

VÍRUS DO MOSAICO ANGULAR DO FEIJOEIRO: PURIFICAÇÃO, PESO
MOLECULAR DA PROTEÍNA E ULTRAESTRUTURA DOS
TECIDOS INFECTADOS

JOSÉ OSMAR GASPAR

Orientador: DR. ÁLVARO SANTOS COSTA

*Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo candidato
José Osmar Gaspar e aprovada pela
Comissão Julgadora*

Alvaro Santos Costa
28/05/87

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título em Doutor em Ciências

CAMPINAS
Estado de São Paulo - Brasil

UNICAMP

À minha filha JULIANA
DEDICO

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. ÁLVARO SANTOS COSTA, pela orientação e pelo apoio às minhas iniciativas profissionais.
- Ao colega JORGE VEGA, pelo excelente convívio e discussões sobre este trabalho.
- Ao Dr. AVELINO RODRIGUES DE OLIVEIRA, pelo incentivo de sempre e pelas sugestões e críticas apresentadas na revisão dos originais.
- Aos Professores da UNICAMP Dra. MARY ANNE HEIDE DOLDER, Dr. LADASLAV SO-DEK, Dr. IRINEU J.B. CAMARGO, Dr. EDSON ROSA. PIMENTEL, e ao Pesquisador Científico da Seção de Virologia do IAC Dr. GERD WALTER MÜLLER, pelas críticas e sugestões apresentadas na revisão dos originais.
- À LAUDENIR, pelas críticas e estímulo à minha vida profissional.
- Aos colegas Pesquisadores desta Seção de Virologia pela excelente convi-vência durante todos esses anos de trabalho.
- Aos funcionários da Seção de Virologia e em especial à MARIA DO CARMO SARU BI DA COSTA pelos trabalhos de datilografia, MARIA TEREZA DOS ANJOS PADOVANI e EDSON MOACIR ISQUIO pelos trabalhos, respectivamente, de inoculação mecânica e por mosca branca e à D. LAURA e D. CIDA pelo irresistível cafezinho.
- À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO pela concessão da Bolsa de Doutorado.
- À todos os amigos que direta ou indiretamente contribuíram para a exe-cução deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
1. RESUMO	01
2. ABSTRACT.....	03
3. INTRODUÇÃO	05
4. REVISÃO DA LITERATURA	06
4.1. Grupo do vírus latente do cravo ("carlavirus group")..	06
4.1.1. Patologia	06
4.1.2. Morfologia e propriedades físico-químicas.....	07
4.1.3. Ultraestrutura dos tecidos infectados	08
4.2. Generalidades sobre o vírus do mosaico angular do fei- joeiro	10
4.3. Generalidades sobre o vírus do mosqueado fraco do cau- pi (VMFC)	11
5. MATERIAL E MÉTODOS	13
5.1. Vírus/planta	13
5.2. Microscopia eletrônica.....	13
5.2.1. Determinação do comprimento normal por imersão fo- liar rápida.....	13
5.2.2. Observação das frações obtidas na purificação do vírus	14
5.2.3. Técnicas de fixação e inclusão de espécimes para cortes ultrafinos	14
5.3. Determinações quantitativas de açúcares totais e amido	16
5.4. Purificação do VMAF	18
5.5. Testes biológicos para o vírus purificado.....	21

	Página
5.6. Espectrofotometria	21
5.7. Extração de ácido nucleico e eletroforese	21
5.7.1. Fenol-SDS	21
5.7.2. Cloreto de lítio	22
5.7.3. SDS/Bentonite/aquecimento	22
5.8. Extração da proteína da capa viral e determinação do peso molecular	22
6. RESULTADOS.....	24
6.1. Comprimento normal das partículas do VMAF	24
6.2. O vírus na célula hospedeira	24
6.3. Alterações celulares induzidas pelo VMAF	26
6.4. Efeito do VMAF sobre o metabolismo do amido.....	30
6.5. Obtenção do vírus purificado	32
6.6. Atividade biológica do vírus purificado	35
6.7. Espectro de absorção do VMAF	35
6.8. Tentativas de extração do ácido nucleico viral	35
6.9. Peso molecular da proteína da capa viral	36
7. DISCUSSÃO	39
8. CONCLUSÕES	47
9. LITERATURA CITADA	48

1. RESUMO

As partículas do vírus do mosaico angular do feijoeiro (VMAF) são alongadas, ligeiramente flexíveis, com comprimento normal de 650 nm e 13 nm de diâmetro. Em células infectadas de feijoeiro Jalo e soja, o VMAF ocorre como feixes de partículas paralelas ou, de maneira característica, na forma de feixes de partículas onde estas apresentam-se presas em uma extremidade do feixe e soltas na outra. Aqui, elas se curvam tornando-se falcadas. O VMAF apresenta sua capa envoltória constituída de um só tipo de proteína de peso molecular 32600 D e uma concentração de ácido nucleico ao redor de 7%.

Baseado na similaridade da morfologia, comprimento normal da partícula, presença de feixes de partículas falcadas, peso molecular da proteína da capa, conteúdo de ácido nucleico, além de dados anteriormente conhecidos de patologia e serologia, é concluído que o VMAF é idêntico ao vírus do mosqueado fraco do caupi (VMAC), descrito em outras partes do mundo.

A presença dos feixes de partículas falcadas em tecidos infectados é indicada como de valor para diagnóstico do VMAF e VMFC.

Embora, como regra geral, o VMAF não tenha induzido modificações celulares significativas nem mostre associação frequente com organelas e núcleo celular, no cultivar Jalo do feijoeiro o vírus induz a presença de alta concentração de amido e açúcares solúveis nas regiões amarelas de folhas infectadas. Entretanto, como o nível de "desaparecimento" de amido e açúcares solúveis, após um período de escuro, é comparável entre as regiões amarelas de folhas infectadas e folhas controle, é proposto a existência de um mecanismo de canalização de carboidratos para as regiões amarelas semelhantemente ao que ocorre na formação de órgãos de reserva.

A metodologia utilizada no presente trabalho para purificação do VMAF produziu cerca de 4-5 mg de vírus por Kg de tecido e pode ser considerada boa, visto que a preparação final foi bastante pura. Quando inoculadas em feijoeiros sadios as preparações purificadas mostraram-se infectivas reproduzindo os sintomas característicos da doença estando, pois, de acordo com os Postulados de Koch, como aplicados à fitovirologia, quanto à patogenicidade do VMAF.

Tentativas de extração de ácido nucleico pelas técnicas do fenol-SDS, cloreto de lítio e SDS-bentonite-aquecimento, tiveram sempre resultados negativos, provavelmente devido à degradação do ácido nucleico durante o processo de extração, por traços de nucleases da hospedeira aderidas às partículas virais.

2. ABSTRACT

BEAN ANGULAR MOSAIC VIRUS: PURIFICATION, PROTEIN MOLECULAR WEIGHT, AND ULTRASTRUCTURE OF INFECTED TISSUES

The particles of bean angular mosaic virus (BAMV) are filamentous and slightly flexuous with 650 nm in normal length and 13 nm in diameter. In Jalo bean and soybean infected cells, the BAMV occurs in bundles of falcate particles or, more rarely, parallel particles. The BAMV contains a single protein (M. Wt. 32,600) and 7% of nucleic acid.

Particle morphology, its occurrence in falcate bundles, protein molecular weight, and nucleic acid content, besides pathological and serological characteristics indicate that bean angular mosaic virus and cowpea mild mottle virus (CpMMV), are the same virus. The presence of falcate bundles in infected tissues alone is considered of diagnostic value for BAMV and CpMMV infections.

No obvious cytopathological effects were detected in BAMV-infected cells nor any association of the virus with the cell organelles or nucleus. Nevertheless, in chloroplasts of yellow areas of Jalo bean infected leaf cells, the BAMV induces high concentration of starch and

soluble sugars. Since the reduction of these carbohydrates, after a dark period, is comparable in yellow areas of infected leaves and green areas of the non-infected control, it is proposed the existence of a carbohydrate transport mechanism to yellow areas, similarly to that present in the formation of storage cells and tissues.

About 4-5 mg of purified virus was obtained from 1 kg of leaf tissue and the purification method used (chloroform:carbon tetrachloride/PEG/cesium sulfate) can be considered good, since the final preparation was reasonably pure. When inoculated into healthy bean plants the purified preparations were infective, reproducing the disease and the virus was again purified from the inoculated plants. These results conform to Koch's Postulates as applied to virus diseases.

Attempts to obtain free, intact BAMV nucleic acid by the phenol-SDS, lithium chloride and SDS-bentonite-heating methods were negative. This is attributed to degradation of the nucleic acid after extraction due to traces of host nucleases associated with the virus particles.

3. INTRODUÇÃO

Em 1979, trabalhos desenvolvidos na Seção de Virologia do Instituto Agrônomo de Campinas levaram à descoberta de uma nova virose do feijoeiro (COSTA et al., 1980) a qual foi denominada mosaico angular do feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.) Jalo e o agente causal vírus do mosaico angular do feijoeiro (VMAF). Estudos da patologia, bem como dados preliminares sobre morfologia desse vírus, permitiram sua inclusão no grupo do vírus latente do cravo ("carlavirus group"). O vírus do mosaico angular do feijoeiro possui partícula alongada ligeiramente flexível, é transmitido mecanicamente e também pela mosca branca Bemisia tabaci Genn., tendo sido esta a primeira descrição de um "carlavirus" transmitido por esse vetor.

No presente trabalho são relatados estudos referentes à purificação e infectividade das partículas, determinação do peso molecular da proteína da capa e microscopia eletrônica do vírus na célula hospedeira como evidências adicionais para a caracterização do vírus do mosaico angular do feijoeiro.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. Grupo do vírus latente do cravo ("carlavirus group")

4.1.1. Patologia

A primeira descrição de uma doença causada por um "carlavirus" parece ser a de SCHULTZ & FOLSOM (1923) que descreveram uma anomalia em batata caracterizada por mosaico e enrolamento das folhas, posteriormente atribuída como tendo sido causada pelo vírus M da batata (BAGNALL et al., 1956). Hoje, são conhecidas algumas dezenas de vírus pertencentes a este grupo causando doenças em várias famílias de mono e dicotiledôneas, tais como, liliáceas, solanáceas, leguminosas, cucurbitáceas, compostas, etc. (WETTER & MILNE, 1981; KOENIG, 1982).

Em geral, os "carlavirus" causam sintomas muito fracos chegando mesmo a ser latentes em muitas hospedeiras e, com algumas exceções, não causam doenças de importância econômica (WETTER & MILNE, 1981).

Os "carlavirus" são transmitidos mecanicamente e, alguns, transmitidos de maneira não persistente por afídeos (HAGEDORN & HANSON, 1951; KASSANIS, 1955; HOLLINGS, 1957; BRUNT, 1977; ADAMS & BARBARA, 1980; VAN LENT et al., 1980; JOHNS, 1982; KOENIG et al., 1983). Mais

recentemente, foi demonstrado que tanto o vírus do mosaico angular do feijoeiro (COSTA et al., 1980) como o vírus do mosqueado fraco do caupi (IVAKI et al., 1982), são transmitidos mecanicamente e também pela mosca branca Bemisia tabaci.

Transmissão pela semente não é comum para vírus deste grupo e, quando positiva, ocorre em baixa porcentagem, exceção feita ao vírus do mosqueado fraco do caupi que foi transmitido por 2 a 90% das sementes de três hospedeiras testadas (BRUNT & KENTEN, 1973).

4.1.2. Morfologia e propriedades físico-químicas

Os vírus pertencentes ao grupo dos "carlavírus" são partículas ligeiramente flexíveis com comprimento normal variando de 610 a 700 nm e 12 a 15 nm de diâmetro (WETTER & MILNE, 1981; KOENIG, 1982). A ultraestrutura desses vírus é caracterizada por fileiras de subunidades separadas por ranhuras longitudinais sendo que bandeamento transversal e canal axial são raramente visualizados (VARMA et al., 1968; BOCCARDO & MILNE, 1976; WETTER & MILNE, 1981).

As partículas são constituídas de RNA infectivo de fita simples ("single strand") correspondendo a 5 a 7% do peso do vírus e de um único tipo de proteína de peso molecular variando de 31000 a 37000 D (PAUL & WETTER, 1964; VARMA et al., 1970; BRUNT & KENTEN, 1973; PAUL, 1974; BOCCARDO & MILNE, 1976; GIBBS & HARRISON, 1976; BRUNT, 1977; VEERISETTY & BRAKKE, 1977b; KUSCHKI et al., 1978; ADAMS & BARBARA, 1980; DUBERN & DOLLET, 1981; JOHNS, 1982).

A peso molecular da partícula de $50-60 \times 10^6$ D, estimado a partir de dados para o peso molecular e conteúdo de ácido nucleico e proteína, indica que cada partícula contém cerca de 1600 a 1800 subunidades

proteicas (VARMA et al., 1968; VEERISSETTY & BRAKKE, 1977a,b; VEERISSETTY & BRAKKE, 1978).

O ponto de inativação termal dos "carlavirus" varia de 55 a 70°C (WETTER & MILNE, 1981) e o ponto final de diluição entre 10^{-3} a 10^{-4} (KOENIG, 1982) mas, ocasionalmente, até 10^{-6} (QUANTZ & BRANDES, 1957; QUANTZ, 1958, citados em WETTER & MILNE, 1981). A longevidade em extratos de folhas é de poucos dias (KOENIG, 1982) exceção feita ao "Helenium virus S" onde a longevidade "in vitro" é de 2-3 semanas (KOENIG et al., 1983).

4.1.3. Ultraestrutura dos tecidos infectados

Todos os vírus pertencentes ao grupo do latente do cravo e que têm sido estudados citologicamente a nível de microscopia eletrônica, apresentam distribuição restrita ao citoplasma de células epidérmicas e do mesófilo (CHRISTIE & EDWARDSON, 1977; EDWARDSON & CHRISTIE, 1978) sendo, mais raramente, encontrados também em elementos crivados do floema (TU & HIRUKI, 1970; THONGMEEARKON et al., 1984).

As partículas aparecem soltas ou, mais frequentemente, formando agregados com arranjo mais ou menos paralelo das mesmas (TU & HIRUKI, 1970; BOS & RUBIO-HUERTOS, 1972; HIRUKI & SHUKLA, 1973; RUBIO-HUERTOS & BOS, 1973; ATKINSON & COOPER, 1976; BOCCARDO & MILNE, 1976; BRUNT et al., 1976; VAN LENT et al., 1980; HEARON, 1982; KOENIG et al., 1983). Tais agregados aparecem, às vezes, como "corpos bandeados", cuja largura de cada banda corresponde ao comprimento de uma partícula (KITAJIMA et al., 1970; BOS & RUBIO-HUERTOS, 1971; CHRISTIE & EDWARDSON, 1977; BOS & RUBIO-HUERTOS, 1971; CHRISTIE & EDWARDSON, 1977; HEARON, 1982).

Os feixes de partículas aparecem, às vezes, associados ao tonoplasto, à parede celular ou ao envelope dos cloroplastos (KITAJIMA et al., 1970; De BOKX & WATERREUS, 1971; BOS & RUBIO-HUERTOS, 1971, 1972; HIRUKI & SHUKLA, 1973; RUBIO-HUERTOS & BOS, 1973; BRUNT et al., 1976; KUSCHKI et al., 1976; HEARON, 1982).

Inclusões paracrystalinas constituídas por partículas de vírus, ocorrendo isolados ou em grupos, foram detectadas em células infectadas pelo vírus M da batata, vírus S da batata e "pea streak virus" (CHRISTIE & EDWARDSON, 1977).

Inclusões cristalinas foram encontradas em citoplasma de células infectadas por diferentes isolados do "red clover vein mosaic virus" (RUBIO-HUERTOS & BOS, 1973). Estas inclusões, consistindo de agregados de partículas esféricas de 11-12 nm de diâmetro, contêm proteína e RNA (KHAN et al., 1973).

Acúmulo de retículo endoplasmático com partículas virais espalhadas entre membranas tem sido descrito para vários vírus pertencentes ao grupo do latente do cravo (KITAJIMA et al., 1970; BOS & RUBIO-HUERTOS, 1971; HIRUKI & TU, 1972; HIRUKI & SHUKLA, 1973; ATKINSON & COOPER, 1976; BOCCARDO & MILNE, 1976; CHRISTIE & EDWARDSON, 1977; HEARON, 1982, KOENIG et al., 1983).

Tem sido proposto que determinadas inclusões citoplasmáticas (agregados de partículas, material induzido pelo vírus, componentes celulares [ou misturas de todos esses componentes]) podem ser a principal característica de um determinado grupo de vírus tendo, às vezes, valor para diagnóstico (EDWARDSON & CHRISTIE, 1978). No caso dos "carlavirus" esses autores sugerem que os agregados de partículas virais na forma de

corpos bandeados, ocorrendo principalmente em células epidérmicas e de mesófilo, seriam a principal característica dos vírus deste grupo. WETTER & MILNE (1981) apontam que tais inclusões não seriam suficientemente específicas a ponto de terem valor para diagnóstico e que a melhor indicação, a nível citológico, de infecção causada por um "carlavirus" seria a presença de partículas que não são muito flexíveis, a ausência de "cattaventos" ("pinwheels", principal característica do grupo do vírus Y da batata) ou de corpos bandeados com largura bem inferior àquela dos "carlavirus" (característica do grupo do vírus X da batata).

4.2. Generalidade sobre o vírus do mosaico angular do feijoeiro

O VMAF foi descoberto em 1979 infectando feijoeiros (Phaseolus vulgaris L.) em São Paulo e no Paraná tendo sido caracterizado como integrante do grupo do vírus latente do cravo ("carnation latent virus group" - CARLAVIRUS (COSTA et al., 1980). O vírus possui partícula alongada ligeiramente flexível com comprimento normal de 650 nm e 13 nm de diâmetro (COSTA et al., 1980). É um vírus principalmente de leguminosas, mas infecta também algumas plantas de outras famílias induzindo, em geral, sintomas fracos de mosqueado ou mesmo de infecção latente e somente no feijoeiro Jalo é que o vírus induz sintomas de mosaico bastante conspícuos adquirindo em folhas mais velhas, a conformação de manchas angulares limitadas pelas nervuras (COSTA et al., 1980).

O VMAF é transmitido experimentalmente por inoculação mecânica e também pela mosca branca Bemisia tabaci (COSTA et al., 1980). A relação do vírus para com a mosca branca vetora é não circulativa, sendo

perdido durante 4 horas de alimentação em plantas sadias (COSTA et al., 1983).

Secções ultrafinas de tecidos foliares de feijoeiros infectados pelo VMAF mostram a ocorrência, em citoplasma de células de epiderme a parênquima, de feixes de partículas paralelas, partículas isoladas distribuídas ao acaso e feixes de partículas onde estas apresentam-se presas em uma extremidade do feixe e soltas na outra. Nesta extremidade a maior parte das partículas do feixe se curvam tornando-se falcadas (GASPAR et al., 1980).

Testes serológicos realizados por GASPAR et al. (1985) utilizando a técnica "microscopia eletrônica imuno-específica", demonstraram que o vírus do mosaico angular do feijoeiro é serologicamente relacionado, se não idêntico ao vírus do mosqueado fraco do caupi ("cowpea mild mottle virus") observado na África (BRUNT & KENTEN, 1973) que mais recentemente foi também demonstrado ser transmitido pela mosca branca Bemisia tabaci (IWAKI et al., 1982).

4.3. Generalidades sobre o vírus do mosqueado fraco do caupi (VMFC)

O vírus do mosqueado fraco foi encontrado, pela primeira vez, infectando caupi em Ghana na África (BRUNT & KENTEN, 1973). Posteriormente, foi esse vírus encontrado na Tailândia infectando soja (IWAKI et al. 1982) e na Índia infectando amendoim (IIZUKA et al., 1984).

Os sintomas induzidos pelo VMFC são em geral fracos mas bastante severos em algumas variedades de soja e amendoim (BRUNT & KENTEN, 1973; IWAKI et al., 1982). O VMFC é transmitido por inoculação mecânica

e pela mosca branca B. tabaci (IWAKI et al., 1982; IIZUKA et al., 1984).

BRUNT & KENTEN (1973) foram os primeiros a purificar e ca racterizar o vírus, ficando demonstrado que o mesmo possui partículas rí- gidas a ligeiramente flexíveis com comprimento normal (CN) de 650 nm e 13 nm de diâmetro, cerca de 5% de ácido nucleico e um único tipo de pro- teína com peso molecular de 32500 D. Verificaram esses autores que o VMFC é distantemente relacionado com o vírus latente do cravo mas sem nenhuma relação serológica com outros dez vírus do mesmo grupo. Mais re centemente, IWAKI et al., (1982) demonstraram que o ácido nucleico do VMFC é do tipo RNA e de fita simples.

Tecidos foliares de soja e Nicotiana clevelandii Gray in- fectadas pelo VMFC mostram agregados de partículas virais formando estru- turas semelhantes a "penas" de aves além de agregados de partículas para- lelas (BRUNT et al., 1983; THONGMEEARKOM et al., 1984). Tais estruturas semelhantes a "penas" são idênticos àquelas descritas para o vírus do mo saico angular do feijoeiro com o nome de feixes de partículas falcadas (GASPAR et al., 1980).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Vírus/planta

O vírus do mosaico angular do feijoeiro, existente na coleção da Seção de Virologia do Instituto Agrônomo de Campinas, SP, local onde foi efetuado o presente trabalho, foi inoculado mecanicamente ou através da mosca branca Bemisia tabaci em plantas de feijoeiro e soja e mantidas em casa de vegetação. O controle foi feito com plantas comparáveis não inoculadas com o vírus. A variedade de feijoeiro rotineiramente usado neste trabalho foi o Jalo. Para microscopia eletrônica, no entanto, utilizou-se também feijoeiros dos cultivares Moruna e Goiano Precoce e soja das variedades Santa Rosa, IAC 3 e IAC 5.

5.2. Microscopia eletrônica

5.2.1. Determinação do comprimento normal por imersão foliar rápida

A determinação do comprimento normal (CN) (WETTER & BRANDES, 1956) e diâmetro das partículas do VMAF foram feitas pela técnica de

"leaf dip" ("imersão foliar rápida") associada a contraste negativo (KITAJI MA, 1965).

Para isto, pequenos fragmentos de folhas de plantas infectadas, retiradas com pinça, foram mergulhados em gota de ácido fosfotúngstico 1% sobre telinha de microscopia eletrônica previamente coberta com película de Parlódium reforçada com carbono. Após cerca de 1 min. os fragmentos foram retirados com pinça, o excesso de líquido removido com papel de filtro e, a seguir, as telinhas foram examinadas ao microscópio eletrônico.

As medições das partículas forma feitas utilizando-se uma lupa graduada (Edmund Scientific Co. Japan) diretamente nos negativos a uma magnificação de 14000 X. Como calibrador interno foram utilizadas partículas do vírus do mosaico do fumo (TMV) com CN de 300 nm. A determinação do CN das partículas do VMAF foi feita através do cálculo da média aritmética das classes de partículas dos três maiores picos observados no histograma.

5.2.2. Observação das frações obtidas na purificação do vírus

A observação de alíquotas dos sobrenadantes e "pellets" obtidos nas diferentes fases de purificação do VMAF a partir de feijoeiros Jalo infectados (Esquema 2, página 20) foram feitas em um microscópio eletrônico Zeiss EM-10, após contrastação negativa com solução aquosa de acetato de uranila a 2%.

5.2.3. Técnicas de fixação e inclusão de espécimes para cortes ultrafinos

Tecidos foliares de plantas infectadas pelo VMAF e de plantas sadias foram fixados por 2-3 h a 4°C em glutaraldeído 3% tamponado com cacodilato de sódio 0,1 pH 7,0.

Após a fixação, o material foi lavado durante 2h (3 x 40 min.) em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,0 e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão, a 4°C, durante aproximadamente 14 h. Lava-gens com água destilada (3 x 20 min. e 2 x 30 min.) precederam a contra-
tação dos espécimes com acetato de uranila 2% em tampão maleato de sódio 0,05 M pH 6,0 durante 2-5 h; (KARNOVISKY, 1967).

Posteriormente, o material foi lavado em água destilada (3 x 10 min. e 2 x 30 min.) e desidratado em gradiente de acetona como segue: 30% - 10 min., 50% - 10 min., 70% - 15 min. 100% - 2 x 20 min. e 1 x 60 min.

A inclusão do material foi feita com resina epoxy (MOLLENHAUER, 1964) seguindo-se a composição: Epon-812 25,0%, araldite-6005 15,0% acrescidos de anidrato dodecenilsuccínio (DDSA) 55,0%, dibutil ftalato (DBP) 0,5%, benzildimetilamina (BDMA) 4,5%.

Como solvente para essa mistura utilizou-se acetona nas seguintes proporções (resina:acetona): 1:3 - 15 min., 1:1 60 min., 3:1 12h. O material foi então colocado em resina pura e deixado durante 24 h a 37°C e, posteriormente, colocado a 60°C durante 48 h.

Cortes ultrafinos (~80nm) para microscopia eletrônica foram feitos com navalhas de vidro ou diamante em um ultramicrotomo Porter-Blum MT-1 e montadas em telinhas de cobre, previamente revestidas com uma película de Parlódium e reforçadas com uma leve deposição de carbono. Posteriormente, os cortes foram contrastados com citrato de chumbo (VENABLE &

COGGESHALL, 1965) e examinados em um microscópio eletrônico Siemens Elmiskop I ou Zeiss EM-10 ambos operando a 80 KV.

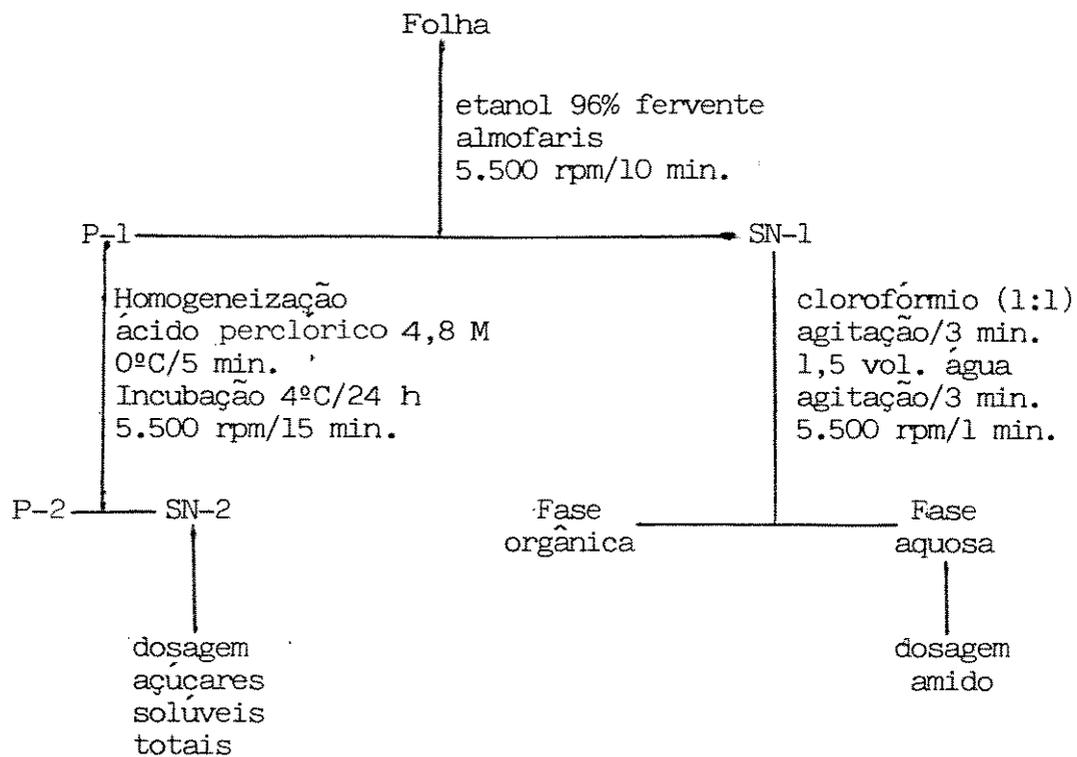
5.3. Determinações quantitativas de açúcares totais e amido

Nestes experimentos utilizaram-se plantas de feijoeiro Ja-lo infectadas pelo VMAF mostrando mosaico angular bastante conspícuo. Amostras de regiões amarela e verde foram retiradas dos folíolos de um tri fólio., fazendo-se o controle com planta sadia de mesma idade. Em seguida, essas plantas foram colocadas no escuro onde permaneceram por 72 h após o que, nova coleta de amostras foi realizada nos folíolos do mesmo trifólio usado anteriormente.

A extração de açúcares e amido dessas amostras (Esquema 1) foi feita através da homogeneização de 0,1 g de folha (peso fresco) com 5,0 ml de etanol 96% fervente. Após centrifugação a 5500 rpm por 10 min. o sobrenadante foi preparado para dosagem de açúcares totais solúveis e o resíduo para dosagem de amido. Foi retirado 1,0 ml do sobrenadante e colocado em tubo graduado de centrífuga ao qual acrescentou-se 1,0 ml de cloro fórmio agitando-se o tubo por 3 min. Foram acrescentados 3,0 ml de água e a mistura foi novamente agitada e posteriormente centrifugada a 5500 rpm por 1 min. O volume da fase aquosa do topo foi anotado e utilizado para determinação de açúcares solúveis totais pelo método colorimétrico com fenol-ácido sulfúrico (HODGE & HOFREITER, 1962). Para referência, foi feita uma curva padrão com glicose nas concentrações de 10 a 70 $\mu\text{g/ml}$ e a leitura espectrofotométrica realizada no comprimento de onda de 490 nm.

Ao resíduo da primeira centrifugação foi adicionado ácido perclórico 4,8 M e homogeneizado a 0°C por 5 min. A mistura foi então

Esquema 1. Extração de amido e açúcares solúveis totais



deixada a 4°C por 24 h e após centrifugação a 5500 rpm por 15 min. o sobrenadante foi utilizado para a determinação de amido pelo método colorimétrico com antrona (HODGE & HOFREITER, 1962). Utilizou-se, aqui, uma curva padrão com amido solúvel nas concentrações de 20 a 60 µg/ml e a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 620 nm.

5.4. Purificação do VMAF

O vírus do mosaico angular foi purificado sempre a partir de folhas de feijoeiro Jalo coletado cerca de 30 dias após a inoculação mecânica do vírus e mantidas congeladas a -20°C até sua utilização.

As ultracentrífugas Beckman Spinco modelo L e Beckman modelo L2-65B foram utilizadas para baixas e altas centrifugações, respectivamente.

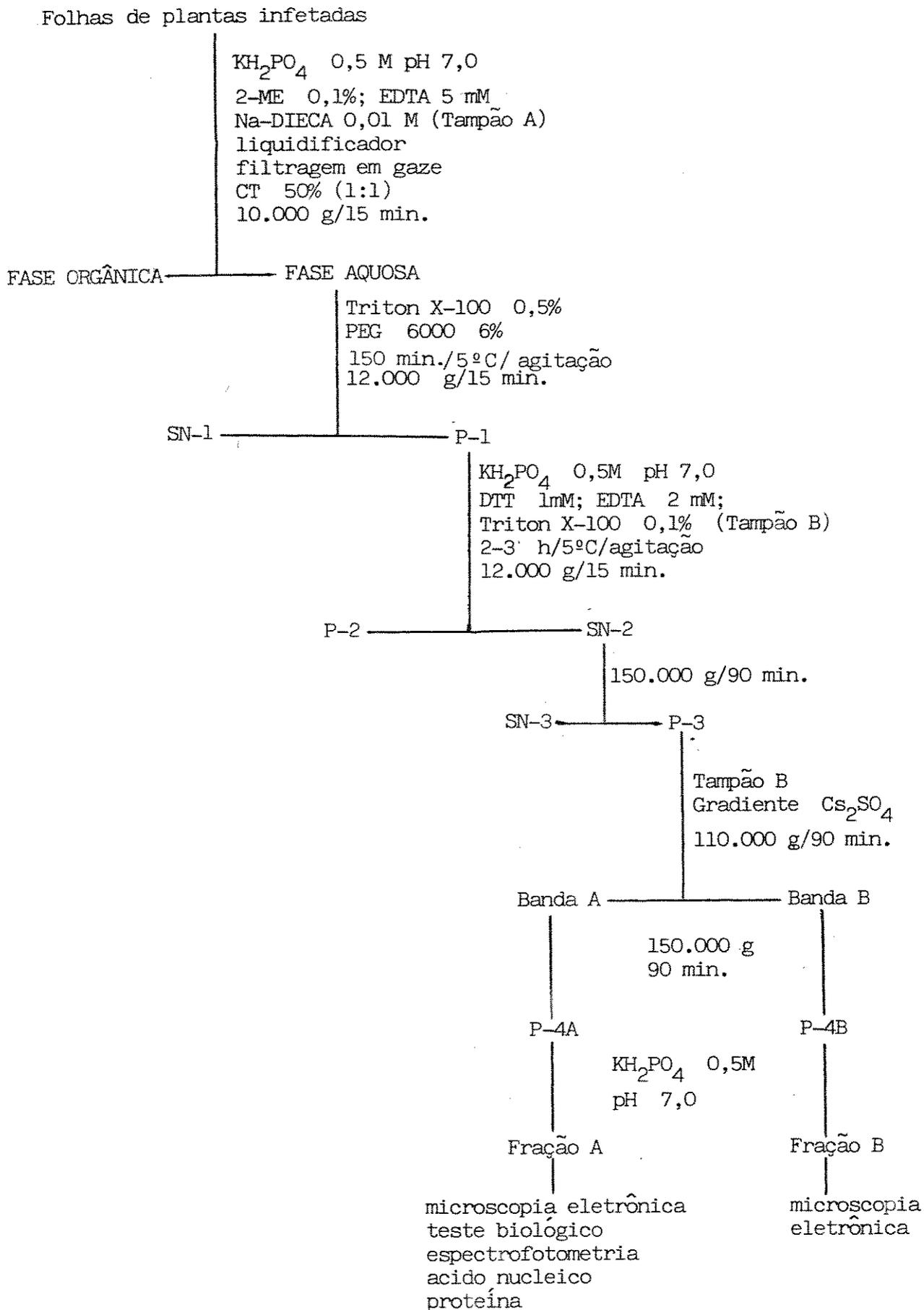
Antes da adoção do método definitivo para purificação do vírus foram feitas algumas explorações preliminares quanto a tampões, métodos de clarificação, concentração e gradiente. Assim, na extração, foram usados dois tampões: fosfato de potássio monobásico 0,5 M pH 7,0 (LUISONI *et al.*, 1976) e solução de fosfato de sódio dibásico 0,165 M e citrato de sódio 0,018 M pH 9,0 (VEERISSETTY & BRAKKE, 1978). Para clarificação do suco utilizou-se butanol, clorofórmio/tetracloro de carbono, fosfato de cálcio formado "in situ" (VEERISSETTY & BRAKKE, 1978) e Triton X-100. A concentração do vírus foi feita por ultra-centrifugação ou por precipitação com polietilenoglicol peso molecular 6000.

Os gradientes testados foram de sacarose, cloreto de céσιο e sulfato de céσιο. Para ressuspensão do vírus após gradiente e ultracentrifugação final foram utilizados tampão fosfato pH 7,0 em duas concentrações: 0,01 M e 0,5 M.

Após essa triagem adotou-se o seguinte método para purificação do vírus do mosaico angular (Esquema 2).

Cerca de 100 g de folhas congeladas foram trituradas em liquidificador com 2 volumes de tampão fosfato de potássio (KH_2PO_4) 0,5 M pH 7,0 (ajustado com NaOH 5 N) contendo 2-mercaptoetanol (2-ME) 0,1%, etilenodiaminotetracetato de sódio (EDTA) 5 mM, dietilditiocarbamato de sódio (Na-DIECA) 0,01M. Algumas vezes as folhas congeladas foram maceradas com N_2 líquido antes de serem homogeneizadas em liquidificador. Após filtração em gaze, o suco foi misturado com meio volume de clorofórmio/tetracloreto de carbono (1:1 v/v) e fortemente agitado por 15 min. A emulsão foi então centrifugada a 10.000 g por 15 min. e a fase aquosa recuperada e misturada com Triton X-100 à concentração final de 0,5%. Após dissolução deste detergente adicionou-se polietilenoglicol (PEG 6000) numa concentração final de 6% e deixou-se a 5°C por 150 min. com agitação. Após centrifugação a 12.000 g por 15 min. o sobrenadante (SN-1) foi descartado e o "pellet" (P-1) ressuspendido (1/10 volume original) em tampão KH_2PO_4 0,5 M pH 7,0 contendo ditioneitol (DTT) 1 mM, EDTA 2 mM, Triton X-100 0,1% (tampão B) e mantido a 5°C por pelo menos 120 min. com agitação. A seguir o material foi centrifugado a 12.000 g por 15 min. e então o sobrenadante (SN-2) centrifugado a 150.000 g por 90 min. O "pellet" (P-3) foi ressuspendido em tampão B e centrifugado em gradiente linear de sulfato de cézio (10-40%) em tampão KH_2PO_4 0,05 M pH 7,0 a 110.000 g por 90 min. em rotor Beckman SW65. As bandas (A e B) foram coletadas com seringa e, após diluição, concentradas por ultracentrifugação a 150.000 g por 90 min. e os "pellets" (P-4A e P-4B) obtidos ressuspendidos em tampão KH_2PO_4 0,5 M pH 7,0 (Fração A e B). Estas frações (A e B) foram visualizadas ao microscópio eletrônico e a fração A também utilizada para teste

Esquema 1. Purificação do VMAF com solventes orgânicos e polietilenoglicol



biológico, espectrofotometria e estudo de ácido nucleico e proteína.

5.5. Teste biológico para o vírus purificado

Uma alíquota da fração A foi diluída com água, suficiente para ficar a 0,1 M e inoculada mecanicamente em plantas-teste de feijoeiro. A infectividade foi determinada pela sintomatologia e através de microscopia eletrônica (imersão foliar rápida).

5.6. Espectrofotometria

O espectro de absorção do VMAF purificado (fração A) foi determinado em um espectrofotômetro de luz ultravioleta Variam 634. A concentração do vírus foi aferida utilizando-se a absorção a 260 nm e assumindo um coeficiente de extinção de 2,1 determinado para a vírus latente do cravo, membro típico do grupo (PAUL & WETTER, 1964). O conteúdo de ácido nucleico das partículas virais foi avaliada utilizando-se a relação $A_{280/260}$, conforme procedimento descrito por LAYNE (1957).

5.7. Extração de ácido nucleico e eletroforese

5.7.1. Fenol-SDS

Ao vírus purificado (Fração A) foram adicionados sódio dodecil sulfato (SDS) a 0,5%, EDTA a 1 mM, bentonite fracionada (FRAENKEL-CONRAT et al., 1961) a 1% e igual volume de fenol (redesilado) saturado com água contendo 0,1% de hidroxiquinolina. A mistura foi agitada por 15 min. à temperatura ambiente e então centrifugada a 5.000 g por 10 min. A fase aquosa foi coletada e re-extraída mais duas vezes com fenol-hidroxiquinolina. À última fase aquosa obtida foram acrescentados 2,5 volumes de

etanol contendo acetato de sódio 0,2 M e estocado a -20°C por 18-20 h. Após centrifugação a 5000 g por 10 min. o "pellet" obtido foi ressuspendido em água bidestilada e estocado a -20°C para posterior estudo de espectrofotometria e eletroforese.

5.7.2. Cloreto de lítio (FRANCKI & McLEAN, 1968)

A uma alíquota do vírus purificado (Fração A) foi acrescentada do igual volume de cloreto de lítio 4 M e mantido a -20°C por 18-20 h. Ao descongelar, a mistura foi centrifugada a 5000 g por 10 min. e o "pellet" tratado mais duas vezes com cloreto de lítio 2 M. O último "pellet" obtido foi ressuspendido em água bidestilada e estocado a -20°C até uso posterior:

5.7.3. SDS/bentonite/aquecimento

A 50 μl de vírus purificado foram adicionados SDS a concentração final de 1% e bentonite fracionada a 1 mg/ml e a mistura aquecida a 55°C por 10 min. Imediatamente após o resfriamento, a amostra foi utilizada para eletroforese.

As eletroforeses foram feitas em gel de agarose a 1,5% (mini-gel submerso) em tampão TRIS-HCl 0,04 M pH 7,5, acetato de sódio 0,02 M e Na-EDTA 2 mM (LOENING, 1967) à corrente constante de 50 V por 4-5 h. Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), descorados com água destilada e observados com luz ultravioleta transmitida.

5.8. Extração da proteína da capa viral e determinação do peso molecular

A uma fração do VMAF (Fração A) purificado (c.60 μ g) foram adicionados 2 volumes de acetona, agitado e mantido a 4°C por 18 h. Após centrifugação a 5.000 g por 10 min. e secagem a vácuo, o precipitado foi ressuspenso em 60 μ l de tampão TRIS-glicina contendo SDS 0,2%, sacarose 10%, 2-ME 2% e azul de bromofenol 0,001M (tampão de dissolução) e, então, aquecido a 100°C por 3 min. Aliquotas de 25 μ l foram então aplicadas em gel de poliacrilamida a 12% (LAEMMLI, 1970) e a eletroforese foi desenvolvida a 30 mA até o marcador (azul de bromofenol) atingir a base do gel (cerca de 4-5 h). O gel foi corado com azul de Comassie 0,1% e descorado em solução aquosa de metanol (30%) e ácido acético (7%).

Paralelamente à proteína viral, foram aplicados no gel 25 μ l de uma solução (1mg/ml) de marcadores padrão de peso molecular dissolvidos no tampão de dissolução descrito acima. Os marcadores de peso molecular utilizados, expressos em Daltons, foram: albumina bovina (66.000), ovo albumina (45.000), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (36.000), anidrase carbônica (29.000), tripsinogênio (24.000), inibidor de tripsina (20.100), e lactoalbumina (14.200).

Um gráfico das distâncias de migração (Rfs) dos marcadores no gel versus o logaritmo dos respectivos pesos moleculares foi feito e o peso molecular da proteína do VMAF determinado a partir desse gráfico.

6. RESULTADOS

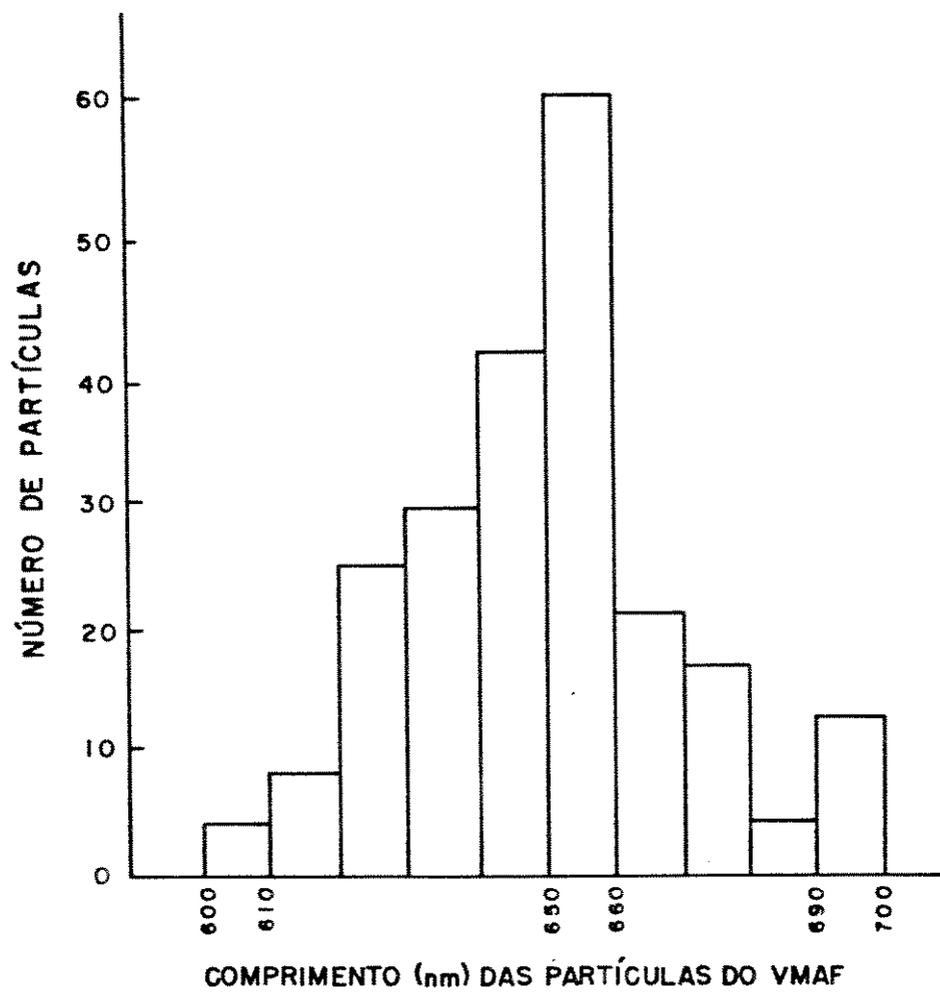
6.1. Comprimento normal das partículas do VMAF

Observações preliminares mostraram não haver diferença entre o comprimento normal das partículas obtidas a partir de variedades de feijoeiro ou de soja. Assim, nos resultados descritos abaixo são computados as medições feitas em 235 partículas obtidas pela técnica de imersão foliar rápida a partir de plantas de feijão e soja infectadas pelo VMAF. Em todas as plantas examinadas notou-se a consistente presença de partículas alongadas ligeiramente flexíveis com comprimento normal de 650 nm e diâmetro de 13 nm (Figura 1). Em nenhum caso foram encontradas partículas similares em preparações feitas a partir de plantas-controle não inoculadas.

Em nenhuma preparação foi possível visualizar-se canal axial nas partículas do VMAF mesmo usando diferentes contrastantes (ácido fosfotúngstico, molibdato de amônio, acetato, oxalato ou formato de uranila).

6.2. O vírus na célula hospedeira

Figura 1. Histograma da distribuição das mensurações feitas do comprimento de 235 partículas do VMAF.



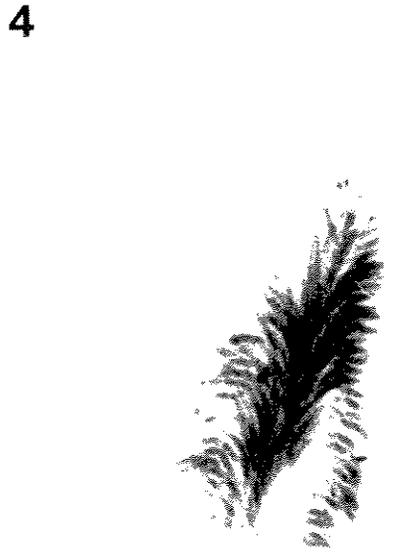
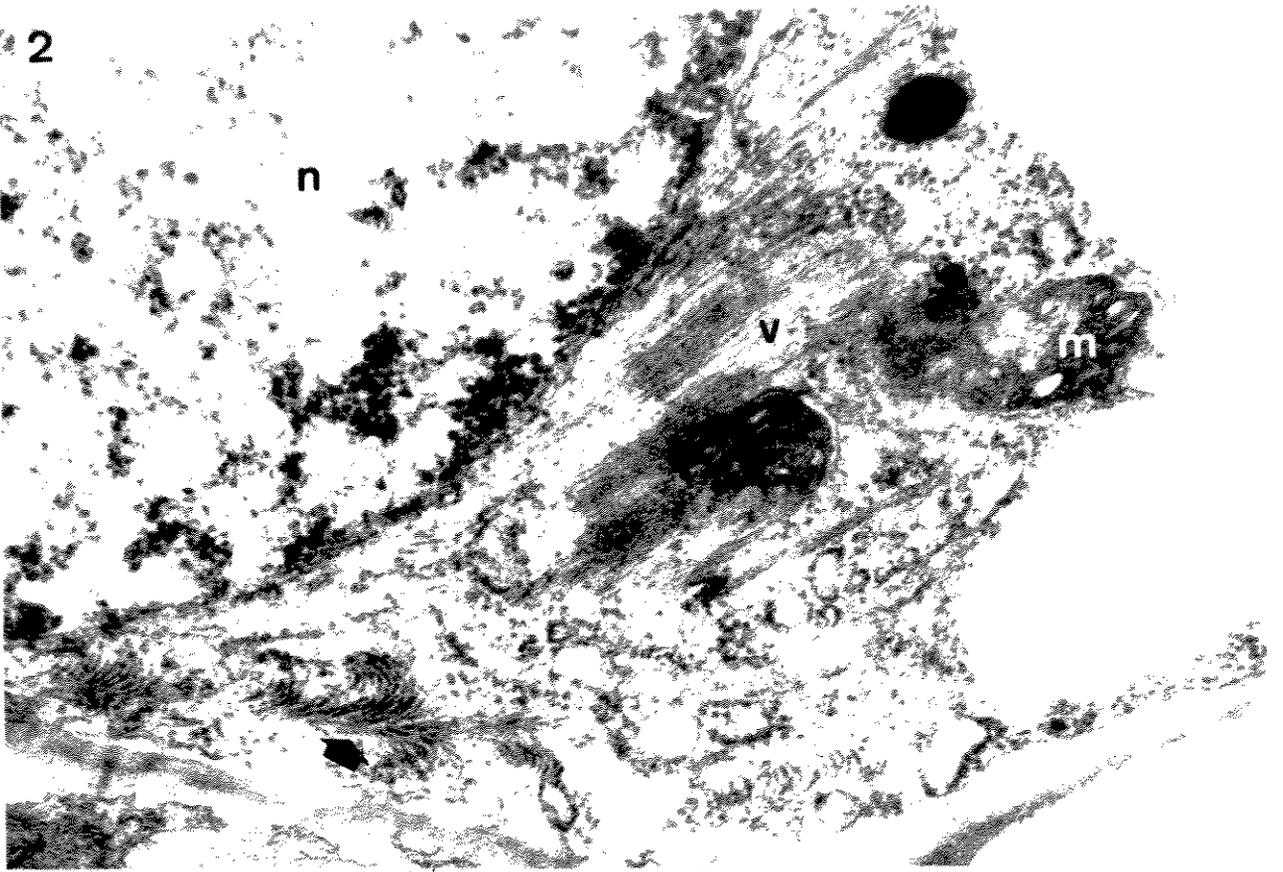
As observações de secções ultrafinas ao microscópio eletrônico de feijão e soja, mostraram a ocorrência, em citoplasma de células de epiderme e parênquima, de feixes de partículas paralelas (Figura 2) cada uma com diâmetro de 10-13 nm. Embora de difícil determinação, em alguns casos o comprimento do feixe era próximo daquele das partículas individuais (650 nm).

Mais frequente e caracteristicamente, no entanto, o VMAF aparece como feixes de partículas onde estas apresentavam-se presas em uma extremidade de feixe e soltas na outra. Nesta extremidade a maior parte das partículas do feixe se curvam tornando-se falcadas (Figura 2). Este tipo de feixe foi encontrado em citoplasma de células de vários tecidos inclusive em elementos crivados do floema (Figuras 3 e 4).

6.3. Alterações celulares induzidas pelo VMAF

De maneira geral, nos cultivares de feijoeiro e soja, observados, o vírus do mosaico angular não induziu modificações celulares significativas quando comparado com células de plantas-controle não infectadas. Também não foi verificada nenhuma frequente associação do vírus com organelas citoplasmáticas nem com o núcleo celular. Entretanto, no caso do feijoeiro Jalo, embora não frequentemente, foram observadas em células do parênquima áreas contendo massas de retículo endoplasmático (Figura 5). Nestas células ou em células vizinhas sempre foram encontradas partículas virais livres e/ou em feixes (Figura 6). Além disso, observou-se que os cloroplastos de células de feijoeiro Jalo infectado pelo VMAF, apresentam alto teor de amido ficando o sistema lamelar, em geral, localizado na periferia dessa organela (Figura 8). Na região amarela das folhas

Figuras 2 a 4. Micrografias eletrônicas mostrando regiões de células do tecido foliar do feijoeiro Jalo infectado pelo VMAF. Figura 2. Feixes paralelos de partículas virais (v) e feixes falcados () em citoplasma de uma célula parenquimática. n, núcleo; m, mitocôndria 48.100X Figura 3. Elemento crivado maduro do floema apresentado um feixe falcado de partículas do VMAF (). cc, célula companheira. 30.000X Figura 4. Detalhe do feixe de partículas evidenciando na figura anterior. 98.000X.



Figuras 5 e 6. Micrografias eletrônicas mostrando regiões de células do tecido foliar de feijoeiro Jalo infectado pelo VMAF. Figura 5. Feixe de partículas paralelas (v) e partículas virais livres no citoplasma (→). Notar acúmulo de retículo endoplasmático (▣). cl, cloroplasto. 46.200X. Figura 6. Massa de retículo endoplasmático (▣) em citoplasma aparentemente sem vírus. No entanto, a célula ao lado apresenta partículas virais (v). pc, parede celular; vc, vacúolo. 46.200X.

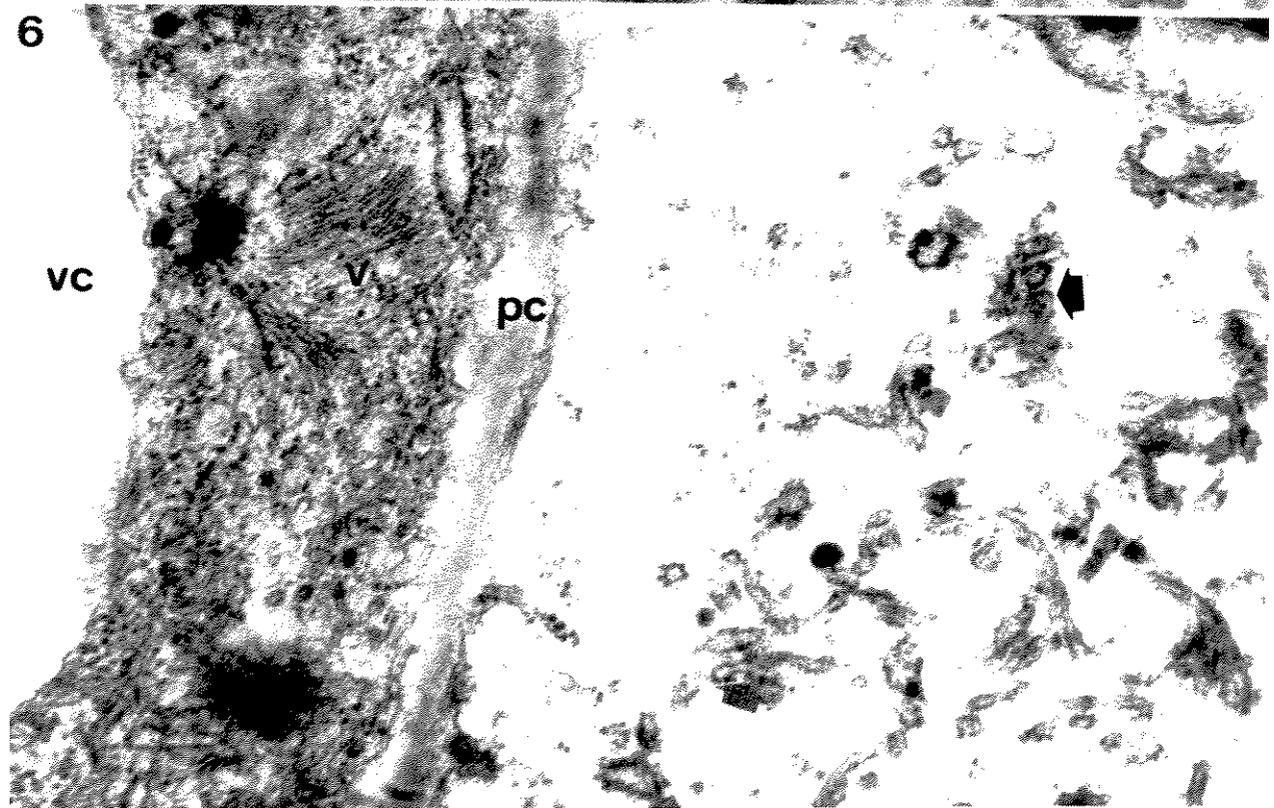
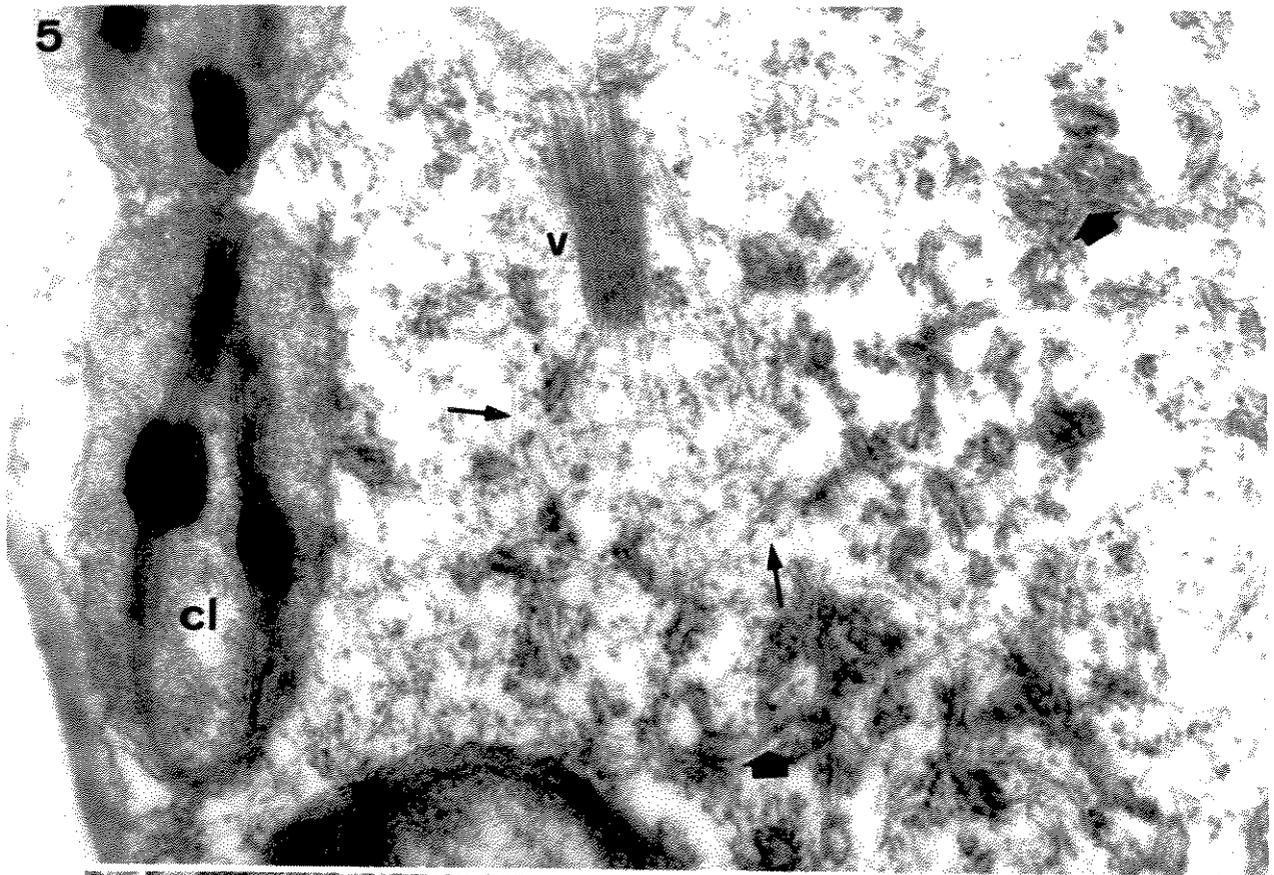
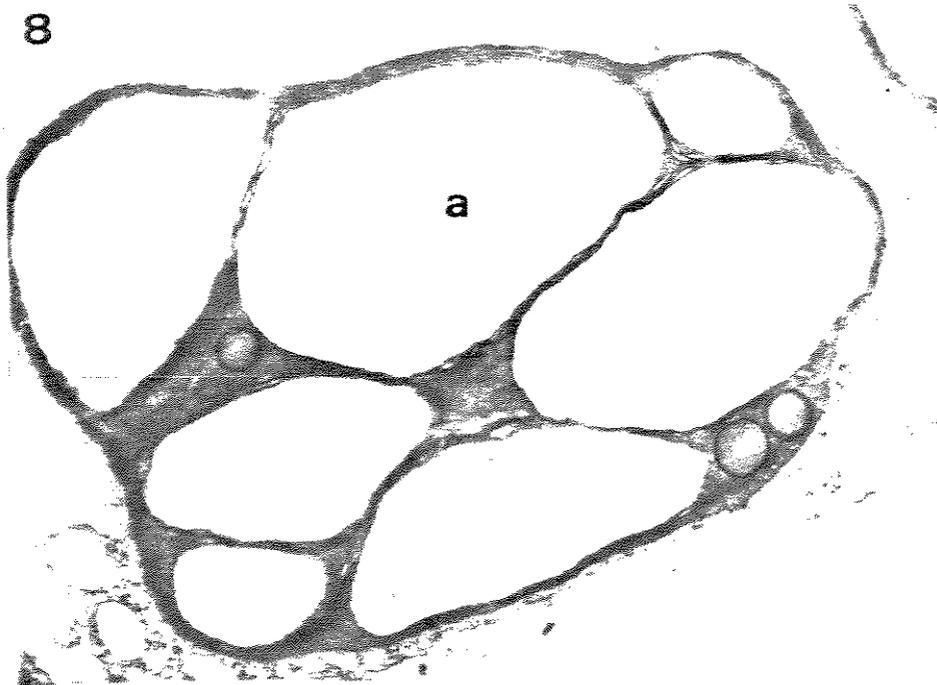


Figura 7. Folha trifoliolada de feijoeiro Jalo infectado pelo VMAF. Notar lesões angulares amarelas. Figura 8. Região de citoplasma de célula do parênquima da região amarela de folha infectada mostrando cloroplasto com alto teor de amido (a). 16.500X.



8



com mosaico (Figura 7) observações preliminares de seções ultrafinas ao microscópio eletrônico, mostraram que os cloroplastos continuavam com alto teor de amido mesmo após as plantas terem ficado 72 h no escuro. Os cloroplastos da região verde da mesma folha tinham seu amido degradado similarmente aos de folhas de plantas-controle não infectadas.

6.4. Efeito do VMAF sobre o metabolismo do amido

Como pode ser observado dos resultados das dosagens de amido (Tabela 1) há uma alta concentração desse polissacarídeo nas regiões amarelas de folhas infectadas: 47,6 mg/g.p.fr. contra 5,9 mg/g.p.fr. para regiões verdes da mesma folha e 9,3 mg/g.p.fr. para folha de planta sadia. Nas amostras das plantas que ficaram 72 h no escuro esses valores passaram para 41,0 mg/g.p.fr. para regiões amarelas, 0,9 mg/g.p.fr. para regiões verdes da mesma folha e 0,6 mg/g.p.fr. para folha de planta sadia. Os resultados indicam que houve no período de 72 h de escuro uma degradação de amido de 14% para regiões amarelas, 86% para regiões verdes da mesma folha e 93% para folha controle.

A Tabela 1 mostra também os resultados obtidos nas dosagens de carboidratos solúveis. Como pode ser observado, há também um alto teor de açúcares solúveis totais nas regiões amarelas de folhas infectadas pelo VMAF (36,2 mg/p.fr. contra 5,4 mg/g.p.fr. para regiões verdes da mesma folha e 5,3 mg/g.p.fr. para folha de planta sadia usada como controle). Nos testes feitos com as plantas submetidas a um período de escuro de 72 h esses valores caem para 31,5 mg/g.p.fr. para regiões amarelas, 3,0 mg/g.p.fr. para regiões verdes da mesma folha e 2,5 mg/g.p.fr. para folha de planta sadia.

Tabela 1. Dosagens de amido e açúcares solúveis totais (mg de substância/g.p.fr.) em folha infectada e controle de feijoeiro Jalo

Substância	Ambiente	Folha controle	Folha infectada região	
			verde	amarela
Amido	claro	9,3	5,9	47,6
	escuro	0,6	0,9	41,0
Açúcares solúveis totais	claro	5,3	5,4	36,2
	escuro	2,5	3,0	31,5

Tabela 2. Concentração de açúcares solúveis totais + amido degradado em folha infectada e controle de feijoeiro Jalo, após 72 horas de escuro (mg de substância/g.p.fr.)

Folha de Planta	Açúcares Totais		Açúcares Totais	Amido Degradado	Açúcares Solúveis
	claro(c)	escuro(e)	(c) - (e) (1)	(Equiv.glicose) (2)	(1) + (2)
controle	5,3	2,5	2,8	9,6	12,4
Infectada região amarela	36,2	31,5	4,7	7,3	12,0
	região verde	5,4	3,0	2,4	5,5

Fazendo-se a conversão da diferença na concentração de amido, antes e depois do período de escuro, para valores equivalentes de glicose produzida pela degradação desse polissacarídeo, teremos que na região amarela foram produzidos 7,3 mg de glicose-equivalente por grama de folha (peso fresco). Na região verde da mesma folha 5,5 mg e na folha controle 9,6 mg. Esses valores somados àquelas concentrações de açúcares solúveis existentes nas folhas antes de serem colocadas no escuro produzem os seguintes resultados:

região amarela	-	36,2	+	7,3	=	43,5 mg
região verde	-	5,4	+	5,5	=	10,9 mg
Folha controle	-	5,3	+	9,6	=	14,9 mg

Utilizando-se estes valores e aqueles obtidos para açúcares solúveis após o período de escuro verifica-se que houve um "desaparecimento" de carboidratos solúveis na ordem de 28% para a região amarela, 73% para região verde da mesma folha e 83% para folha controle. Por outro lado, a somatória (Tabela 2) da diferença de concentração de açúcares solúveis, antes e após o período de escuro, com a concentração (como equivalente-glicose) de açúcares produzidos pela degradação de amido nesse mesmo período, indica que os valores são iguais tanto para as regiões amarelas de folhas infectadas como para folhas-controle (12 mg/g.p.fr.). Para a região verde da mesma folha infectada essa somatória oferece um valor algo menor (~8 mg/g.p.fr.).

6.5. Obtenção do vírus purificado

Nossas observações preliminares indicaram que os tampões KH_2PO_4 e solução de fosfato e citrato de sódio podem ser usados na extração do vírus do mosaico angular. A escolha recaiu sobre o KH_2PO_4 a 0,5 M

pelo fato de ele aparentemente evitar maior agregação das partículas. Dos agentes clarificantes utilizados Triton X-100, clorofórmio/tetracloro de carbono e fosfato de cálcio formado "in situ" podem ser utilizados com bons resultados. Quando se utilizou o Butanol recuperou-se raras partículas do vírus ao final do processo de purificação. Quanto à concentração do vírus optou-se pela utilização de PEG-6000 visto que, por ultracentrifugação, há muita perda de partículas virais por agregação. Tais agregados são perdidos durante as baixas centrifugações.

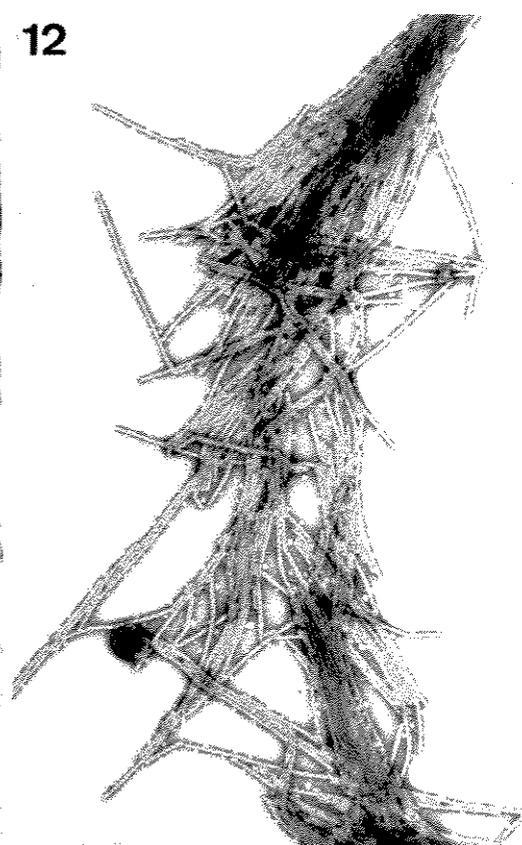
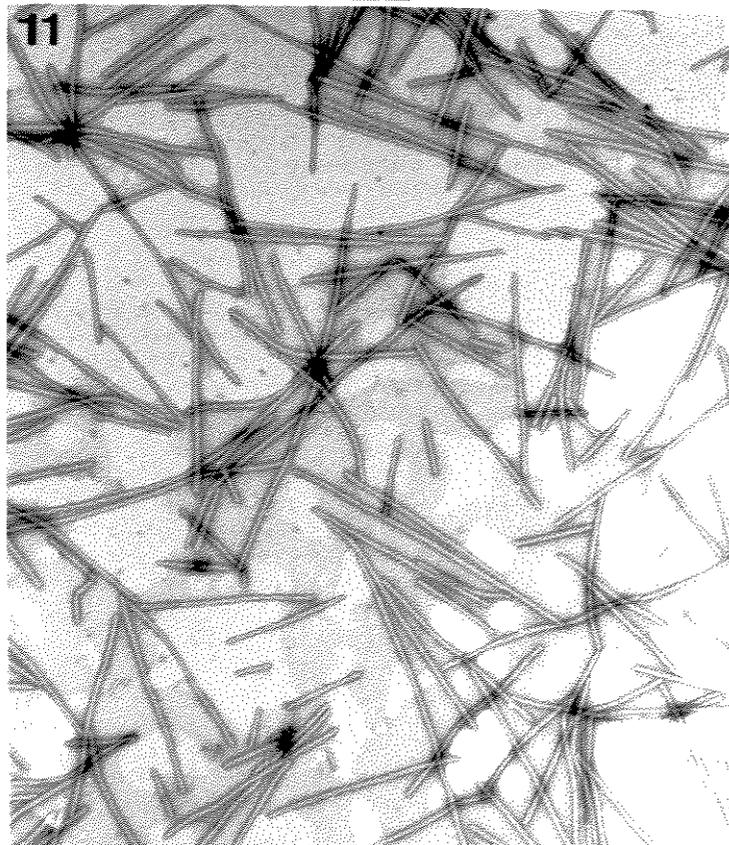
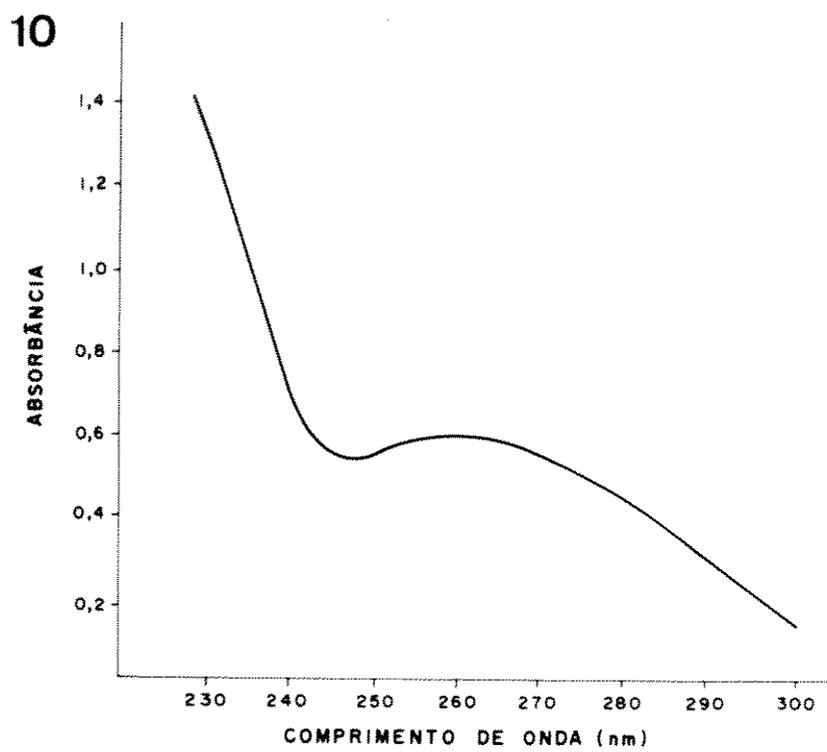
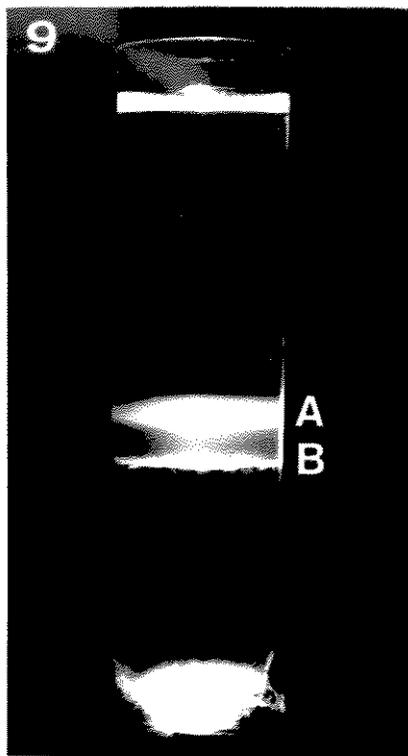
Dos gradientes testados os de sacarose e de sulfato de césio mostraram bons resultados. Nós utilizamos rotineiramente o gradiente de sulfato de césio visto que as bandas formadas são muito mais evidentes, quando comparado com o de sacarose, e por produzir preparações mais livres de contaminantes da hospedeira. No gradiente de cloreto de césio houve agregação total das partículas do vírus do mosaico angular, semelhantemente ao que ocorre com o vírus M da batata (TAVANTZIS, 1983), um outro "carlavirus".

Ressuspensão final do vírus em tampão KH_2PO_4 0,01 M produz alguma agregação das partículas o que é evitado pela utilização do mesmo tampão a 0,5 M.

Quando o "pellet" P-3 (Esquema 2) foi centrifugado em gradiente de sulfato de césio a 110.000 g/4°C/90 min. formaram-se duas bandas, uma a 40 mm do menisco (Banda A) e outra a 47 mm (Banda B) (Figura 9). Exames ao microscópio eletrônico mostraram que a Banda A continha partículas virais não agregadas (Figura 11) enquanto que a Banda B era constituída de agregados de partículas (Figura 12).

Pela metodologia utilizada (Esquema 2), considerando-se somente a fração A e assumindo um coeficiente de extinção de 2,1 determinado

Figuras 9 a 12. Purificação do vírus do mosaico angular do feijoeiro. Figura 9. Tubo de gradiente de densidade em sulfato de césio mostrando a posição das bandas A e B após 110.000 g/4°C/90 min. Figura 10. Espectro de absorção ao ultravioleta da banda A do gradiente de densidade após concentração por ultracentrifugação e ressuspensão em tampão KH_2PO_4 0,5M. Figura 11. Micrografia eletrônica da preparação purificada (Fração A) do VMAF. 44.500X. Figura 12. Microscopia eletrônica da preparação purificada (Fração B) do VMAF 44.500X.



para o vírus latente do cravo, foram obtidos cerca de 4-5 mg de vírus purificado por Kg de folha.

6.6. Atividade biológica do vírus purificado

Aliquotas do vírus purificado (Fração A) foram infectivas quando inoculadas em feijoeiros (4 plantas do cv. Jalo e 4 do cv. Moruna). Todas as plantas de Jalo mostraram sintomas do VMAF cerca de 20 dias após a inoculação enquanto que no cultivar Moruna a detecção do vírus foi feita ao microscópio eletrônico pela técnica de imersão foliar rápida visto que os sintomas nesta variedade eram muito fracos ou mesmo duvidosos. Em todos os casos o resultado foi positivo para a presença de vírus. Assim, foi constatado 100% de infecção quando se utilizou como inóculo partículas purificadas do vírus do mosaico angular.

6.7. Espectro de absorção do VMAF

O espectro de absorção ao ultra-violeta da preparação purificada (Fração A) foi típico de nucleoproteína com picos máximo e mínimo a 260 e 245 nm, respectivamente (Figura 10). As relações encontradas foram: $A_{\max}/\min - 1,12$ e $A_{260}/280 - 1,32$.

A relação de absorção $A_{280}/260$ foi de 0,76 indicando um conteúdo de ácido nucleico ao redor de 7,0%.

6.8. Tentativas de extração do ácido nucleico viral

Todas as tentativas em isolar o ácido nucleico do VMAF por três diferentes técnicas tiveram resultados negativos.

O "pellet" obtido pela técnica do fenol-SDS não mostrou, ao

espectrofotômetro de luz ultra-violeta, curva típica para um ácido nucleico e quando aplicado em gel para eletroforese não formou nenhuma banda.

A mistura de vírus purificado com cloreto de lítio 2 M não separou as partículas do VMAF em seus componentes ácido nucleico e proteína mesmo após 20 h a -20°C . Tanto o pequeno "pellet" formado como o sobrenadante, quando observados ao microscópio eletrônico, mostraram a presença de partículas intactas do VMAF. No "pellet" elas estavam apenas agregadas.

Quando uma alíquota do vírus purificado (Fração A) tratado com SDS e bentonite e aquecido a 55°C foi aplicado em gel de agarose, também não mostrou nenhuma banda de ácido nucleico.

6.9. Peso molecular da proteína da capa viral

Quando as proteínas da capa do vírus do mosaico angular, de naturadas em meio contendo SDS e 2-ME, foram aplicadas em gel de poliacrilamida, houve formação de apenas uma banda (Figura 13) com peso molecular estimado em 32600D conforme determinação comparativa feita com proteínas de peso molecular conhecido (Figura 14).

Figura 13. Eletroforese em gel de poliacrilamida da proteína da capa do VMAF. A, marcadores de peso molecular (AlB, albumina bovina; Ova, ovalbumina; GFD, gliceraldeído fosfato desidrogenase; AnC, anidrase carbônica; Trp, tripsinogênio, TrI, inibidor de tripsina; Lac, lactoalbumina). B, proteína do VMAF. KD, kilodaltons.

13

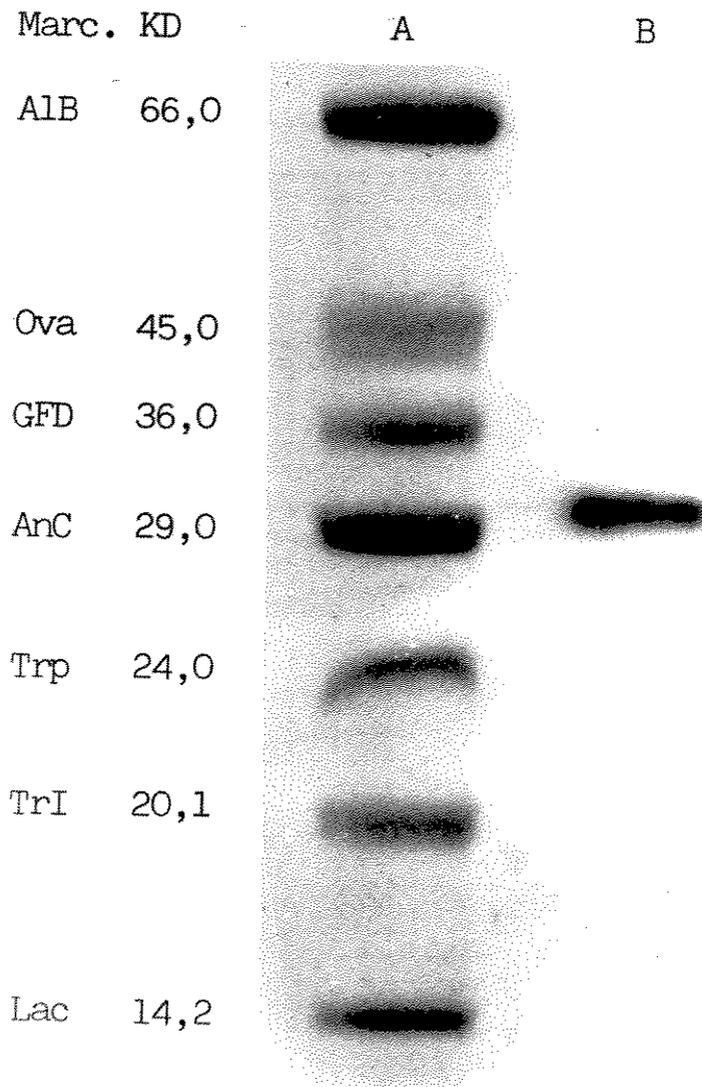
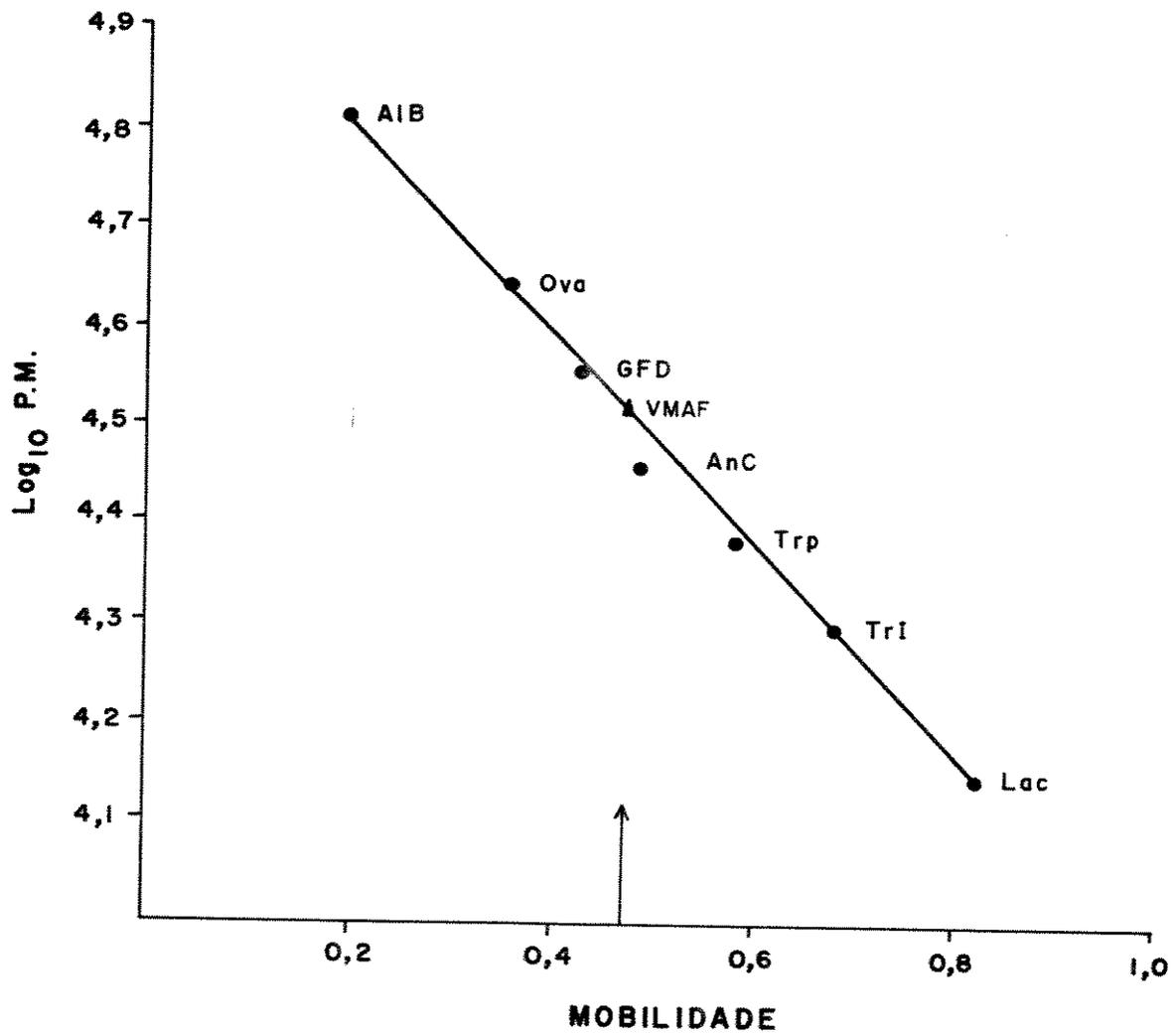


Figura 14. Estimativa do peso molecular da proteína da capa do vírus do mosaico angular do feijoeiro. A flecha indica a mobilidade da banda da proteína viral. Abreviações: AlB, albumina bovina; Ova, ovalbumina; GFD, gliceraldeído fosfato desidrogenase; AnC, anidrase carbônica; Trp, tripsinogênio, TrI, inibidor de tripsina; Lac, lactoalbumina.



7. DISCUSSÃO

O presente trabalho apresenta evidências favoráveis à suposição (COSTA et al., 1983) de que o vírus do mosaico angular do feijoeiro é similar ou igual ao vírus do mosqueado fraco do caupi. Os pontos relatados a seguir favorecem essa afirmativa.

As observações sobre a morfologia da partícula do VMAF indicam grande similaridade com aquelas do VMFC, ou seja, partículas alongadas, ligeiramente flexíveis, com comprimento normal de 650 nm e 13 nm de diâmetro.

Na célula hospedeira, o VMAF ocorre na forma de feixes de partículas paralelas e, principal e caracteristicamente, na forma de feixes de partículas falcadas (Figuras 2,3,4). Tal tipo de feixe foi também detectado em tecidos de plantas infectadas pelo vírus do mosqueado fraco do caupi e comparado ao formato de pincel (BRUNT et al., 1983) ou pena de ave (THONGMEEARKON et al., 1984). A imagem de pincel não serve bem para caracterizar a maneira como tais feixes são visualizados em seções ultrafinas, uma vez que em um pincel, embora os fios sejam presos numa extremidade, eles são retos, enquanto que as partículas do vírus

mostram-se curvas (falcadas). A comparação com pena de ave aproxima-se mais da imagem vista nas eletromicrografias mas pode dar ao leitor a idéia de que o feixe é achatado (como a pena o é) quando, segundo a presente interpretação, o feixe deve ter uma estrutura tridimensional comparável a um cone. Assim sendo, é opinião do autor que a denominação "feixe de partículas falcadas" se presta melhor à descrição do modo como as partículas ocorrem no feixe e uma padronização em torno deste nome é sugerida, o que poderia, inclusive, evitar que em descrições futuras os mesmos possam ser comparados a coqueiros, espanadores, etc. O que não deixa dúvida é que o tipo de feixe descrito para o VMAF é exatamente igual àquele descrito para o VMFC o que, junto com dados da patologia (COSTA et al., 1980, 1983) e serologia (GASPAR et al., 1984), constituem forte evidência de que o vírus do mosaico angular do feijoeiro é o mesmo vírus do mosqueado fraco do caupi ("cowpea mild mottle virus") ou uma estirpe muito próxima deste. Corrobora ainda esta hipótese, o fato de o VMAF ter sua capa constituída por um único tipo de proteína de peso molecular 32.600D semelhante, em termos de peso molecular, ao descrito para o VMFC (32.500D) por BRUNT & KENTEN (1973). Além disso, foi demonstrado que nas preparações purificadas a concentração de ácido nucleico era ao redor de 7% para o VMAF e de 5% para o VMFC. Essa diferença no valor percentual provavelmente não tem significado real e seja causada pelo uso de preparações com diferentes graus de pureza.

Não foi encontrada na literatura (CHRISTIE & EDWARDSOON, 1977; GIOVANNI & RUSSO, 1977; EDWARDSOON & CHRISTIE, 1978; FRANCKI et al., 1985) nenhuma indicação da presença do tipo de feixe de partículas falcadas para outras combinações de vírus/planta indicando que o mesmo pode,

inclusive, ser utilizado para diagnóstico da presença do VMAF e do VMFC.

O vírus do mosaico angular do feijoeiro, semelhantemente ao vírus do mcsqueado fraco do caupi e tantos outros "carlavirus", não induziu, com regra geral, modificações celulares significativas quando comparado com células de plantas não infectadas e nem apresentou frequente associação com organelas citoplasmáticas e núcleo celular. Entretanto, em células de parênquima de feijoeiro Jalo infectado pelo VMAF foram, às vezes, observadas áreas contendo massas de retículo endoplasmático com ou sem a presença de partículas virais. Este tipo de inclusão não foi detectado em células de soja e outros cultivares de feijoeiro infectados pelo VMAF, podendo representar uma reação particular da interação Jalo-VMAF. Entretanto estruturas bastante similares foram detectadas (CHRISTIE & EDWARDS, 1977) em células de ervilha (Pisum sativum) infectadas pela estirpe Wisconsin de "pea streak virus" ou pelo "red clover vein mosaic virus" e em células de couve (Brassica oleracea) infectada pelo vírus latente (KITAJIMA et al. 1970), todos pertencentes ao grupo dos "carlavirus". Tais inclusões membranosas têm sido interpretadas como 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 o sítio de montagem das partículas (GIOVANNI & RUSSO, 1977).

É no cultivar Jalo entretanto (e até o presente só determinado neste) que o VMAF induz a mais evidente alteração celular, traduzida por uma alta concentração de amido nas regiões amarelas de folhas infectadas quando comparadas com as regiões verdes da mesma folha e aquelas de plantas saudas.

Alta concentração de amido em folhas de plantas infectadas é

um fenômeno já conhecido há bastante tempo para várias combinações vírus/planta (por ex. COSTA, 1937; BALLS & MARTIN, 1938; WATSON & WATSON, 1951; JENSEN, 1972) sendo, o fenômeno, atribuído a uma redução na permeabilidade das membranas, influenciando no sistema de transporte, ou a mudanças no sistema enzimático do metabolismo desse polissacarídeo (MATHEWS, 1981).

AMP-cíclico (3'-5' adenosina monofosfato cíclico), uma molécula com papel fundamental no controle do processo de degradação do glicogênio em tecidos animais, foi detectado em plantas de trevo branco (Trifolium repens L.) sendo sua concentração maior em plantas saudáveis do que naquelas infectadas pelo vírus do mosaico do trevo (TU, 1977; 1979). Após suprir folhas destacadas com diferentes concentrações de AMP-c, este autor verificou o desaparecimento do amido tanto nas folhas infectadas como saudáveis e sugeriu que a ação do AMP-c seria facilitar o transporte de glicose através das membranas.

No caso do cultivar Jalo infectado pelo VMAF, as determinações quantitativas indicaram que as regiões amarelas apresentavam cerca de 8 vezes mais amido do que as regiões verdes da mesma folha e cerca de 5,5 vezes mais do que nas folhas de plantas-controle. Quando mantidas no escuro por 72 h verificou-se que a taxa de degradação de amido nas regiões amarelas é de 14% enquanto que nas regiões verdes da mesma folha é de 86% e na folha controle 93%. As regiões amarelas apresentam também cerca de 7 vezes mais açúcares solúveis totais do que as regiões verdes da mesma folha e nas folhas de plantas controle. Após 72 h de escuro esses valores caem cerca de 13% nas regiões amarelas, 45% nas regiões verdes da mesma folha e 53% nas folhas-controle. Em termos quantitativos, entretanto, o que se verifica é que o "desaparecimento" de açúcares solúveis, como

determinado (Tabela 2) pela somatória da diferença de concentração antes e após o período de escuro mais a concentração (glicose-equivalente) de açúcares produzidos pela degradação de amido nesse mesmo período, é igual para as regiões amarelas da folha infectada e para folhas controle (12 mg/g.p.fr.) e algo menor (8 mg/g.p.fr.) para regiões verdes da mesma folha infectada.

Esses dados indicam que a existência de alto teor de amido e açúcares solúveis nas regiões amarelas provavelmente não é um fenômeno causado por redução da permeabilidade das membranas ao transporte de açúcares das regiões amarelas para outras partes da planta. Como explicar então, os altos teores desses carboidratos nas regiões amarelas?

Uma possível explicação para o fato, é que haveria uma canalização do transporte de açúcares para as regiões amarelas semelhantemente ao que ocorre com os pontos de armazenamento da planta. O fluxo de açúcares para essas regiões ocorreria talvez como um fenômeno similar ao de armazenamento de amido nos órgãos de reserva, tais como raios medulares, sementes e tubérculos.

Reversão no transporte de fotossintetizados tem sido descrito para tecidos infectados por fungos, onde os centros de infecção tornam-se pontos de consumo e drenam fotossintetizados dos tecidos circundantes e mesmo de folhas saudáveis mais distantes (LIVNE & DALY, 1966). KOSUGE (1978) sugeriu a possibilidade de que o mesmo mecanismo poderia explicar a retenção de fotossintetizados em folhas infectadas por vírus, o que não parece verdadeiro. Esta discordância baseia-se no fato de que no caso de infecção por fungo, o tecido infectado torna-se uma região de consumo gerada por um gradiente de concentração de fotossintetizados entre esse tecido

com menor concentração de solutos devido ao consumo pelo parasita, e os tecidos vizinhos sem, no entanto, haver estocagem de carboidratos na forma de amido. No caso de infecção por vírus, mesmo que haja um aumento no consumo de carboidratos (esqueletos de carbono) devido à replicação viral, ele não é permanente, dado ao decréscimo na taxa de replicação, e não poderia explicar o acúmulo desses carboidratos. Aqui, o fenômeno nos parece mais ligado a um processo de estocagem de carboidratos do que de formação de pontos de consumo e esta parece ser a melhor explicação para o alto teor de carboidratos nas regiões amarelas de folhas do cultivar Jalo infectado pelo VMAF. Alguma interferência da infecção viral sobre a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo do amido, é entretanto, possível. e, obviamente, estudos mais detalhados deverão ser realizados para que se possa ter uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nesse fenômeno.

Os trabalhos de purificação do VMAF utilizando-se Butanol como agente clarificante foram pouco satisfatórios, dado a baixa concentração de vírus obtida no final do processo. Resultado negativo devido à utilização de Butanol foi também descrito para o vírus latente da alfafa (VEERISSETTY & BRAKKE, 1978) enquanto que a utilização desse solvente na purificação do vírus do mosqueado fraco do caupi resultou em preparações de baixa rendimento (BRUNT & KENTEN, 1973). Estes dados poderiam explicar os resultados negativos obtidos por L.O.S. BERIAM (comunicação pessoal) que tentou, por várias vezes, purificar o VMAF utilizando Butanol. Em uma de suas tentativas este investigador obteve uma preparação que, embora com rendimento bastante baixo, foi utilizado, com resultados positivos, para obtenção de antissoro para o VMAF (1980, resultados não publicados).

Com a metodologia adotada no presente trabalho (Esquema 2) obteve-se cerca de 4-5 mg de vírus por Kg de folha, considerando-se apenas as partículas não agregadas obtidas na fração A do gradiente de sulfato de césio. A concentração do vírus na planta (mg de vírus/Kg tecido) deve, entretanto, ser bem maior do que essa visto que, embora tivesse sido utilizado várias substâncias anti-agregantes, perde-se muito vírus por agregação durante o processo de purificação sendo tais agregados perdidos durante as centrifugações de baixa rotação. Estes dados corroboram o conhecimento de que os vírus pertencentes aos grupos dos "carlavirus" e "potyvirus" apresentam problemas para purificação principalmente devido à grande agregação de partículas que ocorre durante o processo (VEERISETTY & BRAKKE, 1978; GIBBS & HARRISON, 1970). Embora a recuperação de partículas do VMAF não tenha sido muito elevada, a preparação final pode ser considerada razoavelmente pura, como determinado pela microscopia eletrônica e pela relação A260/280 próximo da unidade.

As preparações purificadas do VMAF quando inoculadas em feijoeiros mostraram-se altamente infectivas reproduzindo os sintomas característicos da doença, principalmente no cultivar Jalo que é a única variedade conhecida em que o VMAF induz mosaico bastante conspícuo. Extratos de folhas destas plantas foram também infectivos quando inoculados em feijoeiros sadios sendo, então, o VMAF novamente purificado a partir destas plantas. Estes dados estão de acordo com os Postulados de Kock, como aplicados em fitovirologia, quanto à patogenicidade do vírus do mosaico angular na indução da moléstia conhecida como mosaico angular do feijoeiro Jalo.

Os resultados negativos obtidos na extração de ácido nucleico das partículas de preparações purificadas do VMAF, como determinado pela

não obtenção de curva típica para ácido nucleico ao espectrofotômetro e pela não formação de banda em gel de agarose, provavelmente foram causados por degradação do ácido nucleico durante o processo de extração, embora tenha-se sempre trabalhado com vidraria e soluções esterilizadas. É possível que partículas do VMAF, quando de sua purificação, passam a possuir em associação traços de nucleases da hospedeira.

8. CONCLUSÕES

1. A reprodução da moléstia com as preparações purificadas preenche os requisitos dos postulados de Koch para a área viral e comprova ser o VMAF o agente causador da doença conhecida com o nome de mosaico angular do feijoeiro Jalo.
2. O vírus do mosaico angular do feijoeiro Jalo tem propriedades (patológicas, citológicas, serológicas, etc.) similares que o tornam idêntico ao vírus do mosqueado fraco do caupi ("cowpea mild mottle virus").
3. O feixe de partículas falcadas, como detectado em secções ultrafinas ao microscópio eletrônico, pode ser usado como diagnóstico para presença do VMAF e VMFC em tecidos infectados.
4. O vírus do mosaico angular do feijoeiro induz no feijoeiro Jalo armazenamento de amido e açúcares solúveis nas regiões amarelas de folhas infectadas.
5. Os gradientes de densidade de sacarose e sulfato de césio mostram bons resultados para purificação do VMAF enquanto que o de cloreto de césio induz total agregação das partículas desse vírus.

9. LITERATURA CITADA

- ADAMS, A.N. & BARBARA, D.J. 1980. Host range, purification and some properties of hop mosaic virus. *Ann. appl. Biol.* 96:201-208.
- ATKINSON, M.A. & COOPER, J.I.: 1976. Ultrastructural changes in leaf cells of poplar naturally infected with poplar mosaic virus. *Ann. appl. Biol.* 83:395-398.
- BAGNALL, R.H., LARSON, R.H. & WALKER, J.C. 1956. Potato viruses M, S, and X in relation to interveinal mosaic of the Irish Cobbler variety, Research Bulletin nº 198. University of Wisconsin, Madison 45 pag.
- BALLS, A.K. & MARTIN, L.E. 1938. Amylase activity of mosaic tobacco. *Enzymologia* 5:233-238.
- BOCCARDO, G. & MILNE, R.G. 1976. Poplar mosaic virus: electron microscopy and polyacrylamide gel analysis. *Phytopath. Z.* 87:120-131.
- BOS, L. & RUBIO-HUERTOS, M. 1971. Intracellular accumulation of Passiflora latent virus in Chenopodium quinoa. *Neth. J. Plant Pathol.* 77: 145-154.
- BOS, L. & RUBIO-HUERTOS, M. 1972. Light and electron microscopy of pea streak virus in crude sap and tissues of pea (Pisum sativum). *Neth. J.*

- Pl. Path. 78:247-257.
- BRUNT, A.A. 1977. Some hosts and properties of narcissus latent virus, a carlavirus commonly infecting narcissus and bulbous iris. Ann. appl. Biol. 87:355-364.
- BRUNT, A.A. & KENTEN, R.H. 1973. Cowpea mild mottle, a newly recognized virus infecting cowpea (Vigna unguiculata) in Ghana. Ann. appl. Biol. 74:67-74.
- BRUNT, A.A., STACE-SMITH, R. & LEUNG, E. 1976. Cytological evidence supporting the inclusion of poplar mosaic virus in the carlavirus group of plant viruses. Intervirology 7:303-308.
- BRUNT, A.A., ATKEY, P.T. & WORDS, R.D. 1983. Intracellular occurrence of cowpea mild mottle virus in two unrelated plant species. Intervirology 20:137-142.
- CHRISTIE, R.G. & EDWARDSON, J.R. 1977. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. Fla. Agric. Exp. Stn. Monogr. nº 9 150 pp.
- COSTA, A.S. 1937. Nota sobre o mosaico do algodoeiro. Boletim Técnico nº 37. Instituto Agronômico, Campinas, 20 pp.
- COSTA, A.S., GASPAR, J.O. & VEGA, J. 1980. Mosaico angular do feijoeiro Jalo causado por um vírus do grupo S transmitido por mosca branca. 1º Seminário sobre pragas e doenças do feijoeiro. Instituto Biológico, Campinas, SP. 6-7 maio.
- COSTA, A.S., GASPAR, J.O. & VEGA, J. 1983. Mosaico angular do feijoeiro Jalo causado por um "carlavirus" transmitido pela mosca branca Bemisia tabaci. Fitopat. Bras. 8:325-337.
- De BOKX, J.A. & WATERREUS, H.A.J.I. 1971. Electron microscopy of plant tissues infected with potato viruses A and S. Neth. J. Plant Pathol. 77:106-112.

- DUBERN, J. & DOLLET, M. 1981. Groundnut crinkle virus, a new member of the carlavirus group. *Phytopath. Z.* 101:337-347.
- EDWARDSON, J.R. & CHRISTIE, R.G. 1978. Use of virus-induced inclusions in classification and diagnosis. *Ann. Rev. Phytopathol.* 16:31-55.
- FRAENKEL-CONRAT, H. SINGER, E & TSUGITA, A. 1961. Purification of viral RNA by means of bentonite. *Virology* 14:54-58.
- FRANCKI, R.I. B. & McLEAN, G.D. 1968. Purification of potato virus X and preparation of infectious ribonucleic acid by degradation with lithium chloride. *Aust. J. biol. Sci.* 21:1311-1318.
- FRANCKI, R.I.B., MILNE, R.G. & HATTA, I. 1985. Atlas of plant viruses vol. I and II CRC Press, Inc. Florida.
- GASPAR, J.O., VEGA, J. & COSTA, A.S. 1980. Ocorrência citoplasmática do vírus do mosaico angular do feijoeiro Jalo na forma de feixes falcados. XIII Cong. Bras. Fitopatologia, Rio de Janeiro.
- GASPAR, J.O., BERIAM, L.O.S., ALVES, M.N., OLIVEIRA, A.R. & COSTA, A.S. 1985. Serological identity of bean angular mosaic and cowpea mild mottle viruses. *Fitopat. Bras.* 10:195-199.
- GIBBS, A.J. & HARRISON, B.D. 1976. *Plant Virology, The Principles.* Edward Arnold (Publishers) Ltd. 292 p. London.
- GIOVANNI, P. & RUSSO, M. Plant virus inclusion bodies. 1977. *Adv. Virus Res.* 21:175-254.
- HAGEDORN, D.J. & HANSON, E.W. 1951. A comparative study of the viruses causing Wisconsin pea stunt and red clover vein mosaic. *Phytopathology* 41:813-819.
- HEARON, S.S. 1982. A carlavirus from Kalanchoe blossfeldiana. *Phytopathology.* 72:838-844.

- HIRUKI, C. & SHUKLA, P. 1973. Intracellular location of potato virus S in leaf tissue of Chenopodium quinoa. *Can. J. Bot.* 51:1699-1702.
- HIRUKI, C. & TU, J.C. 1972. Light and electron microscopy of potato virus M lesions and marginal tissue in red kidney bean. *Phytopathology* 62:77-85.
- HODGE, J.E. & HOFREITER, B.T. 1962. Determination of reducing sugars and carbohydrates. In: *Methods in carbohydrate chemistry*. (Whistler, R.L. and Wolfrom, J.L. eds.) vol.1 pp.380-394. Academic Press, New York.
- HOLLINGS, M. 1957. Investigation of Chrysanthemum viruses. II. Virus B (mild mosaic) and Chrysanthemum latent virus. *Ann. appl. Biol.* 45: 589-602.
- IIZUKA, N., RAJESHWARI, R. REDDY, D.V.R., GOTO, J. MUNIYAPPA, V., BHARA THAN, N. & GHANEKAR, A.M. 1984. Natural occurrence of a strain of cowpea mild mottle virus on groundnut (Arachis hypogaea) in India. *Phytopath. Z.* 109:245-253.
- IWAKI, M., THONGMEEARKON, P., PROMMIN, M., HONDA, Y. & HIBI, J. 1982. Whitefly transmission and some properties of cowpea mild mottle virus on soybean in Thailand. *Plant Disease* 66:265-268.
- JENSEN, S.G. 1972. Metabolism and carbohydrate composition in barley yellow dwarf virus-infected wheat. *Phytopathology* 62:587-592.
- JOHNS, L.J. 1982. Purification and partial characterization of a carla-virus from Taraxacum officinale. *Phytopathology*. 72:1239-1242.
- KAHN, M.A., MAXWELL, D.P., & MAXWELL, M.D. 1973. Ultrastructure, cytochemistry and light microscopy of inclusions induced by red clover vein mosaic virus infection. 2nd Int. Congr. Plant Pathol. Minneapolis, Abstr. O270.

- KARNOVSKY, M. J. 1967. The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a traces. *J. Cell Biol.* 35:213-236.
- KASSANIS, B. 1955. Some properties of four viruses isolated from carnation plants. *Ann. app. Biol.* 43:103-113.
- KITAJIMA, E. W. 1965. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. *J. Electron microscopy* 14:119-121.
- KITAJIMA, E.W., CAMARGO, I.J.B. & COSTA, A.S. 1970. Morfologia e aspectos intracelulares do vírus latente da couve. *Bragantia* 29:181-190.
- KOENIG, R. 1982. Carlavirus group. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses nº 259, 4 pp.
- KOENIG, R., LESEMANN, D.E., LOCKHART, B., BETZOLD, J.A. & WEIDEMANN, H. L. 1983. Natural occurrence of Helenium Virus S in Impatiens holstii. *Phytopath. Z.* 106:133-140.
- KOSUGE, T. 1978. The capture and use of energy by diseased plants. In *Plant Disease, an advanced treatise*. Vol. III (Horsfall, J.G. and Cowling, E.B. eds) pp. 85-116. Academic Press. New York.
- KUSCHKI, G.H., KOENIG, R., DÜVED, D. & KÜHNE, H. 1978. Helenium virus S and Y - two new viruses from commercially grown Helenium hybrids. *Phytopathology* 68:1407-1411.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. (London) 227:680-685.
- LAYNE, E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: *Methods in Enzimology*, vol. III. (Colowich, and Kaplan, N.D. eds.) 1154 pp. Academic Press, New York.
- LIVNE, A. & DALY, J.M. 1966. Translocation in healthy and rust-affected beans. *Phytopathology* 56:170-175.

- LOENING, U.E. 1967. The fractionation of high molecular weight ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochem. J.* 102: 251-257.
- LUISCNI, G., BOCCARDO, G. & MILNE, R.G. 1976. Purification and some properties of an Italian isolate of Poplar mosaic virus. *Phytopath. Z.* 85:65-73,
- MATHEWS, R.E.F. 1981. *Plant Virology*. 897 pp. Academic Press. Inc. New York.
- MOLLENHAUER, H.A. 1964. Plastic emedding mixtures for use in electron microscopy. *Stain Technology* 39:111-114.
- PAUL, H.L. 1974. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of virion proteins as a tool for detecting the presence of virus in plants. *Phytopath. Z.* 80:330-339.
- PAUL, H.L. & WETTER, C. 1964. Untersuchungen am carnation latent virus. 1. Preparation, physikalische und chemische Eigenschaften. *Phytopath. Z.* 49:401-406.
- RUEIO-HUERTOS, M. & BCS, L. 1973. Light and electron microscopy of red clover vein mosaic virus in pea (*Pisum sativum*). *Neth. J.Pl.Path.* 79: 94-103.
- SCHULTZ, E.S. & FOLSON, D. 1923. Transmission, variation, and control of certain degeneration diseases of Irish potatoes. *J. Agric. Res.* 25: 43-117.
- TAVANTZIS, S.M. 1983. Improved purification of two potato carlaviruses. *Phytopathology* 73:190-194.
- THONGMEEARKOM, P., HONDA, Y. IWAKI, M. & DEEMA, N. 1984. Ultrastructure of soybean leaf cells infected with cowpea mild mottle virus. *Phytopath. Z.* 109:74-79.

- TU, J.C. 1977. Cyclic AMP in clover and its possible rôle in clover yellow mosaic virus-infected tissue. *Physiological Plant Pathology* 10: 117-123.
- TU, J.C. 1979. Alterations in chloroplasts and cell membranes associated with c-AMP-induced dissociation of starch grains in clover yellow mosaic virus infected clover. *Can. J. Bot.* 57:360-369.
- TU, J.C. & HIRUKI, C. 1970. Ultrastructure of potato infected with potato virus M. *Virology* 42:238-242.
- VAN LENT, J.W.M., WIT, A.J. & DIJKSTRA, J. 1980. Characterization of a carlavirus in elderberry (Sambucus spp.) *Neth. J. Pl. Path.* 86:117-134.
- VARMA, A., GIBES, A.J., WOODS, R.D. & FINCH, J.T. 1968. some observations on the structure of the filamentous particles of several plant viruses. *J. gen. Virol.* 2:107-114.
- VARMA, A., GIBBS, A.J. & WOODS, R.D. 1970. A comparative study of red clover vein mosaic virus and some other plant viruses. *J. gen. Virol.* 8: 21-32.
- VEERISETTY, V. & BRAKKE, M.K. 1977a. Alfalfa latent virus, a naturally occurring carlavirus in alfalfa. (Medicago sativa L.) *Phytopathology* 67:1202-1206.
- VEERISETTY, V. & BRAKKE, M.K. 1977b. Differentiation of legume carlavirus based on their biochemical properties. *Virology* 83:226-231.
- VEERISETTY, V. & BRAKKE, M.K. 1978. Purification of some legume carlaviruses. *Phytopathology* 68:59-64.
- VENABLE, J. & COGGESHALL, R. 1965. The use of a simple lead citrate stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 25:407-408.

- WATSON, M.A. & WATSON, D.J. 1951. The effect of infection with beet yellows and beet mosaic viruses on the carbohydrate content of sugar-beet leaves, and on translocation. *Ann. app. Biol.* 38:276-288.
- WETTER, C. & BRANDES, J. 1956. Untersuchngen über das Kartoffel S-virus. *Phytopath. Z.* 26:81-92.
- WETTER, C. & MILNE, R.G. 1981. Carlaviruses In: Handbook of plants virus infections and comparative (Kurstak, E. ed) pp. 695-729. Amsterdam. Elsevier/North-Holland.