEN, B. J. C.; HUTTINGA, H.; GOLDBACH, R. Nucleotide sequence and organization of potato leafroll virus genomic RNA. **FEBS Lett**, v. 254, p. 41-56, 1989.

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.

VAN REGENMORTEL, M. H. V. **Serology and immunochemistry of plant viruses**. Academic Press, New York, 1982. 301 p.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. H.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. **Virus Taxonomy: seventh report of the International Committee on**

Taxonomy of Viruses. Academic Press, 2000. 1162p.

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.

VENABLE, J.; COGGESHALL, R. The use of a simple lead citrate stain in microscopy. **J. Cell Biol.**, v. 25, p. 407-408, 1965.
WALSH, G.; HEADON, D. **Protein biotechnology**. Ed. John Wiley & Sons, 317p., 1996.

WALSH, G.; HEADON, D. **Protein biotechnology**. Ed. John Wiley & Sons, 1996. 317 p.

WALTERS, H. J. Beetle transmission of plant viruses. **Adv. Virus Res.**, 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. **J. Ultr. Res.**, 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.; HARTEY, L. L. A new virus diseases of bean. **Phytopathology**, v. 32, p. 438, 1942.

ZAUMEYER, W. J.; HARTEY, L. L. Two new virus diseases of beans. **J. Agris, Res.**, v. 67, p. 305, 1943.

ZELCER, A.; WEABER, K. F.; BALAZS, E.; ZAITLIN, M. The detection and characterization of viral relate double-stranded RNAs in tobacco mosaic virus-infected plants. **Virology**, v. 113, p. 417-427, 1981.

Autorizo a reprodução (xerox) deste trabalho.

São José do Rio Preto, 06 de fevereiro de 2001.

ANDREIA ESTELA MOREIRA