

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

DANIELE SCANDIUCCI DE FREITAS

ESTUDO DE UM POTYVIRUS ISOLADO DE
ESPÉCIES DE *Crotalaria*

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do título de
Mestre em Biologia Vegetal.

Este exemplar corresponde a

da tese defendida pelo(a) candidato a)

Daniele Scanducci de Freitas

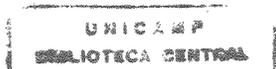
e aprovada pela (comissão julgadora)

11/07/2000

Orientador: Prof. Dr. Jorge Vega

2000.13556

2000



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	B.C.		
N.º CHAMADA:	T/Unicamp		
	F884e		
V.	Ex.		
TOMBO BC/	42.280		
PROC.	16-278100		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00		
DATA	22/09/00		
CPD			

CM-00144201-3

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

F884e Freitas, Daniele Scandiucci de
Estudo de um potyvirus isolado de espécies de *Crotalaria* /
Daniele Scandiucci de Freitas. - -Campinas, SP. [s.n.], 2000
60f. ilustr.

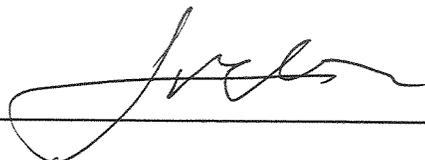
Orientador: Jorge Vega
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Leguminosas. 2. Virus. 3. Fitopatologia. I. Vega, Jorge.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

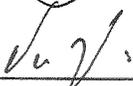
Data da Defesa 12 / 07 / 2000

Banca Examinadora

Prof. Dr. Jorge Vega (orientador)



Prof. Dr. Valdir Atsushi Yuki



Prof. Dr. Ivan Godoy Maia



Profa. Dra. Marlene Schiavinato



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Este trabalho é dedicado a todos os que ajudaram na sua elaboração,
sobretudo à minha família que participou, me apoiando, em todas as etapas.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Agradeco

À minha família que sempre incentivou e apoiou;

Ao Jorge, que me orientou;

Ao Valdir, um grande amigo, que, não oficialmente, foi co-orientador deste trabalho;

À UNICAMP e IAC pelo local de trabalho;

FAPESP pela bolsa (processo número 98/00885-0), financiamento a congressos, compra de materiais e reagentes (Reserva Técnica Número: 1998/7216-7);

Aos amigos, sempre me ajudaram nos momentos difíceis.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas	i
Resumo	ii
Summary	iv
Introdução	1
Objetivos	6
Materiais e Métodos	
1. Material de Estudo	7
2. Transmissão do Vírus	
2.1. Inoculação Mecânica	7
2.2. Inoculação Mecânica com Lâmina Cortante	8
2.3. Transmissão por Afídeos	8
2.3.1. Eficiência da Transmissão por <i>Myzus Persicae</i>	9
2.4. Transmissão por Sementes	10
2.5. Transmissão pela Raiz	10
2.6. Efeito De Infecção em Diferentes Estágio de Desenvolvimento de Feijão 'Preto' e 'Bt-2'	11
3. Propriedade do Vírus <i>In Vitro</i>	
3.1. Inativação Térmica	11
3.2. Longevidade <i>In Vitro</i>	12

	Página
3.3. Ponto Final de Diluição	13
4. Purificação	13
5. Serologia	
5.1. ELISA	14
5.1.1. PTA-ELISA	14
5.1.2. DAS-ELISA	15
5.2 Western-Blot	16
6. Microscopia Eletrônica	
6.1. Microscopia Eletrônica de Cortes de Tecidos	17
6.2. Microscopia Eletrônica Imuno-Adsorção	18
7. Microscopia de Luz	19
Resultados	
1. Transmissão do Vírus	
1.1. Transmissão Mecânica	20
1.2. Transmissão por Afídeos	20
1.2.1. Eficiência de transmissão por <i>Myzus persicae</i>	21
1.3. Inoculação por Lâmina Cortante	21
1.4. Transmissão por Semente	22
1.5. Transmissão pela Raiz	23
2. Círculo de Hospedeiras	23
3. Efeito da Infecção em Diferentes Estágios de Desenvolvimento de Feijão 'Preto G-2' e 'BT-2'	30

	Página
4. Propriedades do Vírus <i>In Vitro</i>	
4.1. Inativação Térmica	33
4.2. Longevidade <i>In Vitro</i>	34
4.3. Ponto Final de Diluição	35
5. Purificação	35
6. Serologia	
6.1. Comparação do VMCr com Diferentes <i>Potyvirus</i> pelo Teste ELISA	37
6.2. Massa Molecular da Proteína Capsidial: Western Blot	38
7. Comparação entre o VMCr e o PWV	38
8. Microscopia Eletrônica	
8.1. Microscopia Eletrônica de Cortes de Tecidos	40
8.2. Microscopia Eletrônica de Imuno-Adsorção	43
9. Microscopia de Luz	43
Discussão	45
Referências Bibliográficas	49

ABREVIATURAS

PaMV: "passionfruit mottle virus"

PMV: ("pea mosaic virus") vírus do mosaico da ervilha

PRSV-W: ("papaya ringspot virus-W") vírus do mosaico do mamoeiro - estirpe melancia

PSV: ("peanut stripe virus")

PWV: ("passionfruit woodiness virus") ou VEFM vírus do endurecimento dos frutos do maracujá ou vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro

SAPV: "south african passiflora virus"

SMV: ("soybean mosaic virus") vírus do mosaico da soja

TMMV : "tuberose mild mosaic potyvirus"

WMV-2 ("watermelon mosaic virus") vírus do mosaico da melancia

ZYMV: ("zucchini yellow mosaic virus") vírus do mosaico da abóbora

EDTA: "Ethylenediamine Tetraacetic Acid"

PBS-T: ("phosphate buffer") tampão fosfato acrescido de Tween-20

SDS: ("sodium dodecil sulfate") dodecil sulfato de sódio

TBS-tween: ("Tris-buffered saline") tampão Tris contendo Tween-20

2-ME: 2-mercapto-ethanol

RESUMO

Foi estudado um vírus, preliminarmente considerado da família *Potyviridae*, infectando em condições naturais duas espécies de crotalária, nas quais induz sintomas de mosaico. O vírus foi denominado vírus do mosaico da crotalaria (VMCr). Foram analisados os seguintes aspectos: círculo de hospedeiras, propriedades "in vitro", transmissão por afídeos e pela semente, formas de transmissão mecânica, citopatologia, purificação, relações serológicas com outros potyvirus e massa da proteína do capsídeo.

O círculo de hospedeiras ficou restrito a espécies da família *Leguminosae*, sendo uma das hospedeiras características *Phaseolus vulgaris*. 'Preto G-2', espécie na qual induz necrose local seguida de necrose sistêmica. As propriedades in vitro apresentaram valores dentro da faixa dos potyvirus. Foi demonstrada a transmissão pelos afídeos *Aphis gossypii*, *Myzus persicae* e *M. nicotianae* e com menor eficiência por lâmina cortante. A transmissão mecânica convencional teve eficiência de cerca de 80%. Não foi observada transmissão pela semente.

Foram observadas inclusões através de microscopia de luz, e caracterizadas por microscopia eletrônica: elas são formadas por estruturas do tipo "cata-vento" e feixes ou rolos características dos potyvirus. O protocolo de purificação empregado apresentou baixo rendimento. Na comparação serológica através do teste de ELISA foi verificada relação com o vírus do endurecimento dos frutos do maracujá isolado no Brasil (VEFM). Utilizando anti-soro para esse vírus foi detectado o VMCr pela técnica PTA-ELISA e western-blot. Através deste último método foi estimada a massa molecular relativa da proteína capsidial em 37 kDa.

Considera-se que o VMCr seja um isolado do VEFM que tem evoluído no sentido de infectar principalmente leguminosas. Dados recentes da literatura indicam que o VEFM isolado no Brasil seria mais próximo ao vírus do maracujá isolado em África do Sul, diferente do VEFM. Isto provavelmente explicaria a divergência dos resultados aqui apresentados, no referente à morfologia das inclusões citoplasmáticas, dos relatados para o VEFM em outros países.

SUMMARY

A virus isolated from *Crotalaria* species showing the mosaic symptom, preliminarily identified as a potyvirus, was studied. The virus was named *Crotalaria* mosaic virus. The characteristics studied were: host range, "in vitro" properties, transmission by aphids, seed transmission and different mechanical transmission methods, cytopathology, serological relation with other potyviruses and molecular mass of the capsid protein.

The host range is limited to species of the *Leguminosae* family and one characteristic host is *Phaseolus vulgaris* 'Preto G-2', which shows local necrosis followed by systemic necrosis. The "in vitro" properties parameters were similar to the values reported for most potyviruses. Transmission of the virus by *Aphis gossypii*, *Myzus persicae* e *M. nicotianae* was demonstrated. Mechanical transmission was efficient (80% transmission), and transmission by knife blade also was possible but with low efficiency. Seed transmission was not observed.

Intracellular inclusions observed by light and electron microscopy were pinwheel and scroll type. The purification of the virus was possible with the procedure used but virus yield was poor.

Comparisons by PTA-ELISA tests showed serological relation with the Brazilian isolate of passion-fruit woodiness virus (PWV). Using antiserum against PWV was possible to detect *crotalaria* mosaic virus by PTA-ELISA and western-blot. The relative molecular mass of the capsid protein was estimated to be 37 kDa.

Probably *crotalaria* mosaic virus is a strain of PWV that evolved toward a narrow host range of species mainly belonging to the *Leguminosae* family. Recent reports

indicate that most Brazilian isolates of PWV are more related to the South African Passion-fruit virus, differing from standard type PWV. This fact may explain the differences observed in the morphology of cytoplasmic inclusions from data reported for PWV in other countries.

INTRODUÇÃO

Potyviridae é a família mais numerosa de fitovírus. Nela foram classificadas, até o presente, 182 espécies de vírus (Edwardson & Christie, 1996), das quais 40 foram relatadas no Brasil, infectando uma grande variedade de espécies vegetais (Kitajima, 1995). A patologia induzida pelos vírus fitopatogênicos desta família abrange uma série de sintomas macroscópicos, que incluem mosaico, necrose, deformações foliares e de frutos, entre outros, e até mesmo infecção latente (infecção sem sintomas). A expressão dos sintomas pode ser bastante afetada pelas condições ambientais, sendo em geral diminuídos ou mascarados em temperaturas relativamente altas (Hollings & Brunt, 1981).

Algumas proteínas dos potyvirus podem agregar-se, formando estruturas estáveis características, denominadas inclusões cilíndricas, que constituem sintomas citológicos da infecção com valor diagnóstico. As inclusões induzidas pelos potyvirus ocorrem geralmente no citoplasma, e em alguns casos no núcleo de células da epiderme, do mesófilo e, ocasionalmente, do floema (Edwardson & Christie, 1996). A capacidade de induzir inclusões cilíndricas no citoplasma da célula infectada é a mais importante característica fenotípica (Jordan & Hammond, 1991; Ward & Shukla, 1991), que tem sido usada na identificação e classificação do vírus (Edwardson, 1974). As inclusões cilíndricas podem apresentar várias configurações, variando em tamanho e complexidade (Edwardson & Christie, 1996). Outro tipo de inclusão induzida por alguns potyvirus, é a inclusão nuclear cristalina em forma de pirâmide, diamante, agulha, cubo, etc. Além das inclusões cilíndricas e nucleares, determinados potyvirus podem induzir inclusões amorfas, cristalinas ou fibrilares que

se formam no citoplasma de células infectadas. Os vírus classificados como pertencentes a esta família são caracterizados por terem partículas alongadas, flexuosas, medindo entre 680 a 900 nm de comprimento e 11 a 15 nm de diâmetro (Dougherty & Carrington, 1988; Hammond & Lawson, 1988). A partícula viral tem simetria helicoidal contendo uma molécula de RNA de fita simples de, aproximadamente, 10.000 bases (Gibbs & Mackenzie, 1997; Roberts *et al*, 1998). A massa da proteína capsidial pode variar de 28 e 38 kDa, mas para a maioria dos potyvirus está entre 33 e 34 kDa (Zerbini e Maciel-Zambolim, 1999).

Atualmente há proposta de classificar a família *Potyviridae* em cinco gêneros, de acordo com o vetor e com características moleculares diferenciais (Zerbini e Maciel-Zambolim, 1999). Destes cinco gêneros, somente três são oficialmente aceitos pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV). Eles são:

1) gênero *Potyvirus* (129 espécies), transmitido por afídeos a plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas. O genoma é composto por uma molécula de RNA de fita simples, sentido positivo. Ex.: vírus Y da batata.

2) gênero *Rymovirus* (7 espécies) transmitido por ácaros a plantas monocotiledôneas. O genoma é composto por uma molécula de RNA de fita simples, sentido positivo. Ex.: "ryegrass mosaic virus". Comparação de dados da seqüência de nucleotídeos deste gênero sugere que ele é composto de pelo menos dois grupos distintos, por este fato há uma proposta de dividi-lo em gênero *Rymovirus* e *Whestrevirus*.

3) gênero *Bymovirus* (6 espécies), transmitido por fungos a plantas monocotiledôneas. O genoma é composto por duas moléculas de RNA de fita simples, sentido positivo. Ex: "barley yellow mosaic virus".

Os dois gêneros ainda não reconhecidos pelo ICTV são:

4) gênero *Ipomovirus*, transmitido por moscas brancas. Ex.: “sweet potato mild mottle virus”.

5) gênero *Macluravirus*. Ex.: “maclura mosaic virus” (Berger *et al*, 1997; Gibbs and Mackenzie, 1997).

A maioria dos potyvirus possui uma gama de hospedeiras, naturais e experimentais, restrita a espécies dentro de um gênero ou gêneros relacionados. Entretanto, embora a gama de hospedeiros de cada vírus individualmente seja restrita, os membros da família *Potyviridae* têm capacidade de infectar espécies de 81 famílias botânicas, incluindo mono e dicotiledôneas (Brunt *et al.*, 1996). Vários vírus da família *Potyviridae* infecta leguminosa, sendo responsáveis por perdas significativas nos cultivos destas espécies vegetais.

As espécies cultivadas pertencentes à família *Leguminosae* apresentam numerosas doenças de etiologia viral, algumas delas chegando a ser fatores limitantes da atividade agrícola. Tomando como exemplo feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja (*Glycine max* Merrill.), as duas leguminosas de maior importância na agricultura brasileira, têm sido descritas mais de vinte viroses do feijoeiro (Costa, 1987) e doze em soja (Almeida, 1994). Dez das viroses descritas em feijoeiro são causadas por *Potyvirus* (Kitajima, 1995).

O gênero *Crotalaria* faz parte da família *Leguminosae*; compreende mais de 350 espécies localizadas nos trópicos e sub-trópicos em ambos os hemisférios; muitas são herbáceas, anuais ou perenes, havendo também espécies arbustivas. As flores geralmente são amarelas, às vezes estriadas com vermelho, dispostas em ráceros vistosos (Cook & White, 1996). O nome crotalária se refere ao som do chocalho das vagens secas semelhante ao da cascavel (*Crotalus sp*). O principal uso desta planta é na adubação verde e como cobertura de solo por serem plantas pouco

exigentes e com grande potencial de fixação biológica de nitrogênio. Também são utilizadas como forrageiras, para a fabricação de papel, cordas, sacos, tapetes e cestas. Algumas espécies são utilizadas como medicinais para tratamento de doenças de pele, embora algumas espécies sejam tóxicas, portadoras de alcalóides, das quais *C. spectabilis* é citada como a mais tóxica. Se ingerida, esta espécie pode causar problemas hepáticos fatais (Cook & White, 1996; Rizzini & Mors, 1995; Russell *et al*, 1997).

Vírus de vários grupos ou famílias infectam espécies de *Crotalaria*, como por exemplo *Bromovirus*, *Carlavirus*, *Ilarvirus*, *Nepovirus*, *Potexvirus* e *Potyviridae* (Brunt *et al.*, 1996). *Potyvirus* descritos como capazes de infectar diversas espécies de *Crotalaria* estão listados na tabela 1 (Brunt *et al.*, 1996; Gioria & Rezende, 1996).

Tabela 1. *Potyvirus* que infectam espécies de *Crotalaria*

Vírus	Espécies de <i>Crotalaria</i>				
	<i>C. spectabilis</i>	<i>C. retusa</i>	<i>C. juncea</i>	<i>C. medicaginea</i>	<i>C. striata</i>
mosaico comum do feijoeiro BCMV	+			+	
"cassia yellow spot virus" CYSV	+		+		
mosaico dourado do feijoeiro BYMV	+	+			
"clover yellow vein virus" CYMV	+				
"passiflora ringspot virus" PRV		+			
vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (passionfruit woodiness virus) PWV			+		+
"peper veinal motle virus" PVMV	+				
vírus do mosaico da soja SMV	+				
"watermelon mosaic virus-2 WMV-2"	+				
"wisteria vein mosaic virus" WVMV	+				

+ espécies susceptíveis.

No Brasil tem sido relatada também a ocorrência de infecção natural por um *Tobamovirus* (COSTA *et al.*, 1988), e mais recentemente pelo *Potyvirus*, objeto do presente estudo, que vem sendo denominado vírus do mosaico da crotalária (VMCr), (Freitas & Vega, 1997).

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral caracterizar um *Potyvirus* encontrado infectando, em condições naturais, *Crotalaria juncea*, *C. paulina* e *C. zanzibarica*.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

1. Estabelecer o círculo de hospedeiras
2. Avaliar as formas de transmissão
3. Identificar os insetos vetores
4. Estabelecer as propriedades *in vitro*
5. Caracterizar a citopatologia visível ao microscópio de luz e eletrônico
6. Comparar através de serologia com diversos anti-soros
7. Determinar a massa molecular da proteína capsidial

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Material de estudo

O vírus em estudo foi encontrado infectando naturalmente plantas de *Crotalaria juncea*, *C. paulina* e *C. zanzibarica*, cultivadas no canteiro do Departamento de Fisiologia Vegetal, UNICAMP. A manutenção do vírus foi realizada por sucessivas inoculações mecânicas em plantas de *C. zanzibarica*, as quais eram mantidas em casa de vegetação do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP e no CENFIT/IAC (Centro de Fitossanidade / Instituto Agrônomo de Campinas). As plantas foram cultivadas em vasos com terra mantendo, no máximo, duas plantas em cada.

2. Transmissão do vírus

2.1. Inoculação mecânica

A inoculação mecânica foi realizada utilizando-se folhas de plantas infectadas maceradas em almofariz com tampão fosfato 20mM, pH 7,0, acrescido de sulfito de sódio 20mM, na proporção 1:10 (grama de folha/mL de tecido), obtendo-se um extrato vegetal. As folhas a serem inoculadas foram previamente polvilhadas com carborundo, posteriormente o extrato vegetal foi espalhado manualmente e, finalmente, lavou-se as folhas inoculadas com água para retirar o excesso do abrasivo e do inóculo.

A determinação do círculo de hospedeiras foi realizada inoculando-se as plantas mecanicamente. Como fonte de inóculo utilizaram-se folhas de *C. zanzibarica*. Foram testadas 58 espécies e cultivares; as plantas a serem inoculadas tinham uma a duas semanas de germinação e as folhas escolhidas para inoculação geralmente eram as cotiledonares ou as primárias. Foram realizadas oito repetições e duas testemunhas sem inoculação, para cada espécie ou cultivar teste, as quais estão listadas na tabela 4.

2.2. Inoculação mecânica com lâmina cortante

Tentou-se a transmissão mecânica do vírus utilizando-se lâmina cortante contaminada; método semelhante ao utilizado por Pozzer *et al* (1995). Folhas de *C. zanzibarica* infectadas foram cortadas previamente, passando por algumas vezes a lâmina na folha da planta infectada, provocando ranhuras. Em seguida foram realizados cortes em plantas de *C. juncea* sadias, também provocando ranhuras, para a transmissão do vírus. Foram utilizados três métodos e 20 plantas teste para cada um:

- a) 2 cortes em 2 folhas novas;
- b) 2 cortes nas folhas cotiledonares;
- c) 2 cortes em 2 folhas novas e 2 cortes nas folhas cotiledonares.

2.3. Transmissão por afídeos

Os testes de transmissão por afídeos foram realizados no CENFIT/IAC, seguindo o método utilizado por Vega *et al* (1995). Três espécies de afídeos criadas

no CENFIT/IAC foram testadas para a transmissão do VMCr: *Aphis gossypii* Glover, mantido em plantas de algodão; *Myzus persicae* Sulz, mantido em plantas de pimentão; *Myzus nicotianae* Blackman, mantidos em plantas de fumo. As plantas testes utilizadas foram *C. juncea*, *C. paulina*, e feijão 'Preto G-2'.

Os afídeos foram retirados das plantas com o auxílio de um pincel (pêlo de marta, nº 1) e mantidos em jejum por uma hora; o período de acesso à aquisição (p.a.a.) foi de 10 a 15 minutos em folhas de *C. zanzibarica* infectada e depois 5 pulgões foram transferidos, com pincel, para cada uma das plantas. Os pulgões permaneceram por um período de acesso a inoculação (p.a.i.) de 24h (as plantas controles receberam afídeos alimentados em *C. zanzibarica* sadia) e, em seguida, pulverizados com inseticida em casa de vegetação. A avaliação foi realizada contando o número de plantas com sintomas após uma semana de inoculação, no caso de feijão 'Preto G-2', e 30 dias, para as crotalárias.

2.3.1. Eficiência na transmissão por *Myzus persicae*

O teste de verificação da eficiência da transmissão por afídeos foi realizado utilizando um número determinado de afídeos que foram transferidos com pincel para *C. paulina* e *C. juncea*. A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 2.3. Cada planta teste recebeu 1, 5 ou 10 afídeos. Após 24 horas, os afídeos foram mortos por pulverização com inseticida. A avaliação foi realizada contando o número de plantas com sintomas 30 dias após a inoculação.

2.4. Transmissão por sementes

Coletou-se sementes provenientes de plantas infectadas com o VMCr utilizadas no círculo de hospedeiras. As sementes foram semeadas em vermiculita para verificar a possível transmissão do vírus pela semente. O transplante para vaso contendo terra ocorreu cerca de duas semanas após a germinação. Foram cultivadas duas plantas por vaso. Avaliações semanais foram feitas observando-se visualmente a presença ou não de sintomas, durante dois meses após a germinação. As espécies utilizadas estão listadas na tabela 3.

2.5. Transmissão pela raiz

Tentou-se a transmissão do vírus através da raiz utilizando plantas de feijão 'Preto G-2' e 'BT-2' com duas semanas de germinação, cultivadas em vermiculita, recebendo solução nutritiva duas vezes por semanas. Este método foi uma adaptação do método utilizado por Pozzer *et al* (1995). Utilizou-se o extrato normal de inoculação (folhas de *C. zanzibarica* macerada em tampão fosfato 20mM, pH 7,0, acrescido de sulfito de sódio 20mM). As plantas testes tiveram as raízes mergulhadas no extrato de inoculação e logo em seguida foram transplantadas para a vermiculita; em um outro teste, as plantas tiveram as pontas das raízes cortadas, mergulhadas no extrato e foram logo em seguida transplantadas para a vermiculita.

2.6. Efeito de infecção em diferentes estádios de desenvolvimento de feijão 'Preto G-2' e 'BT-2'

Na tentativa de obter sementes de plantas infectadas de feijão 'Preto G-2' ou 'BT-2' e avaliar o efeito de infecção tardia, foram inoculadas plantas em diferentes estádios de desenvolvimento: a) inoculadas durante o florescimento, b) no estágio de formação de vagens c) em fase de enchimento dos grãos. A inoculação mecânica, como descrito em 2.1., foi aplicada nas folhas mais velhas, próximas à base da haste (primeiro ou segundo par foliar).

3. Propriedade do vírus *in vitro*

3.1. Inativação térmica

Para o teste de inativação térmica foram utilizadas folhas de *Crotalaria zanzibarica* infectadas, maceradas com tampão fosfato 20mM, pH 7,0, acrescido de sulfito de sódio, na proporção de 1:10 (grama de tecido /mL de tampão). O extrato obtido foi colocado em béqueres em alíquotas de iguais quantidades e, estes, submetidos, em banho-maria a temperatura constante pré-determinada, por 10 minutos. Em seguida, plantas de feijão 'Preto G-2' foram inoculadas com esse extrato.

As temperaturas empregadas variaram de 50 a 75°C, com intervalos de 5°C. O extrato a temperatura ambiente, de aproximadamente 25°C, foi utilizado como controle para verificar a infectividade inicial e final do extrato. Antes de aquecer o primeiro extrato, inoculou-se 10 plantas com extrato na temperatura ambiente; e 10

plantas no final do teste, com o mesmo extrato, que serviram como controle. Para cada temperatura foram utilizadas 10 plantas testes; repetindo 3 vezes este experimento. A avaliação foi realizada contando-se o número de plantas infectadas 10 dias após a inoculação.

3.2. Longevidade *in vitro*

A longevidade *in vitro* foi verificada utilizando-se folhas de *Crotalaria zanzibarica* como fonte de inóculo. Os testes realizados compararam dois meios para preparação do extrato: 1) extração em água destilada e 2) extração em tampão fosfato 20mM, pH 7,0 contendo 20 mM de sulfito de sódio. Ambos os meios de extração foram utilizados na proporção de 10 mL por grama de tecido; os testes com cada meio de extração foram repetidos pelo menos três vezes, utilizando-se plantas de feijão 'Preto G-2' como plantas testes. As plantas testes foram inoculadas mecanicamente após o polvilhamento com carborundo, sendo a primeira inoculação logo após o preparo do extrato (tempo 0) e as inoculações subsequentes após 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas, e a cada 24 h depois do primeiro dia, até 8 dias (192 horas). Para cada método de extração e tempo de inoculação utilizaram-se 10 plantas testes; repetindo 3 vezes este experimento. A infectividade do extrato foi avaliada cotando-se o número de plantas que manifestaram sintomas típicos da infecção viral após 10 dias da inoculação.

3.3. Ponto final de diluição

Folhas de *C. zanzibarica* infectada foram maceradas em tampão fosfato 20mM, pH 7,0 contendo de 20 mM de sulfito de sódio, na proporção 1:10 (grama de tecido/mL de tampão). Uma alíquota do extrato preparado 1:10 foi separada e diluída em várias outras alíquotas na proporção de 1:100, 1:1.000, 1:10.000 e 1:100.000. Foram inoculadas mecanicamente 10 plantas de feijão 'Preto G-2' para cada diluição, repetindo 3 vezes este experimento. A avaliação foi realizada contando-se o número de plantas com sintomas após 10 dias de inoculação.

4. Purificação

A purificação baseou-se nos métodos utilizados por Chen & Chang (1998) e Marinho & Kitajima (1988) com algumas modificações. Folhas de *C. zanzibarica* infectadas com VMCr (232,8g) foram trituradas em liquidificador, com tampão fosfato 0,2M, pH 7,3, contendo 0,01M de EDTA e 0,2% de 2-ME (1g de folha/2mL tampão). O extrato foi filtrado com gaze, centrifugado a 5.000 rpm por 20min e a seguir, adicionado 1% de Triton X-100 ao sobrenadante. Após agitação lenta por 2 horas a 4°C foi centrifugado a 2.000 rpm por 20 minutos. No sobrenadante foi acrescentado 8% de poli-etileno glicol (PEG 6000). Após 1h a 4°C com agitação, foi centrifugado a 8.000 rpm por 10min, recuperado o precipitado, dissolvido em tampão fosfato 0,1M, pH 7,0, contendo EDTA 0,01M e agitado durante a noite a 4°C. Após centrifugar a 29.500 rpm por 1h, o precipitado foi novamente dissolvido em tampão fosfato 0,1M, pH 7,0 contendo EDTA 0,01M e centrifugado a 3.000 rpm por 10min. O sobrenadante foi utilizado para exame de microscopia eletrônica e analisado o

com tampão fosfato 0,05M, pH 7,2 contendo 0,8% de NaCl e 0,05% de Tween 20 (PBS-T). Para evitar a adsorção inespecífica foi feito bloqueio com 2% de leite desnatado em PBS, por 30 min seguido de lavagem com PBS-T. A seguir adicionou-se 100 µL do anti-soro (1:1.000), incubando a placa por 1 hora a 37°C e, após nova lavagem, foi adicionado o conjugado de anticorpos anti-IgG de coelho com fosfatase alcalina (Anti-Rabbit Alkaline Phosphatase conjugate, ARAP, Sigma) diluído 1:10.000 em tampão PBS. Após 1 hora a 37°C a placa foi lavada com PBS-T por três vezes e finalmente adicionou-se o substrato PNPP (para-nitrophenyl-phosphate) diluído em tampão dietanolamina pH 9,8 (0,6 mg/mL). A absorbância a 405nm foi registrada após 30min de incubação em temperatura ambiente.

5.1.2. DAS-ELISA

Para o teste de DAS-ELISA a metodologia utilizada foi semelhante a descrita por Clark & Adams (1976).

A placa de ELISA foi coberta com anticorpos policlonais (IgG, imunoglobulina G) contra o vírus Y da batata diluídos 1:3000 em tampão carbonato pH 9,6. Após incubação "overnight" a 4° C, procedeu-se a lavagem com PBS-T.

As amostras foram maceradas separadamente em almofariz adicionando-se tampão carbonato; 100 µL do extrato obtido de cada planta foram aplicados em cada poço da placa de ELISA e incubadas "overnight" a 4°C e posteriormente lavadas com PBS-T por 5 vezes. A seguir foi aplicado conjugado de anticorpo anti-PVY com fosfatase alcalina, diluído em tampão, incubado "overnight" a 4°C, seguido de lavagem com PBS-T. Finalmente foi adicionado o substrato PNPP diluído em solução

tampão dietanolamina pH 9,8 e as placas mantidas a temperatura ambiente, registrando a absorbância a 405nm após 1h e 30min de incubação.

5.2. Western Blot

Para determinar a massa aproximada da proteína capsidial do vírus em estudo foi utilizado o sistema de eletroforese Miniprotean II, BioRad, utilizando gel de poliacrilamida 12%, contendo dodecil sulfato de sódio, SDS (sodium dodecil sulfate).

As amostras contendo extrato proteico total de plantas de *C. zanzibarica* sadia e infectada com VMCr, maracujá inoculado com VMCr ou infectado com PWV e sadio e partículas de VMCr purificadas, foram preparadas em tampão de amostra (TRIS 0,125M, pH6,8 contendo 0,5% de bromofenol, 45% de glicerol, 5% de 2-ME e 10% de SDS, esta concentração foi diluída três vezes), fervidas por 5min em banho-maria e centrifugadas a 5000 rpm/5min. Tais amostras (10µL de amostra/poço) foram submetidas a uma corrente de 60 Volts por, aproximadamente, 2h. Utilizando-se um aparelho Multiphos Novablot (LKB), os géis foram transferidos para membranas de nylon ou nitrocelulose a 0,8 mA/cm² de membrana; posteriormente realizou-se a reação serológica.

Para a localização serológica a membrana foi lavada em "Tris-buffered saline" 100mM, pH 7,5 e 0,9% de NaCl, contendo 0,05% de Tween (TBS-Tween), bloqueada com 5% de leite em pó desnatado diluído em TBS-tween, por 1h, a temperatura ambiente. Adicionou-se a seguir o anticorpo diluído 1:1000 em TBS-tween acrescido de 5% de leite em pó desnatado e incubou-se por 1h a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas novamente com TBS-tween (três vezes/15 min.) e em seguida adicionou-se o conjugado (Anti-Rabbit- Alkaline Phosfatase,

ARAP) diluído em TBS-tween acrescido de 5% de leite em pó desnatado. Após incubação de 1h, as membranas foram lavadas e adicionado o substrato para a fosfatase alcalina. Dois tipos de substratos foram usados em diferentes experimentos: a) NBT/BCIP (Nitro Blue Tetrazolium/ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) para localização direta na membrana, e b) substrato bioluminescente CSPD (Disodium - 3 - (4 - methoxyspiro { 1,2 – dietane 3,2 - (5' - chloro) tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decan} – 4 - yl) phenylphosphate) diluído 1:2000, para localização em filme fotográfico.

6. Microscopia Eletrônica

6.1. Microscopia Eletrônica de Cortes de Tecidos

Amostras de folhas de plantas saudáveis e infectadas pelo VMCr foram preparadas para observação ao microscópio eletrônico. O método utilizado foi semelhante ao descrito por Vega *et al* (1997).

Amostras de plantas foram cortadas e imersas imediatamente no fixador de Karnovsky modificado (paraformaldeído 4% em tampão cacodilato 0,2 M, pH 7,2 acrescido de Ca/Mg 0,05 M e glutaraldeído 2,5%); depois submetidas a sessões de vácuo leve e levadas para geladeira por 2 horas. Após a primeira fixação o material foi lavado várias vezes em solução de sacarose 3% em tampão cacodilato 0,05M. Para a pós-fixação foi utilizado tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05M, pH 7,2 e 1,5% de sacarose; e as amostras permaneceram “overnight” em geladeira.

No dia seguinte o material foi lavado com água destilada várias vezes. A contrastação *in bloco* foi feita com acetato de uranila 2% em água; onde as amostras

permaneceram por 2h ao abrigo de luz, em geladeira. Depois efetuou-se lavagens com água destilada e as amostras permaneceram em água destilada em geladeira até serem desidratadas. O material foi desidratado com acetona.

Para a inclusão, o material ficou imerso em resina Epon diluída em acetona (1:1) "overnight". Após a inclusão o material foi colocado em forma apropriada para emblocamento, coberta com a resina, permanecendo "overnight" em temperatura ambiente e a seguir 48 horas na estufa a 65 °C.

Os blocos foram preparados para a realização dos cortes no ultra-micrótomo e os cortes ultra-finos foram colocados em grades de 100 mesh, cobertas com parlodium/carbono para observação ao microscópio eletrônico.

6.2. Microscopia Eletrônica Imuno-adsorção

O método utilizado para este experimento foi semelhante ao utilizado por Vega *et al* (1995). Grades de 300 mesh, cobertas com Formvar e carbono foram incubadas com anti-soro para PWV diluído 1:1000. Após 30 minutos as grades foram lavadas com tampão PBS e incubadas por 30 minutos com extrato de folhas infectadas, moídas em tampão fosfato. A última lavagem foi realizada com água destilada e em seguida as grades foram coradas com acetato de uranila 1% diluído em água.

7. Microscopia de Luz

Para observação de inclusões induzidas pelo vírus foi utilizado o método descrito por Christie & Edwardson (1986) com algumas modificações. Amostras da epiderme foram cuidadosamente retiradas, tratadas com 5% de Triton X-100 por 5 minutos, coradas com Luxol brilliant green (1% em 2-methoxyethanol) por 10 minutos, em seguida foram realizadas três lavagens rápidas em álcool 95% e montadas em glicerina.

RESULTADOS

1. Transmissão do vírus

1.1. Transmissão mecânica

A taxa de transmissão mecânica do vírus em plantas de crotalária variou em média de 75% em *C. paulina* e 80% em *C. juncea* e *C. zanzibarica*. Foram inoculadas vinte plantas de cada espécie. A planta escolhida para manutenção do inóculo foi *C. zanzibarica* por ser arbustiva e farta de folhas.

1.2. Transmissão por afídeos

Foram realizados dois testes de transmissão por afídeos com resultados praticamente idênticos. No primeiro foram utilizados afídeos da espécie *M. nicotianae* e *C. juncea* como planta teste, obtendo-se 50% de transmissão. No segundo experimento foram utilizadas as espécies de afídeo *A. gossypii* e *M. persicae*, e feijão 'Preto G-2' como planta teste, e o resultado obtido foi semelhante ao anterior (Tabela 2).

Tabela 2. Transmissão do VMCr por afídeos em Feijão 'Preto G-2' e em *C. juncea*.

Planta	Espécie de afídeo	nº de plantas infectadas	total de plantas utilizadas	% de transmissão
<i>C. juncea</i>	<i>M. nicotianae</i>	13	26	50
Feijão 'Preto G-2'	<i>Aphis gossypii</i>	9	16	56
	<i>Myzus persicae</i>	9	16	56

1.2.1. Eficiência da transmissão por *Myzus persicae*

A transmissão do VMCr por *M. persicae* para *C. juncea* foi um pouco mais eficiente, alcançando cerca de 60% de transmissão quando utilizado 5 e 10 afídeos; ao passo que usando *C. paulina* como planta teste foi obtido cerca de 50% de transmissão com a mesma quantidade de afídeos. A taxa de eficiência na transmissão do vírus foi nula em *C. paulina* e baixa em *C. juncea*, quando utilizou-se um pulgão por planta; ficou estabilizada em torno de 60%, quando o número de afídeos por planta foi 5 e 10 (fig. 1).

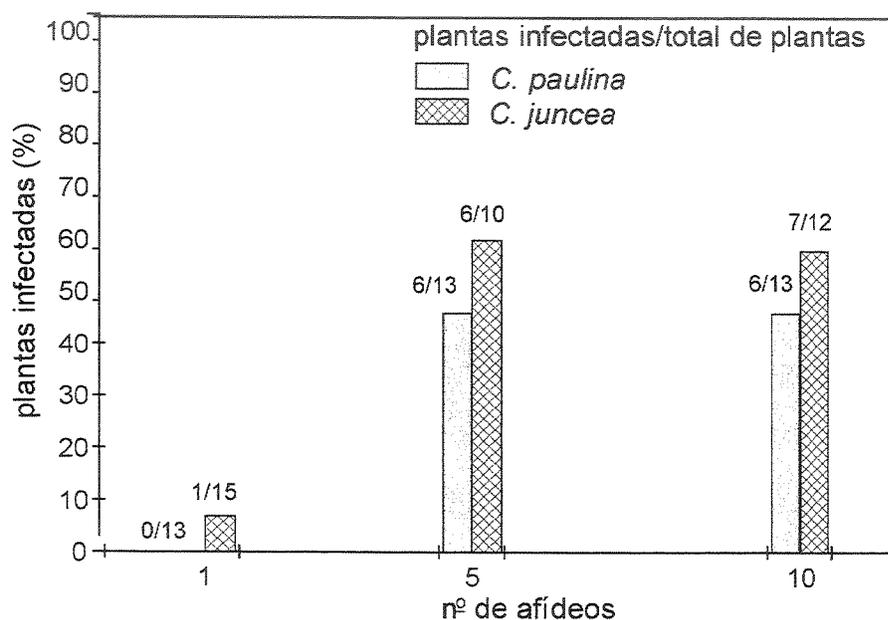


Figura 1. Transmissão do VMCr por *M. persicae* em duas espécies de crotalária.

1.3. Inoculação mecânica com lâmina cortante

Essa forma de inoculação mostrou-se pouco eficiente: apenas 10% das 20 plantas inoculadas no tratamento "C" (2 cortes em 2 folhas novas e 2 cortes nas folhas cotiledonares) foram infectadas.

1.4. Transmissão por sementes

Nenhuma das plantas apresentou sintomas típicos da infecção causada pelo vírus em estudo, indicando que não há transmissão pela semente nas espécies testadas (Tabela 3).

Tabela 3. Testes de transmissão do VMCr por sementes

Planta testada	Número de sementes	número de sementes germinadas	Observação de Sintomas do VMCr
<i>Crotalaria juncea</i>	62	58	não
<i>C. depauperata</i>	406	386	não
<i>C. paulina</i>	587	564	não
<i>C. pilosa</i>	55	54	não
<i>C. striata</i>	400	375	não
<i>C. zanzibarica</i>	512	463	não
<i>Phasaelus lunatus</i>	157	154	não
* <i>P. vulgaris</i> BT-2	72	55	não
<i>P. vulgaris</i> Jalo	50	50	não
* <i>P. vulgaris</i> Preto G-2	117	106	não
<i>P. vulgaris</i> Rosinha Precoce	30	30	não
<i>Cassia occidentalis</i>	15	15	não

*Plantas inoculadas na fase de formação da vagem ou de enchimento dos grãos.

1.5. Transmissão pela raiz

Nenhum dos dois cultivares inoculados, feijão 'Preto G-2' e 'BT-2', apresentaram transmissão pela raiz.

2. Círculo de hospedeiras

Verificou-se que a infecção ficou restrita apenas à família Leguminosae; das oito famílias, as quais pertenciam as espécies e variedades testadas, apenas nesta observou-se plantas com infecção provocada pelo VMCr. O sintoma apresentado pela maioria das plantas infectadas foi mosaico, mas dentro da mesma espécie, no caso de feijão, os sintomas variaram (Tabela 4). As respostas das variedades de feijão 'Preto G-2' e 'Rosinha G-2' foram as mais severas observadas: quando plantas jovens foram inoculadas (7 a 10 dias após a germinação), lesões locais necróticas apareceram cerca de cinco dias após a inoculação. A seguir ocorreu necrose sistêmica seguida de morte da planta, por volta de dez dias após a inoculação (Fig. 2). Quando inoculadas mais tarde (duas semanas após germinação) plantas de feijão 'Preto G-2' apresentaram deformações e rachaduras na haste, além dos sintomas descritos acima e a morte da planta ocorria cerca de quinze dias após a inoculação (Fig. 3).

Outra variedade comercial que apresentou sintomatologia bastante característica foi feijão BT-2. Plantas desta variedade quando inoculadas jovens (7 a 10 dias após semeadura) apresentam malformação das folhas, mosaico e nanismo cerca de cinco dias após a inoculação, mas não ocorreu necrose apical nem morte da planta (Fig.

4). Embora tenha sido observada brotações axilares, que apresentavam forte deformação foliar e não houve produção de flores nem frutos.

Tabela 4. Sintomas observados nas espécies inoculadas mecanicamente com o vírus do mosaico da crotalária.

Família	Nome científico	*sintomas
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i>	-
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	-
Compositae	<i>Acanthospermum hispidum</i>	-
Cucurbitacea	<i>Cucurbita pepo</i> 'Caserta'	-
Graminae	<i>Zea mays</i>	-
	<i>Sorghum vulgare</i>	-
Leguminoseae	<i>Cassia occidentalis</i> (Fig. 5)	M, DF, MB
	<i>Canavalia ensiformis</i>	M, DF, MB
	<i>C. brasiliensis</i>	M, DF, MB
	<i>Cajanus cajan</i>	-
	<i>Crotalaria juncea</i> (Fig. 6)	M
	<i>C. juncea</i> IAC-1.	M
	<i>C. juncea</i> IAC-1-2	M
	<i>C. depauperata</i> (Fig. 7)	M
	<i>C. lanceolata</i> (Fig. 8)	M
	<i>C. ochroleuca</i>	M
	<i>C. ortoptera</i>	M, Na
	<i>C. paulina</i>	M
	<i>C. pilosa</i>	M
	<i>C. spectabilis</i>	M
	<i>C. striata</i>	M
	<i>C. zanzibarica</i> (Fig. 9)	M
	<i>Glycine wightii</i>	-
	<i>G. max</i> 'Santa Rosa'	-
	<i>Lupinus albus</i> (Branco)	M, MP
	<i>L. albus</i> (Branco Amargo)	M, Mu; -S
	<i>L. angustifolius</i>	Na; -S
	<i>Macroptilium atropurpureus</i>	NA; R; M
	<i>Phaseolus Lunatus</i>	M
	<i>P. vulgaris</i> 'Aetê'	-
	'Aroana'	-
	'Aruã'	-
	'Bico de Ouro Precoce'	-
	'Bolinha'	-
	'BT-2'	DF, M, Na, -S
	'Carioca Aruã'	-
'Carioca 80'	-	

Família	Nome científico	Sintomas observados
Leguminoseae	'Catu'	-
	'Jalo'	M
	'Manteiga'	-
	'Maravilha'	-
	'Moruna 80'	-
	'Preto G-2'	LLN, NS, NA, MP
	'Rosinha Precoce'	LL
	'Rosinha G-2'	LLN, NS, NA, MP
	<i>Pueraria javanica</i>	-
	<i>Vigna mungo</i>	-
	<i>Sesamum indicum</i>	M, DF, NA, MP
	<i>Vicia villosa</i>	-
Solanaceae	<i>Datura metel</i>	-
	<i>D. stramonim</i>	-
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	-
	'Santa Cruz'	-
	'Angela'	-
	'Caqui Gigante'	-
	<i>Nicotiana tabacum</i> 'Turkish'-NN	-
	<i>N. glutinosa</i>	-
<i>Physalis floridana</i>	-	
Passifloraceae	<i>Passiflora edulis</i>	-

- = ausência de sintomas

LLn = lesão local necrótica

MB = mosaico com bolhas

Mu = murcha

NA = necrose apical

R = rebrotamento axilar

DF = deformação foliar

M = mosaico

MP = morte da planta

Na = nanismo

NS= necrose sistêmica

-S = planta não produz sementes nem frutos.

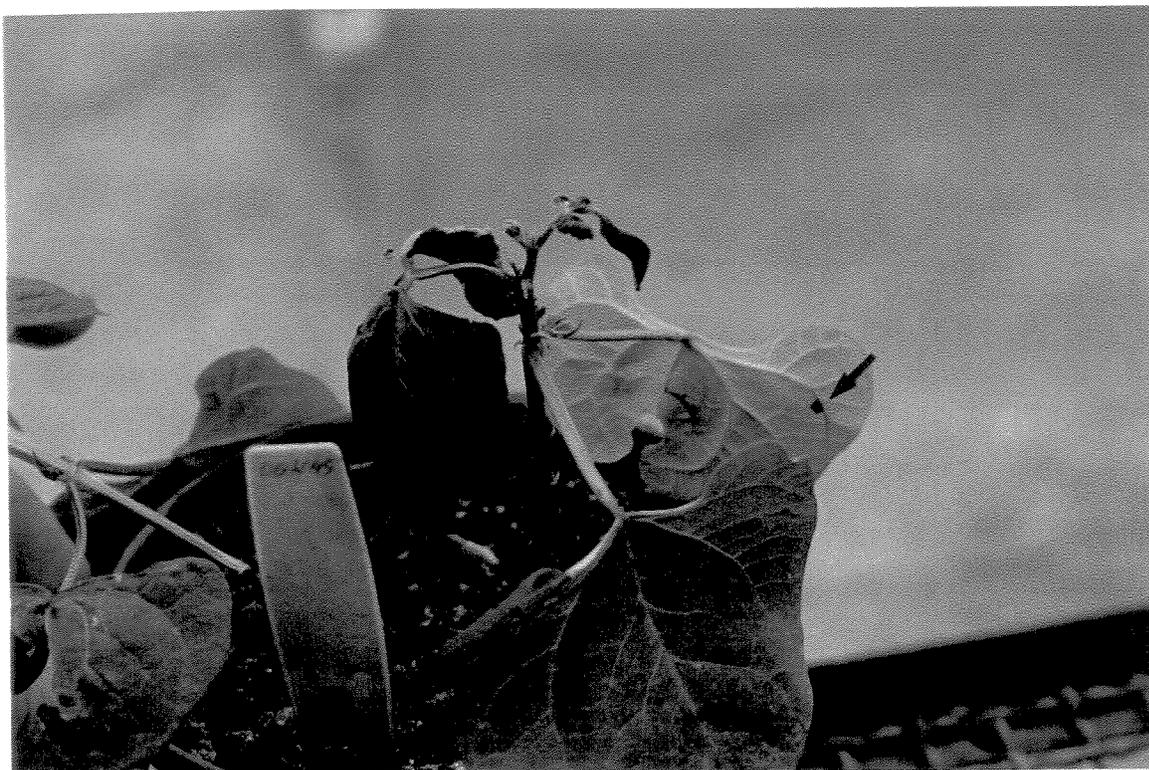


Figura 2 – *P. vulgaris* 'Preto G-2' - planta inoculada uma semana após a germinação. Lesão necrótica local (seta) e início da necrose sistêmica, 5 dias após a inoculação.



Figura 3 - *Phaseolus vulgaris* 'Preto G-2' - Planta inoculada 2 semanas após a germinação mostrando necrose sistêmica e morte do broto apical após 1 semana de inoculação.



Figura 4 - *Phaseolus vulgaris* 'BT-2' mostrando sintoma de nanismo, atrofia foliar e mosaico após 2 semanas de inoculação.



Figura 5 – Sintomas de mosaico com deformação foliar induzidos pelo VMCR em *Cassia occidentalis* após 1 mês da inoculação.

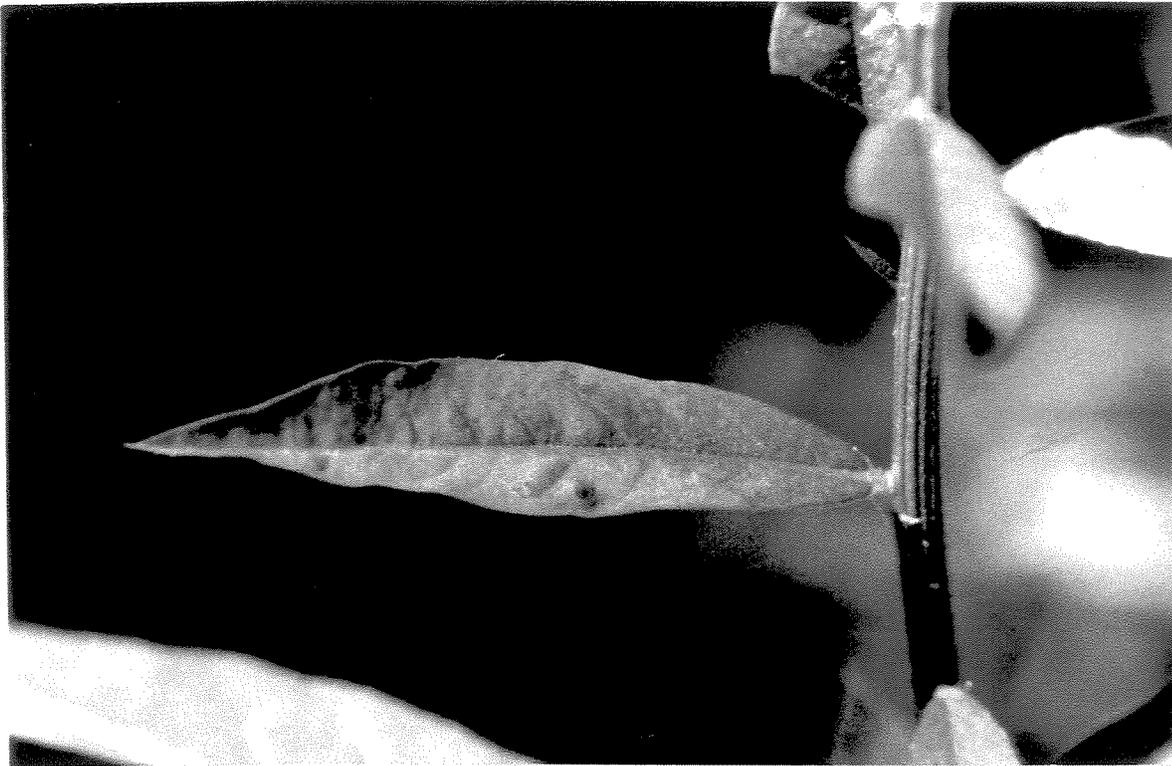


Figura 6 - Mosaico com "bolhas" em *Crotalaria juncea* após 1 mês da inoculação.

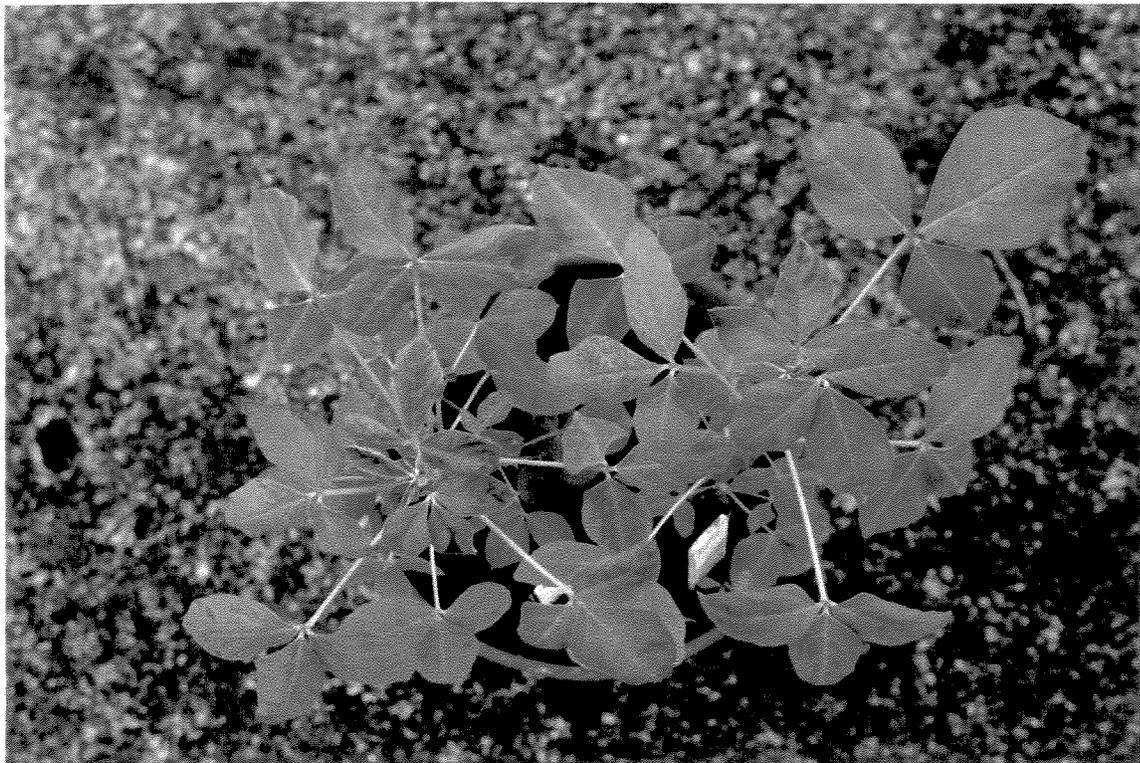


Figura 7 - Mosaico induzido pelo VMCr em *Crotalaria depauperata*.

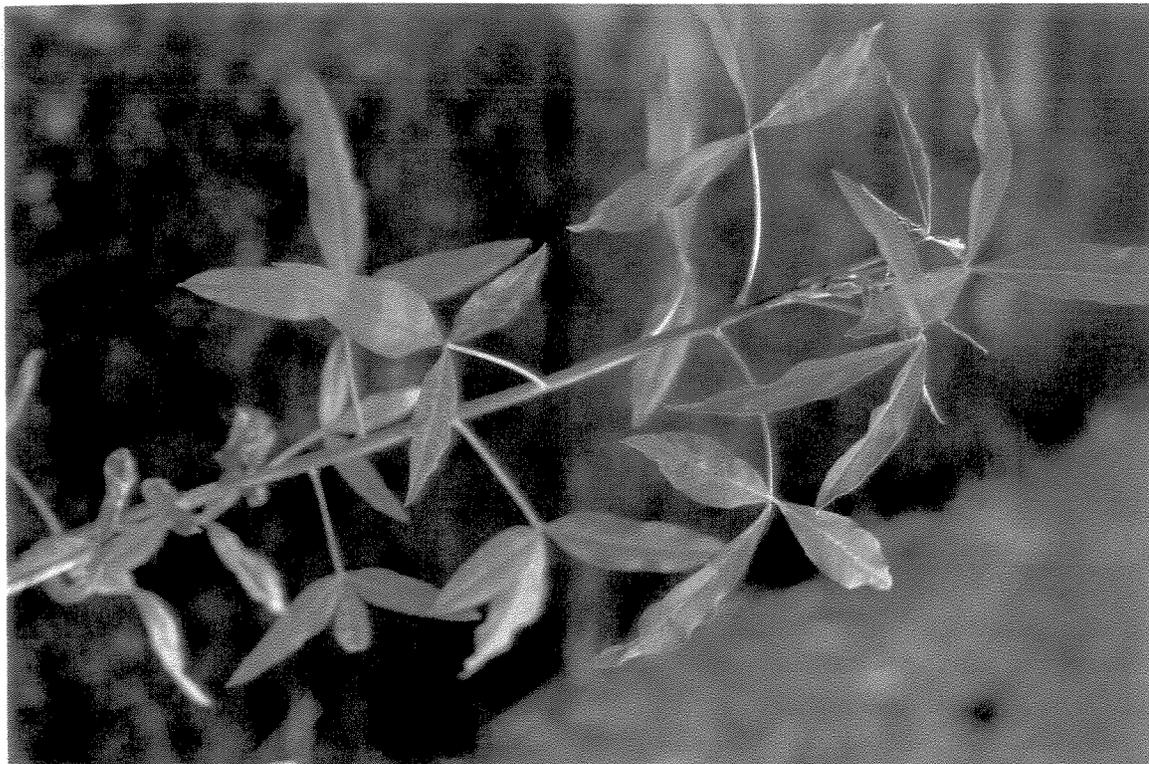


Figura 8 - Sintoma de mosaico observado em *Crotalaria lanceolata* infectada naturalmente pelo VMCr.



Figura 9 - Mosaico induzido por infecção natural de VMCr em *Crotalaria zanzibarica*.

3. Efeito da infecção em diferentes estágios de desenvolvimento de feijão 'Preto G-2' e 'BT-2'

Para obter sementes de plantas infectadas de feijão 'Preto G-2' e 'BT-2', foram inoculadas plantas adultas, em fases de floração ou frutificação. Nestas plantas foram observados sintomas diversos que não são visualizados em plantas inoculadas na fase juvenil (tabelas 5 e 6).

Tabela 5. Evolução de sintomas de feijão 'Preto G-2' infectado por VMCr em diferentes fases de desenvolvimento

Fase da Inoculação	Tempo após inoculação		
	5 dias	7 a 8 dias	10 a 15 dias
Florescimento	Lesão local	necrose sistêmica	Planta morta no 15º dia.
Formação das vagens	Lesão local	Necrose sistêmica. Vagem necrosada próxima da folha inoculada.	Vagens mais próximas ao ápice com pontos necróticos e grãos malformados; algumas totalmente necrosadas, nas quais os grãos não desenvolveram. A planta morre no 15º dia.
Enchimento dos grãos	Lesão local	Necrose sistêmica. Vagem necrosada próxima da folha inoculada.	Nas vagens com pontos necróticos os grãos são malformados. Nas vagens necrosadas os grãos não se desenvolvem. Planta morta no 15º dia.

Tabela 6. Evolução de sintomas de feijão 'BT-2' infectado por VMCr em diferentes fases de desenvolvimento

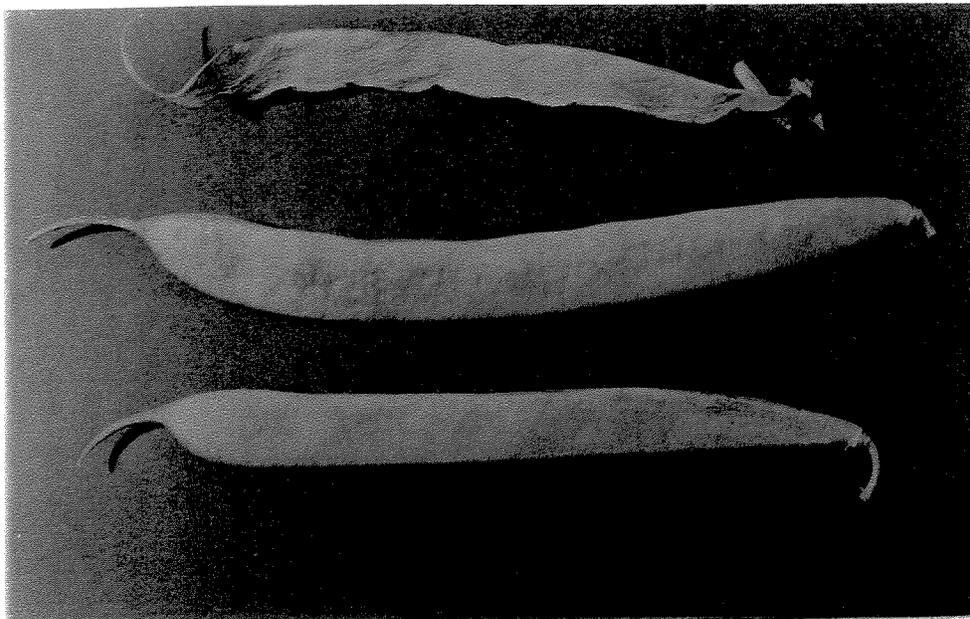
Fase da Inoculação	Tempo após inoculação		
	7 dias	10 dias	15 dias
Florescimento	Deformação foliar, paralisação no desenvolvimento, queda das flores	Queda das folhas mais velhas, malformação dos brotos.	Planta sobrevive malformada e anã. Não ocorre produção de grãos nem formação de vagens.
Formação das vagens	Deformação foliar, paralisação do desenvolvimento	Queda das folhas mais velhas. Vagem próxima ao ponto de inoculação necrosada	Nas vagens necrosadas os grãos não se desenvolvem. Nas vagens com pontos necróticos os grãos são malformados. Planta morta no 15º dia.
Enchimento dos grãos	Deformação foliar, paralisação no desenvolvimento	Queda das folhas mais velhas. Vagem necrosada ou com pontos necróticos.	Nas vagens com pontos necróticos os grãos são malformados. Nas vagens necrosadas, os grãos não se desenvolveram. Planta morta no 15º dia.

Os resultados obtidos nas duas variedades foram semelhantes: as sementes de plantas inoculadas, na fase de formação da vagem e na fase de enchimento dos grãos, não se desenvolviam ou eram malformadas. As vagens próximas ao ponto de inoculação, apresentavam sintomas da infecção mais rápido. O primeiro indício do desenvolvimento da doença nas vagens eram pontos necróticos; seguido de necrose sistêmica. As vagens distante do ponto de inoculação apresentavam pontos necróticos e grãos malformados (Fig. 10).



A

B



C

D

E

Figura 10. Comparação das vagens de feijão 'Preto G-2' sadias e infectadas com VMCr.
A) Vagem sadia. **B)** vagem infectada com o vírus. O grão não se desenvolve.
C) Vagem formada próxima ao ponto de inoculação; **D)** Vagem formada na porção mediana da planta, **E)** Vagem formada longe do ponto de inoculação do vírus na planta.

4. Propriedade do vírus *in vitro*

4.1. Inativação térmica

O extrato manteve estável, em torno de 100% de plantas infectadas, em temperaturas entre 30°C e 45°C. Verificou-se uma queda na infectabilidade a 50°C, mas ainda mantendo alta taxa de transmissão, próxima a 80%. Entre 55 e 60°C, o extrato novamente estabilizou, mas desta vez numa taxa de 10% de transmissão. Em temperaturas acima de 65°C não foi obtida infecção, verificando-se que o ponto de inativação térmica está entre 60 e 65°C (Fig. 11).

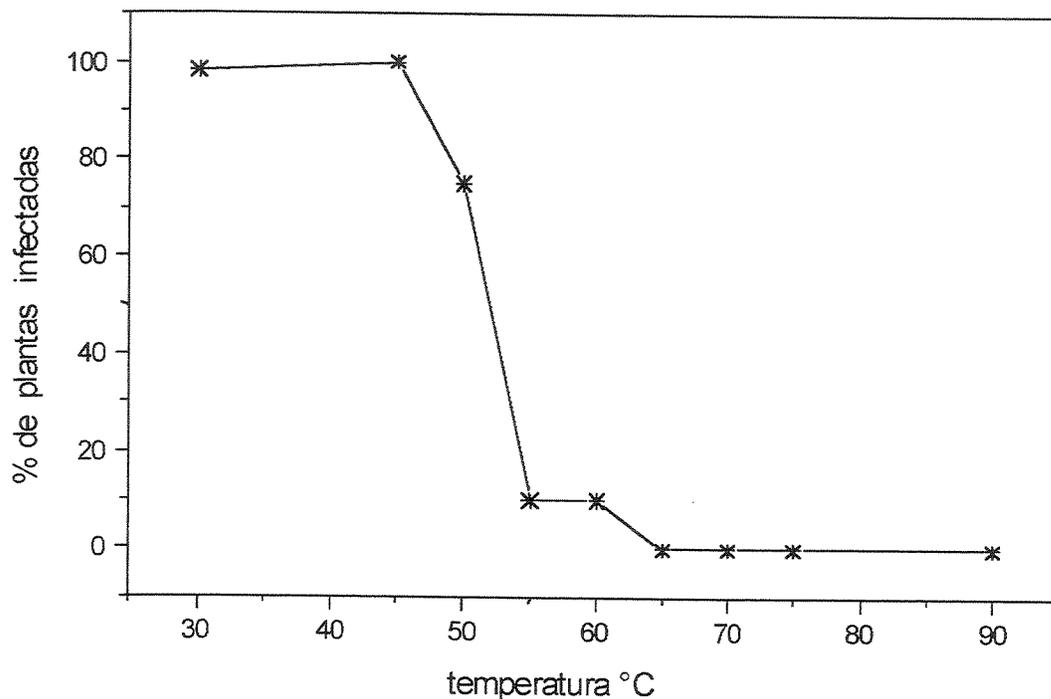


Figura 11 . Inativação térmica – porcentagem de plantas de feijão 'Preto G-2' que apresentaram sintomas após inoculação com extratos de *C. zanzibarica* submetidos a diferentes temperaturas.

4.2. Longevidade *in vitro*

A diferença entre a longevidade do vírus em extrato preparado em tampão e do extrato preparado em água foi significativa: o extrato preparado em tampão foi infectivo entre 96 e 120 horas desde o momento de sua preparação, ao passo que o extrato preparado em água foi infectivo apenas entre 12 e 24 horas, mostrando uma rápida perda da infectibilidade do vírus.

O extrato preparado em tampão permaneceu com uma taxa alta de infectibilidade do vírus, acima de 90%, logo após o seu preparo e na primeira hora. Na segunda e quarta hora houve estabilidade do extrato, mantendo a infectibilidade acima de 70%. Entre 24 e 96 horas também ocorre uma certa estabilidade no extrato, mantendo a taxa de transmissão entre 20 e 10%. Em 120 horas não ocorre mais infecção, indicando que a longevidade *in vitro* deste vírus está entre 96 e 120h (Fig. 12).

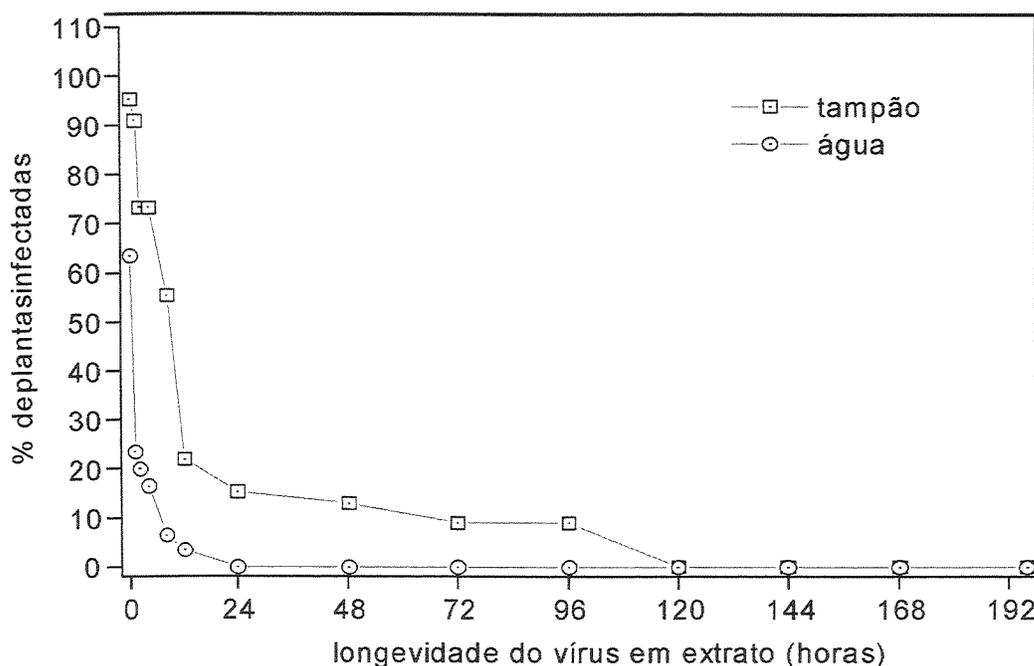


Figura 12. Longevidade *in vitro* do VMCr em extratos de folhas de *C. zanzibarica* preparados com água ou com tampão.

4.3. Ponto final de diluição

Na figura 13 pode-se observar que houve infectividade em extrato diluído até 1/10.000, mas não quando diluído 1/100.000.

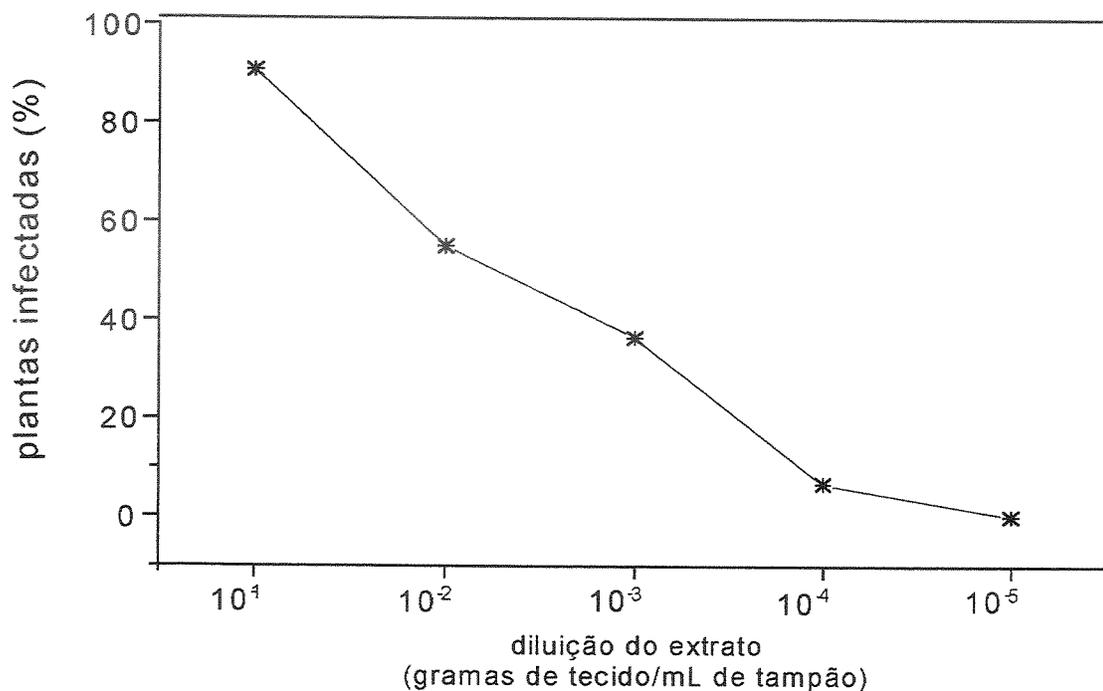


Figura 13. Porcentagem de plantas infectadas de acordo com a diluição do extrato de folhas de *C. zanzibarica* utilizado na inoculação.

5. Purificação

A última etapa da purificação, o gradiente de densidade, foi realizada em dois tubos, que após a centrifugação foram fracionados em alíquotas de 0.8 mL. As frações do topo do gradiente foram as únicas a apresentarem absorção em ultravioleta característica de nucleoproteína: $Abs_{260\text{ nm}}$ entre 1 e 2,5, e relação $Abs_{260\text{ nm}} / Abs_{280\text{ nm}}$ entre 1,21 e 1,29. As frações com tais características, após serem

misturadas e dialisadas apresentaram valores de absorvância bem menores: $Abs_{260\text{ nm}}$ entre 0.8 e 1 e relação $Abs_{260\text{ nm}} / Abs_{280\text{ nm}}$ entre 1,04 e 1,08. A presença de partículas virais foi verificada através de microscopia eletrônica na preparação tanto antes (Fig. 14) como depois da diálise (Fig. 15). O purificado foi armazenado em freezer para testes posteriores.

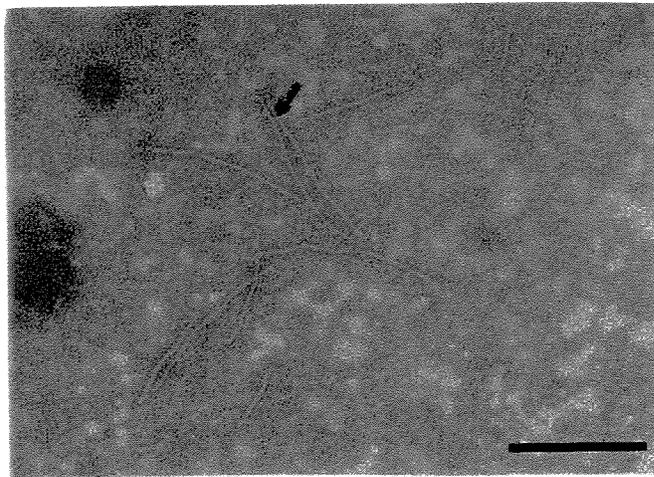


Fig. 14. Partículas virais observadas no microscópio eletrônico após gradiente de densidade, no processo de purificação (seta). Barra de referência 500 nm.

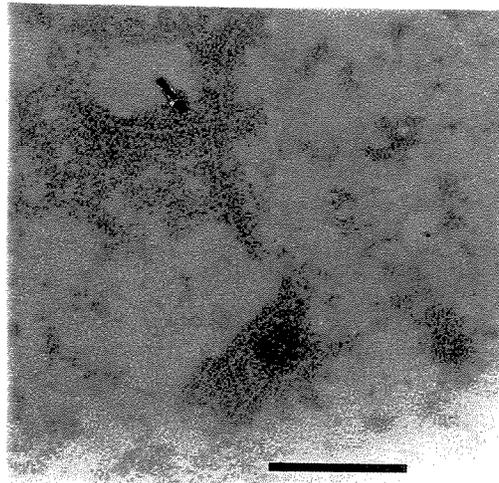


Fig. 15. Micrografia eletrônica do vírus purificado, após a diálise, mostrando queda da concentração (seta). Barra de referência 500 nm.

6. Serologia

6.1. Comparação do VMCr com diferentes *Potyvirus* pelo teste ELISA

Nos testes de PTA e DAS-ELISA foram considerados resultados positivos aqueles cuja absorvância foi pelo menos o dobro da absorvância lida na amostra de planta sadia.

Foram obtidos resultados negativos em testes DAS-ELISA com anti-soro para o vírus Y da batata (PVY) e em teste PTA-ELISA com anti-soro para “southern bean mosaic virus” (SBMV) um sobemovirus.

A comparação serológica através de PTA-ELISA com diversos anti-soros apresentou resultados claramente positivos unicamente quando utilizado anti-soro para o PWV. Pode-se inferir também alguma reação com o anti-soro para WMV-2 e, em menor escala, com o anti-soro para SMV, mas sem atingir o patamar de significância, como observado na tabela 7.

Tabela 7. Comparação do VMCr com anti-soros para diferentes Potyvirus em testes de PTA-ELISA. Absorvância obtida em 405 nm.

Anti-soro	<i>C. zanzibarica</i>	
	Sadia	VMCr
PMV ("pea mosaic virus")	0,218	0,353
PRSV-W ("papaya ringspot virus-W")	0,082	0,073
PSV ("peanut stripe virus")	0,102	0,170
PWV ("passionfruit woodiness virus")	0,084	0,210
SMV ("soybean mosaic virus")	0,274	0,306
WMV-2 ("watermelon mosaic virus")	0,141	0,231
ZYMV ("zucchini yellow mosaic virus")	0,034	0,035

6.2. Massa molecular da proteína capsidial: Western Blot

Através da técnica de western blot, utilizando anti-soro para PWV, foi visualizada uma única banda nos materiais infectados com PWV (maracujá) e com VMCr (*C. zanzibarica*) (Fig 16). Também o vírus purificado formou uma única banda com massa molecular relativa não diferente da observada em amostras de material vegetal fresco.

A massa molecular relativa para a proteína capsidial do VMCr e de PWV foram estimadas, utilizando-se o programa "Stratagene eagle eye", em cerca de 37 kDa.

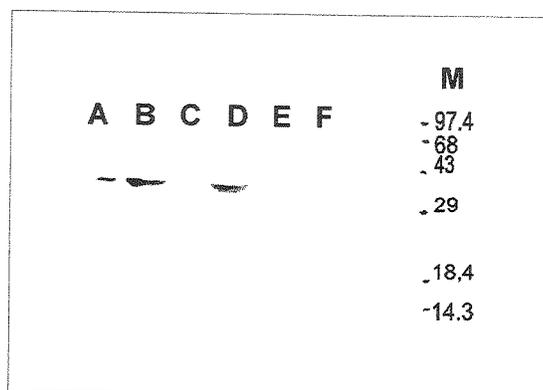


Figura 16. Western blot utilizando partículas de VMCr purificadas, extrato proteico proveniente de plantas inoculadas com o VMCr ou com o PWV e de plantas sadias. **A)** VMCr purificado; **B)** *C. zanzibarica* inoculada com VMCr; **C)** Crotalária sadia; **D)** maracujá inoculado com PWV; **E)** maracujá inoculado com VMCr; **F)** maracujá sadio. **M)** padrão de peso molecular em kDa (pré-corado - Gibco-BRL.).

7. Comparação entre o VMCr e PWV

Os resultados dos testes serológicos indicam similaridade entre o vírus do mosaico da crotalária e o vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (PWV). Por este motivo foram realizados testes para verificar se o PWV era capaz de

infectar crotalária e, vice-versa, a capacidade do VMCr de infectar maracujá. Independentemente da manifestação de sintomas, o resultado do experimento foi avaliado com base nos testes de PTA-ELISA, usando anti-soro para o PWV. Também foram incluídas amostras de feijão 'Preto G-2' inoculadas com o VMCr ou com o PWV (Tabela 8).

Tabela 8. Verificação de infecção do VMCr e do PWV em diferentes hospedeiras através de testes PTA-ELISA, utilizando anti-soro para PWV. Absorbância em 405 nm.

Amostra	Vírus Inoculado				
	Nenhum (controle)	PWV		VMCr	
		ELISA	SINTOMAS	ELISA	SINTOMAS
Maracujá ¹	0,051 ¹	M	0,227	-	0,066
Feijão 'Preto G-2' ¹ folhas	0,071	LLn, NS, MP	0,061	LLn, NS, MP	0,295
Feijão 'Preto G-2' ¹ vagens	n.t	NS	0,112	NS	n.t. ⁴
<i>C. zanzibarica</i> ² Folhas	0,064	-	0,067	M	0,418
<i>C. paulina</i> ¹ Folhas	0,084	-	0,128	M	0,243

¹ planta inoculada mecanicamente

n.t. = não testado

NS= necrose sistêmica

M = mosaico

² planta inoculada por afídeos

- = ausência de sintomas;

LLn = lesão local necrótica

MP = morte da planta

Com base nos sintomas poder-se-ia concluir que o PWV infecta feijão 'Preto G-2', pois foram observadas lesões locais necróticas e necrose sistêmica. Entretanto, os testes de PTA-ELISA foram negativos em amostras de folhas com esses sintomas. Amostras de vagens destas plantas de feijão 'Preto G-2' inoculadas com PWV, com sintoma de necrose sistêmica, apresentaram um valor de absorbância indicativo da presença viral, mas que não pode ser considerado

conclusivo. Em maracujá somente foi obtida infecção, detectada por sintomas e por PTA-ELISA, com o PWV. Maracujá inoculado mecanicamente com o VMCr não apresentou sintomas e foi negativo para esse vírus em PTA-ELISA, resultado confirmado pela técnica de Western blot que tem maior sensibilidade (Fig. 16).

Foram feitas tentativas adicionais de infectar maracujá com o VMCr, utilizando diversos métodos de inoculação:

- a) Mecanicamente. Utilizando folhas de *C. zanzibarica* maceradas em tampão fosfato, conforme técnica descrita em materiais e métodos, item 2.1.
- b) Por afídeos (*Myzus persicae*), conforme técnica descrita em materiais e métodos, item 2.3.
- c) Injetando, na nervura central da folha, o extrato de *C. zanzibarica* infectada com uma seringa.

Não foram observados sintomas nem obtidos resultados positivos em PTA-ELISA nas plantas de maracujá inoculadas com o VMCr por nenhum dos métodos utilizados, confirmando que não houve infecção por VMCr em maracujá.

8. Microscopia Eletrônica

8.1. Microscopia Eletrônica de Cortes de Tecidos

Observou-se inclusões citoplasmáticas cilíndricas em forma de cata-vento e feixes, típicas dos vírus da família *Potyviridae*, tanto em *C. zanzibarica* com mosaico como em feijão 'Preto G-2' com lesões locais ou com necrose sistêmica (Fig 17, 18a. e 18b). Agregados laminares e inclusões nucleares não foram observados em

nenhuma das amostras. Foram visualizados grandes grupos de inclusões em tecidos de feijoeiro 'Preto G-2' invadido sistemicamente.

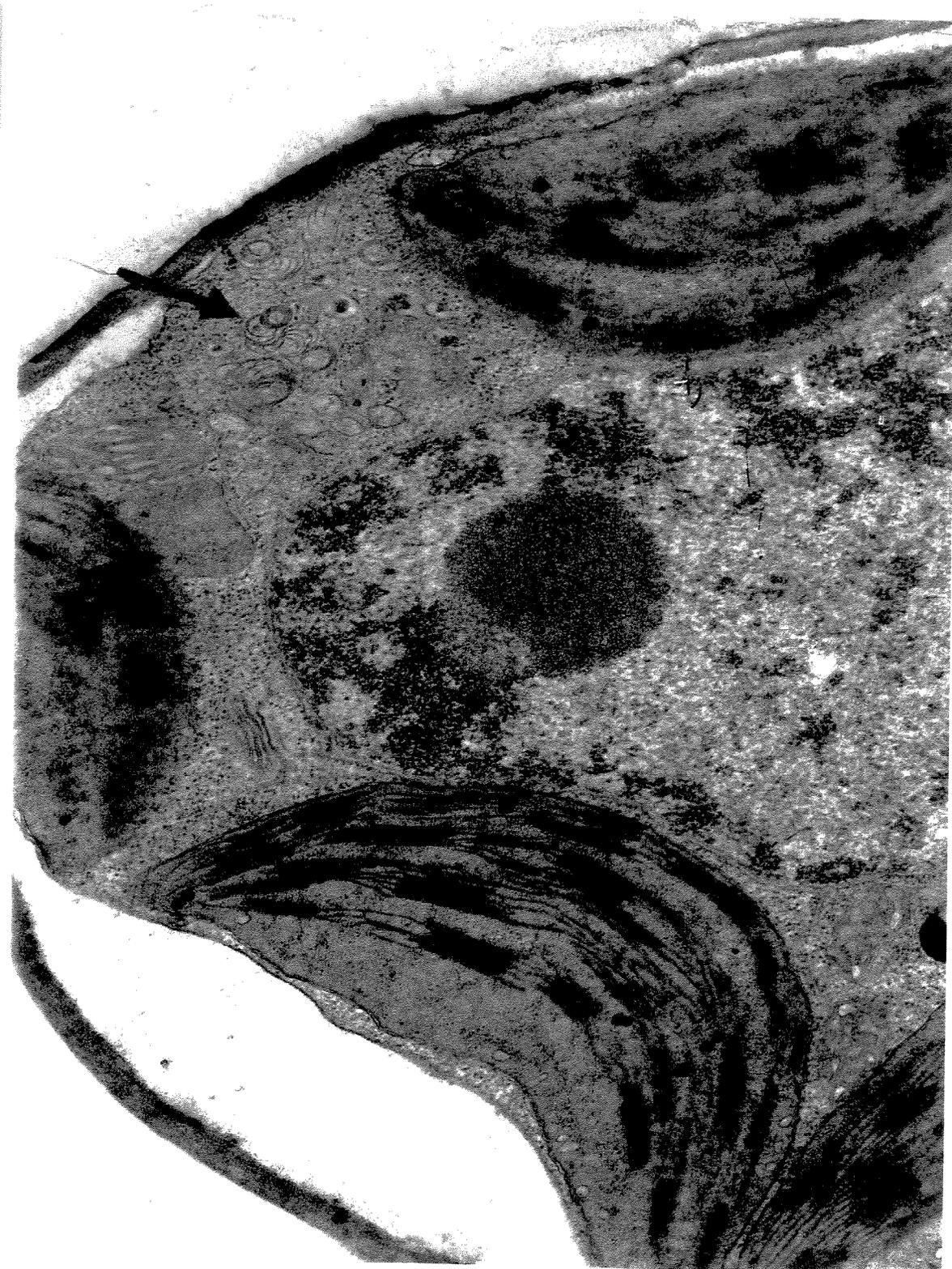
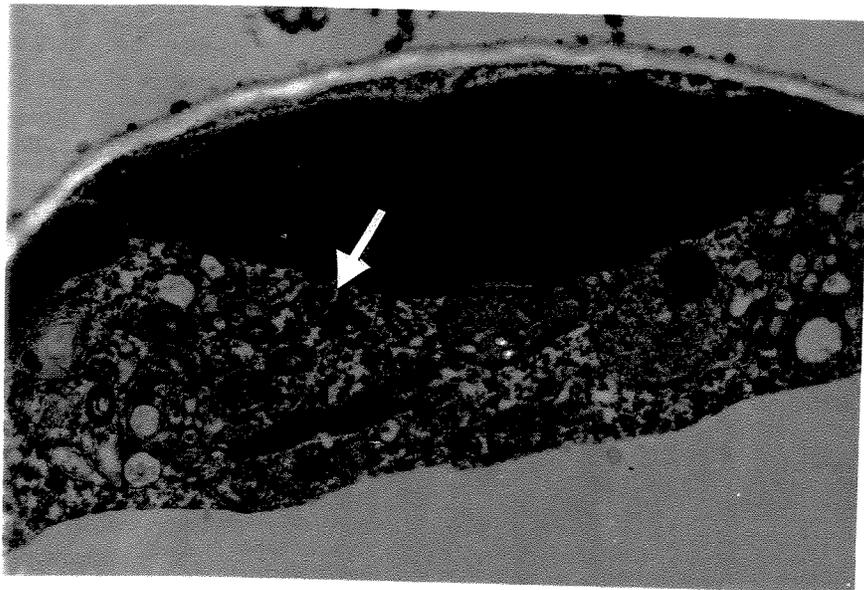


Fig 17. Micrografia eletrônica mostrando inclusões cilíndricas em células do mesofilo de *C. zanzibarica*. Aumento de 32.350 vezes.



a



b

Fig 18. Micrografias eletrônicas mostrando inclusões cilíndricas em folhas de feijão 'Preto G-2'.

a) Lesão local. Aumento de 25.900 vezes. b) Sintoma sistêmico. Aumento de 20.000 vezes.

8.2. Microscopia Eletrônica de Imuno-adsorção.

O anti-soro para PWV permitiu a “captura” de numerosas partículas do VMCr no filme suporte de microscopia eletrônica, indicando reação antígeno-anticorpo (Fig 19).

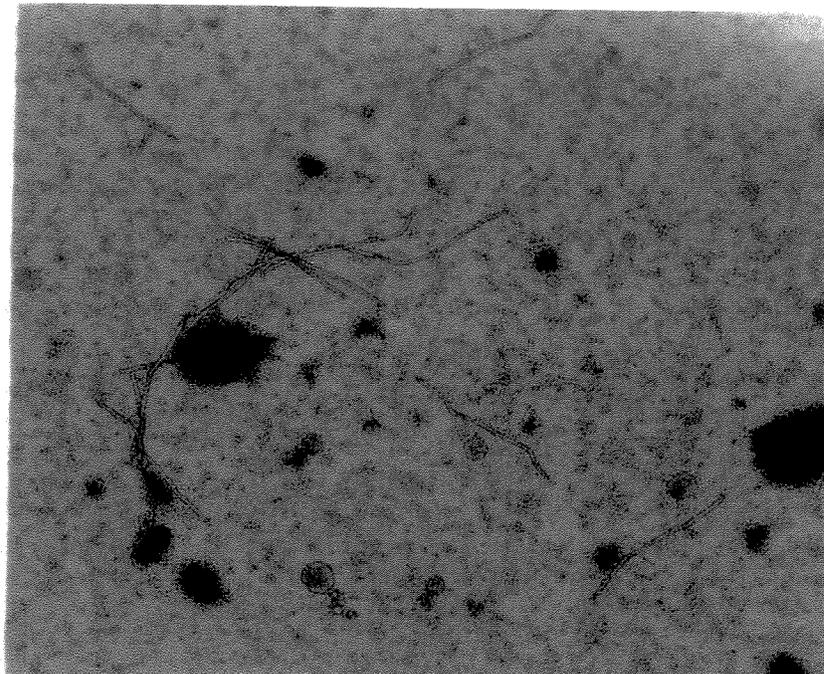


Fig 19. Teste de microscopia eletrônica de imuno-adsorção utilizando folhas de *C. zanzibarica* infetada com VMCr e anti-soro para PWV. Aumento de 30.000 vezes.

9. Microscopia de Luz

Inclusões citoplasmáticas amorfas foram claramente observadas em *C. paulina*, embora com bastante variabilidade em função da idade da folha (figuras 20 e 21). Nas outras espécies de crotalária, além de apresentarem dificuldades para a retirada da epiderme, a identificação de inclusões foi mais difícil.



Fig. 20. Fotomicrografia de epiderme de *C. paulina* sadia corada com Luxol brilliant-green. Aumento de 4.000 vezes.

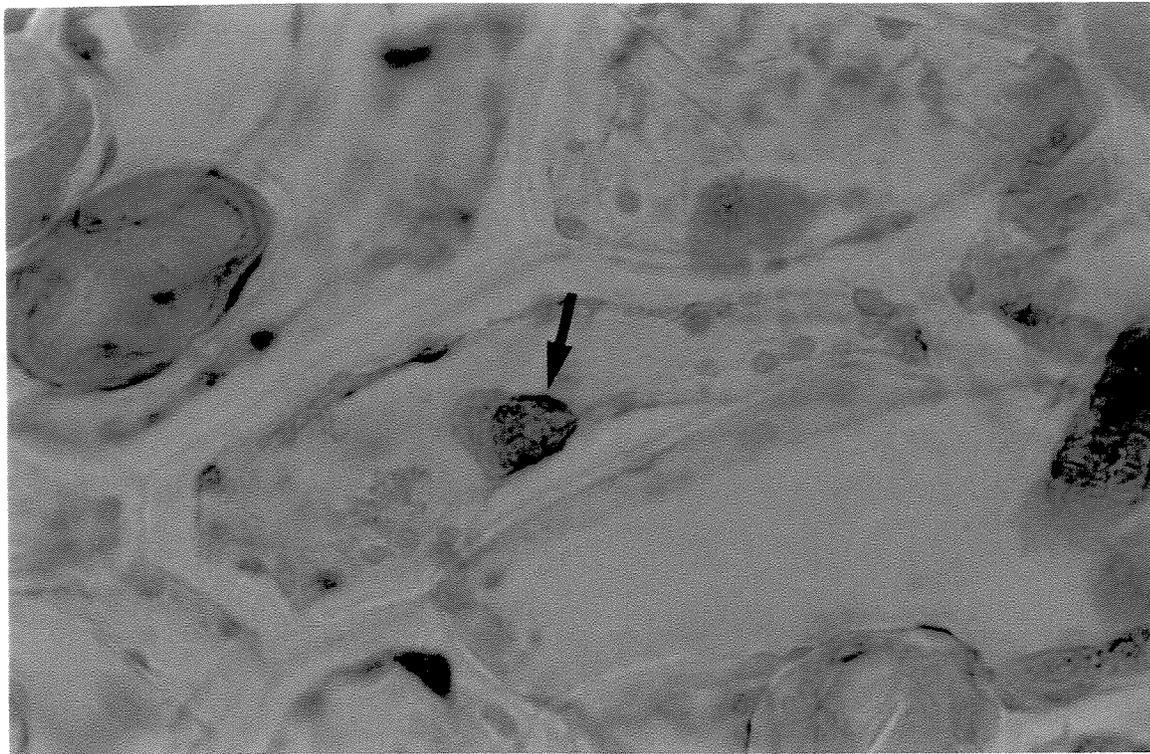


Fig 21. Epiderme de *C. paulina* infectada com o VMCr mostrando inclusões citoplasmáticas próximas ao núcleo (seta). Coloração Luxol-briliant green. Aumento de 4.000 vezes.

DISCUSSÃO

As características observadas para o vírus encontrado em crotalária são compatíveis com as reportadas na literatura para os membros da família *Potyviridae*, confirmando a classificação do vírus nesta família, anteriormente feita com base na morfologia da partícula viral.

Os *Potyvirus* são transmitidos por diferentes espécies de afídeos (Brunt *et al.*, 1996; Zerbini & Maciel-Zambolim, 1999) com diferentes níveis de eficiência (Hollings & Brunt, 1981; Matthews, 1970; Zerbini & Maciel-Zambolim, 1999), fato também observado com o vírus em estudo. As propriedades *in vitro* do VMCr foram compatíveis com as descritas na literatura para a maioria dos *Potyvirus* (Brunt *et al.*, 1996).

A transmissão mecânica, quando utilizado tampão fosfato e abrasivo (carborundo), mostrou níveis de eficiência semelhantes aos descritos para outros potyvirus (Brunt *et al.*, 1996; Matthews, 1970). A transmissão através de lâmina cortante foi relativamente baixa (10%) o que sugere que deve ser bem menos importante que a transmissão por afídeos comparando com condições de cultivo. A transmissão deste vírus não ocorre pela raiz.

Alguns membros do gênero *Potyvirus* são transmitidos pela semente (Brunt *et al.*, 1996), mas no caso do VMCr não foram observados sintomas em nenhuma das 2310 plantas derivadas de sementes de plantas infectadas, de doze espécies diferentes. Provavelmente isto pode ser atribuído, nas espécies cuja resposta é necrótica, ao fato de que o vírus produz necrose ao longo das nervuras, o que indica uma maior sensibilidade dos tecidos vasculares. Este efeito deletério nos tecidos

onde ocorre o movimento do vírus em longas distâncias dentro da planta, deve também prejudicar a capacidade invasiva do próprio vírus. Deste modo é provável que o vírus não consiga atingir os órgãos florais, incluindo os gametas e outras partes da semente.

Os dados da microscopia de luz são também coerentes com os reportados para este gênero de fitovírus (Christie & Edwardson, 1986.) e não apontam nenhuma particularidade do isolado.

No teste de Western blot, visualizou-se uma única banda com massa molecular relativa semelhante a observada em material fresco. Estes resultados sugerem que a proteína capsidial deste vírus apresenta bastante estabilidade, não ocorrendo alteração durante a purificação.

As observações de tecidos infectados ao microscópio eletrônico, mostrando a presença de inclusões cilíndricas do tipo cata-vento e rolos e ausência de inclusões laminadas, indicam que o vírus em estudo deveria ser incluído na subdivisão I proposta por Edwardson & Christie (1996). Estes dados conferem com os descritos para PWV no Brasil por Chagas *et al* (1981) mas não com os dados reportados por Edwardson & Christie (1996) para PWV fora do Brasil. Segundo estes autores o PWV pertence a subdivisão III, caracterizada pela presença de inclusões formadas por rolos e estruturas laminadas longas ligadas a uma porção central. Provavelmente este resultado esteja relacionado com a informação reportada por Santana *et al.* (1999) que indica a predominância no Brasil do "south african passiflora virus" (SAPV), com características diferentes das do PWV (Brand *et al.*, 1993). Como não há dados sobre o tipo de inclusões induzidas pelo SAPV, só é possível especular que o PWV no Brasil tenha diferenças citopatológicas por tratar-se de um vírus diferente do descrito no exterior. O fato do isolado estudado reagir positivamente

com anti-soro para o PWV deve ser interpretado, portanto, com cuidado pois como o anti-soro foi preparado para "PWV" isolado no Brasil, é provável que este seja mais próximo serologicamente ao SAPV do que ao PWV.

O testes de PTA-ELISA indicam uma forte relação serológica do vírus estudado com o vírus do endurecimento dos frutos do maracujá (PWV), inclusive, poderia tratar-se do mesmo vírus. Na literatura tem sido relatada a possibilidade de PWV infectar espécies de crotalária tanto no exterior (Taylor & Greber, 1973) como também no Brasil (Gioria & Rezende, 1996). Contrariamente ao que parecem indicar os resultados dos testes serológicos, algumas propriedades biológicas indicam diferenças entre VMCr e PWV. A mais significativa é a incapacidade do VMCr de infectar maracujá, resultado este confirmado por um método bastante sensível (Western blot), o que sugere uma provável adaptação do vírus para a infectar de leguminosas.

Outro aspecto que chama a atenção é que tanto o VMCr como o PWV induzem sintomas de necrose local em feijoeiro 'Preto G-2', mas somente o VMCr é detectado nessas folhas por PTA-ELISA, inclusive com valores de absorbância altos. As folhas do feijão 'Preto G-2' inoculado com PWV, com claros sintomas necróticos, apresentaram valores de absorbância iguais aos da planta sadia. Este fenômeno provavelmente se deve ao fato que o vírus de maracujá (PWV) induz uma reação muito violenta de hipersensibilidade em feijão 'Preto G-2', que ocorre mesmo com níveis muito baixos de replicação viral. A concentração do vírus ficaria assim extremamente baixa, impedindo sua detecção até pelo teste PTA-ELISA, cuja sensibilidade é considerada baixa quando comparado com outros tipos de ELISA.

A massa molecular da proteína capsidial do VMCr foi praticamente igual a do PWV, de cerca de 37 kDa, tanto nos testes realizados como nos resultados

reportados por Chang (1992). Numa descrição recente é considerada a massa relativa da proteína capsidial do PWV como sendo de 33 kDa (Brunt *et al.*, 1996). Não foram realizados testes mais precisos para determinar se a pequena diferença na massa da proteína dos dois vírus, observada em alguns testes, era realmente significativa. Mesmo apresentando massa semelhante, tais proteínas podem diferir quanto à seqüência de aminoácidos, diferenças estas que não seriam detectadas pelo método empregado. Como exemplo de situação semelhante pode-se citar o PaMV, “passionfruit mottle virus”, (Chang, 1992) e TMMV, “tuberosa mild mosaic potyvirus”, (Chen & Chang, 1998), dois *Potyvirus* distintos cuja massa da proteína capsidial é 38 kDa.

O conjunto de resultados aponta para conclusão que o VMCr é um isolado do PWV que, aparentemente, está especializado em infectar leguminosas, não infectando maracujá. Se considerarmos o VMCr um isolado do PWV que ocorre no Brasil, esta seria a primeira vez que este vírus é reportado infectando crotalária em condições naturais no país. Temos ainda perspectiva de realizar o sequenciamento do VMCr para completar sua caracterização. Testes para verificação de uma possível vacina para o PWV, a partir deste vírus, também poderão ser realizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, A. M. R. 1994. Virus Diseases. *In* Tropical Soybean, Improvement and Production. pp. 65-74. FAO, Roma, Itália.
- Berger, P. H., Wyatt, S. D., Shiel, P. J., Silbernagel, M. J., Druffel, K. & Mink, G. I. 1997. Phylogenetic analysis of the *Potyviridae* with emphasis on legume-infecting potyviruses. *Archives of Virology*. 142:1979-1999.
- Brand, R. J., Burger, J. T. & Rybicki, E. P. 1993. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the coat protein gene of a new potyvirus infecting South African Passiflora. *Archives of Virology*. 128:29-41.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L. & Zucher, E. J. 1996. Pant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. URL: <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- Chagas, C. M., Kitajima, E. W., Lin, M. T., Gama, M. I. C. S. & Yamashiri, T. 1981. Grave Moléstia em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa Deg.) no Estado da Bahia Causada por um Isolado do Vírus do "Woodiness" do Maracujá. *Fitopatol. Bras.* 6:259-268.
- Chang, C. A. 1992. Characterization and Comparison of Passionfruit Mottle Virus, a Newly Recognized Potyvirus, with Passionfruit Woodiness Virus. *Phytopathology*. 82:1358-1363.
- Chen, C. C. & Chang, C. A. 1998. Characterization of a potyvirus causing mild mosaic on tuberose. *Plant Disease*. 82:45-49.
- Christie R. G. & Edwardson J. R. 1986. Light microscopic techniques for detection of plant virus inclusions. *Plant Disease* 70:273-279.

- Clark, M. F. & Adams, A. N. 1976. Journal of Gen. Virol. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. 34:475-483.
- Cook, C. G. & White, G. A. 1996. *Crotalaria juncea*: A Potential Multi-Purpose Fiber Crop. URL: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1996/v3-389.html>
- Costa, A. S., 1987. Fitoviroses do Feijoeiro no Brasil. pp 173-256 *In* Feijão. Fatores de Produção e Qualidade. Bulisani, E.A. (editor). Fundação Cargill, Campinas, SP, Brasil.
- Costa, A.S., Vega, J. & Braga, N. R. 1988. Epifítia de um Tobamovirus em *Crotalaria juncea* Sugere a Existência de um Vetor Eficiente. Fitopatol Bras 13:115 (res.)
- Dougherty, W. G. & Carrington, J. C. 1988. Expression and Function of Potyviral Gene Products. Ann. Rev. Phytophathol. 26:123-143.
- Edwardson, J. R. & Christie, R. G., 1996. Cylindrical Inclusions. Florida Agricultural Experiment Station bulletin 894.
- Edwardson, J. R. 1974. Some Properties of the Potato Virus-Y Group. Florida Agricultural Experiment Station monograph Nº 4.
- Freitas, D. S. e Vega, J. 1997. Potyvirus isolado de crotalária com sintomas de mosaico causa necrose severa em feijão 'Preto' Fitopatologia Bras. 22:335.
- Gibbs, A. & Mackenzie, A. 1997. A Primer Pair for Amplifying Part of the Genome for all Potyvirids by RT-PCR. Journal of Virological Methods. 63:9-16.
- Gioria, R. & Rezende, J. A. M. 1996. Reação de diferentes espécies, principalmente de leguminosas, a seis isolados do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro. IN: IV Simpósio de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, resumos. p437.

- Hammond, J. & Lawson, R.H. 1988. An Improved Purification Procedure for Preparing *Potyriviruses* and Cytoplasmatic Inclusions from the same Tissue. *J. Virological Methods* 20:203-217.
- Hollings, M. & Brunt, A. A. 1981. Potyriviruses. In: Handbook of Plant Virus Infections Comparative Diagnosis. (E. Kurstak, ed). Elsevier North-Holland Biomedical Press. New York. pp731-807.
- Jordan, R. & Hammond, J. 1991. Comparison and Differentiation of *Potyrivirus* Isolates and Identification of Strain-, Virus, Subgroup-specific and *Potyrivirus* Group-Common Epitopes Using Monoclonal Antibodies. *J. General Virology*. 72:25-36.
- Kitajima, E. W. 1995. Lista de Publicações Sobre Virose e Enfermidades Correlatas de Plantas no Brasil (1986-1993). *Fitopatol. Bras.*, Supl. 92p.
- Matthews, R. E. F. 1970. *Plant Virology*. Academic Press, New York. 778p.
- Marinho, V. L. & Kitajima, E. W. 1988. Método Simplificado de Purificação de Alguns Potyrivirus. *Fitopatol. Bras.* 14:91-93.
- Mowat, P. W. & Dawson, S. 1987. Detection and Identification of Plant Viruses by ELISA Using Crude Extracts and Unfractionated Antisera. *J. Virol. Methods* 15:233-247.
- Pozzer, L.; Dusi, A. N.; Lima, M. I. & Kitajima, E. W. 1995. Caracterização de um Isolado brasileiro do Sweet Potato Feathery Mottle Virus Infectando Batata Doce. *Fitopatologia Brasileira* 20:65-71.
- Rizzini, C. T. & Mors, W. B. 1995. *Botânica Econômica Brasileira*. 2^a edição, Âmbito Cultural, Rio de Janeiro, 241p.
- Roberts, I. M.; Wang, D.; Findlay, K. & Maule, A.J. 1998. Ultrastructural and Temporal Observations of the *Potyrivirus* Cylindrical Inclusions (CIs) Show That CI Protein Acts Transiently in Aiding Virus Movement. *Virology* 245:173-181.

- Russell, A. B., Hardin, J. W., Fraser, A. Grand, L. 1997. Poisonous Plant of North Carolina – *Crotalaria* spp. URL: <http://www.ces.ncsu.edu/depts/hort/costumer/poison/Crotasp.html>
- Santana, E.N., Braz, A.S.K., Torres, L.B., Maciel-Zambolim, E. and Zerbini, F.M. 1999. Molecular characterization of Potyvirus isolates causing passionfruit woodiness in Brazil. *Virus Reviews & Research* 4:153, Supl. 1, P-337.
- Taylor, R. H. & Greber R. S. 1973. Passionfruit Woodiness Virus. nº 122 in: *Descriptions of Plant Viruses*. Commonw. Micol. Inst/ Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, Inglaterra.
- Ward, C.W. & Shukla, D. D. 1991. Taxonomy of *Potyriviruses*: Current Problems and Some Solutions. *Intervirology* 32: 269-296.
- Vega, J.; Scagliusi, S. M. M. & Ulian, E. C. 1997. Sugarcane Yellow Leaf Disease in Brazil: Evidence of Association Whith a Luteovirus. *Plant Disease*. 81:21-26.
- Vega, J.; Rezende J. A. M. & Yuki, V.A. 1995. Detecção do Vírus do Mosaico Amarelo da Abobrinha-de-moita no Brasil: Caracterização Parcial de um Isolado Encontrado em São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 20:72-79.
- Zerbini, F. M. & Maciel-Zambolim, E. 1999. A família Potyviridae – Parte I. Revisão Anual de Patologia de Plantas 7:1-66.