

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UM
NOVO *Potyvirus* DETECTADO EM
Glycine max L. (Merrill)**

RITA DE CÁSSIA SANTOS

2000

.....
.....
.....

.....
.....
.....

RITA DE CÁSSIA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UM NOVO *Potyvirus*
DETECTADO EM *Glycine max* L. (Merrill)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências de curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Profa. Dra. Antonia dos Reis Figueira

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

2000

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Santos, Rita de Cássia

Caracterização parcial de um novo *Potyvirus* detectado em *Glycine max* L.
(Merrill) / Rita de Cássia Santos. -- Lavras : UFLA, 2000.

64 p. : il.

Orientadora: Antonia dos Reis Figueira.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Potyvirus*. 2. Caracterização. 3. Soja. 4. *Glycine max*. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.3498

RITA DE CÁSSIA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UM NOVO *Potyvirus*
DETECTADO EM *Glycine max* L. (Merrill)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências de curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 07 de julho de 2000.

Dra. Alessandra de Jesus Boari

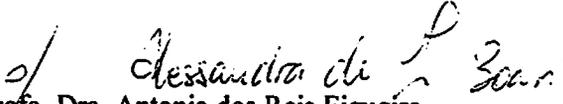
UFLA

Prof. Dr. Magno Antônio Patto Ramalho

UFLA

Dra. Eunize Maciel Zambolim

UFV


Prof.ª. Dra. Antonia dos Reis Figueira
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2000

A meus queridos sobrinhos Estela, Gaetan e Felipe,
A minhas irmãs Izabel e Francisca,
À minha mãe Luzia,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de realização deste trabalho e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Antonia dos Reis Figueira pela orientação, pelos valiosos ensinamentos e estímulo nas horas mais difíceis.

À Dra. Alessandra de Jesus Boari pela orientação em todas as etapas desse trabalho e sobretudo pela amizade e apoio.

Ao professor Magno Antonio Patto Ramalho e à Dra. Eunize Maciel Zambolim por aceitarem participar da Banca Examinadora.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, em especial ao Carlos, pela ajuda na condução do experimento e amizade.

Aos colegas de curso pela agradável convivência e amizade.

Ao Manguinha pelo apoio em todos os momentos, pela compreensão, dedicação, e sobretudo pelo amor.

A Michela, amiga insubstituível, pela amizade.

A Adelina e Roberta pela convivência harmoniosa.

Ao Ecole pela amizade e orientação nas análises estatísticas.

Aos amigos Ellen, Nuno e Flávio pela presença constante, apoio e pelos momentos de descontração.

Aos meus cunhados Jack e Laurent pela ajuda, carinho e incentivo.

Aos amigos de Cristina: Bel, Cândida, Lili, Daniel, Alex e Almir pelo carinho, incentivo e companheirismo de cada dia.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, agradeço.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Origem e distribuição da soja	4
2.2 Vírus que infectam soja.....	5
2.3 Vírus do amarelo do broto da soja (VABS).....	8
2.4 O gênero <i>Potyvirus</i>	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Vírus e fonte de inóculo.....	16
3.2 Inoculação mecânica em hospedeiras diversas.....	16
3.3 Efeito do VABS e do SMV em oito cultivares de soja	17
3.4 Transmissibilidade pelo vetor	18
3.5 Microscopia eletrônica	18
3.6 Clonagem e seqüenciamento	19
3.6.1 Purificação parcial do vírus	19
3.6.2 Extração do RNA viral	20
3.6.3 RT-PCR	21
3.6.4 Clonagem	21
3.6.5 Purificação do plasmídeo	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Inoculação mecânica em hospedeiras diversas.....	24
4.2 Efeito do VABS e do SMV em oito cultivares de soja	29
4.3 Transmissibilidade pelo vetor.....	40

4.4 Microscopia eletrônica	41
4.5 Clonagem e seqüenciamento	43
5 CONCLUSÕES	53
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

RESUMO

SANTOS, Rita de Cássia. **Caracterização parcial de um novo *Potyvirus* detectado em *Glycine max* L. (Merrill)**. Lavras: UFLA, 2000. 64 p. (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia)

Esse trabalho foi realizado com o vírus do Amarelo do Broto da Soja – VABS (*Soybean Yellow Shoot Virus* – SYSV), assim denominado por Deslandes, Costa e Figueira (1984) que o detectaram infectando naturalmente plantas de soja na fazenda experimental da EPAMIG, localizada em Lavras-MG. Trata-se de um novo *Potyvirus*, ainda não descrito, que chamou a atenção dos pesquisadores que o encontraram pela severidade dos sintomas induzidos na maioria das hospedeiras testadas. Foi feita a inoculação mecânica do VABS em hospedeiras diversas para verificação de suscetibilidade e sintomas, e do VABS e SMV (*Soybean Mosaic Virus*) em oito cultivares de soja: Cristalina, Doko, IAC-8, Numbaira, Paraná, UFV-1, UFV-4 e UFV-5 para comparar o efeito de ambos os vírus na sua produção, em condições de casa-de-vegetação. Investigou-se ainda a transmissibilidade do VABS por insetos vetores, a ultra estrutura de tecidos infectados de soja (cv. Santa Rosa) ao microscópio eletrônico e procedeu-se a análise de um fragmento genômico obtido pela utilização de um “primer” degenerado para *Potyvirus* e um “primer” Poli T₁₄. Das plantas cultivadas e selvagens, inoculadas mecanicamente, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Alternanthera tenella* e *Carica papaya* cv. Solo reagiram com lesões locais típicas, revelando-se ótimas diferenciadoras para o VABS. Das Solanáceas testadas apenas *Nicotiana benthamiana* foi infectada, apresentando sintomas de clareamento das nervuras seguido de mosaico leve. Todas as Leguminosas inoculadas apresentaram sintomas de infecção, que variaram de mosaico e clareamento das nervuras à severas necroses, às vezes seguidas de morte prematura dos ponteiros e/ou das plantas, como foi observado, por exemplo, nas cultivares de feijão Carioca e Preto Campinas. Considerando-se a produção total por planta, a cv. Numbaira, quando inoculada mecanicamente, foi a mais suscetível ao VABS apresentando uma redução de 100% ao passo que foi resistente ao SMV. Por outro lado, a cv. Doko foi a mais suscetível ao SMV apresentando uma redução de 87,2%, mas foi resistente ao VABS. Os dados obtidos com essas duas cultivares indicam que, em plantas de soja, a resistência ao VABS e ao SMV deve ser controlada por genes distintos. As cvs. UFV-1 e UFV-4 foram resistentes e as cultivares Cristalina, IAC-8, e UFV-5 apresentaram reduções entre 63,9 e 75,2% para ambos os vírus. A cv. Paraná apresentou uma redução de 62,4% para o VABS e 38,7% para o SMV. Nos

Comitê Orientador: Antonia dos Reis Figueira – UFLA (Orientadora) e Alessandra de Jesus Boari (co-orientadora).

testes de transmissibilidade por vetores, o afideo *Myzus persicae* foi capaz de transmitir o vírus para 70% e o *Aphis gossypii* para 40% das plantas inoculadas, com um tempo de 30 minutos para aquisição e 24 horas para transmissão. Na observação dos cortes ultrafinos de tecidos infectados com o VABS foram encontradas inclusões citoplasmáticas do tipo catavento, típicas de *Potyvirus*. A análise de parte do fragmento de cDNA, obtido por transcrição do genoma viral do VABS por RT-PCR, contendo aproximadamente 500 pb, correspondente à região da proteína Nib, mostrou uma homologia de 88% com duas estirpes do SMV (G2 e G7), 80% com o WMV2 (*Watermelon Mosaic Virus*- estirpe 2), 76% com o BCMV (*Bean Common Mosaic Virus*) e 74% com o PStV (*Peanut stripe virus*).

Comitê Orientador: Antonia dos Reis Figueira – UFLA (Orientadora) e Alessandra de Jesus Boari (co-orientadora).

ABSTRACT

SANTOS, Rita de Cássia. **Partial characterization of a new *Potyvirus* detected from *Glycine max* L. (Merrill).** Lavras: UFLA, 2000. 64p. (Dissertation – Master Program in Phytopathology)

This work was carried out with the Soybean Yellow Shoot Virus-SYSV (Virus do Amarelo do Broto da Soja – VABS), first identified by Deslandes *et al.* (1984) in soybean plants (*Glycine max* L. (Merrill), growing in experimental fields of EPAMIG – Lavras, MG, Brazil. The VABS is an uncharacterized *Potyvirus*, identifiable by the severity of symptoms induced in a majority of experimental hosts tested. In this study several wild and cultivated hosts were mechanically inoculated with VABS to investigate host susceptibility and symptoms. Eight soybean cultivars (Cristalina, Doko, IAC-8, Numbaira, Paraná, UFV-1, UFV-4, e UFV-5) were mechanically inoculated with VABS and Soybean Mosaic Virus (SMV) in order to compare the effect of both viruses in plant yield under greenhouse conditions. A study of transmission of VABS by aphid vectors and examination of thin sections coming from infected leaf tissues by electron microscopy was also carried out. Nucleotide sequencing of a genome fragment obtained by RT-PCR was done by using a poly T14 primer and a degenerate primer for *Potyvirus*. Among the cultivated and wild plants which were mechanically inoculated, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Alternanthera tenella* e *Carica papaya* cv. Solo showed typical local lesions, and were selected as very good indicator hosts for VABS. The only Solanaceae susceptible to VABS was *Nicotiana benthamiana* which showed vein clearing followed by mild mosaic symptoms. All the Leguminosae plants inoculated were infected and showed symptoms which ranged from mosaic and vein clearing to severe necrosis, sometimes followed by precocious death of the plant apex or even of the whole plant. These symptoms were observed on bean plants cv. Preto campinas and Carioca. Taking into account the total yield per plant, the cultivar Numbaira was one most susceptible to VABS, showing a reduction of 100%, while it was resistant to SMV. On the other hand, the cultivar Doko was the most susceptible to SMV, showing a reduction of 87.2% and was resistant to VABS. The results obtained with the cv. Numbaira and Doko indicated that the resistance to VABS and SMV in soybean plants must be controlled by distinct resistance genes. The cultivars UFV-1 and UFV-4 were resistant to VABS and SMV and the cultivars Cristalina, IAC-8 and UFV-5 showed reduction between 63.9 and 75.2% for both viruses. The Paraná cultivar

Guidance Committee: Antonia dos Reis Figueira – UFLA (Major Professor) and Alessandra de Jesus Boari

showed a reduction of 62.4% when infected with VABS and a reduction of 38.7% when infected with SMV. The aphid vectors were allowed to feed for 30 minutes for virus acquisition and 24 hours for virus transmission. *Myzus persicae* transmitted the VABS to 70% of inoculated plants and *Aphis gossypii* transmitted the VABS to 40% of inoculated plants. The observation of thin sections of soybean leaf tissues (cv. Santa Rosa) infected with VABS revealed the presence of pinwheel cytoplasmic inclusions which are typical in cells infected with *Potyvirus*s. The analysis of the VABS genomic segment of about 500bp, from the N1b protein region, showed a 88% homology with two SMV strains (G2 and G7), 80% homology with WMV2 (*Watermelon Mosaic Virus-2*), 76% homology with BCMV (*Bean common mosaic virus*) and 74% homology with PSTV (*Peanut Stripe Virus*).

Guidance Committee: Antonia dos Reis Figueira – UFLA (Major Professor) and Alessandra de Jesus Boari

I INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma espécie vegetal de grande importância econômica e nutricional. É a primeira fonte mundial para produção de proteína e óleos vegetais, sendo capaz de produzir, em um hectare, mais proteína que qualquer outra planta, podendo substituir satisfatoriamente a proteína animal na alimentação humana. (Santos, 1988).

Após a sua introdução no Brasil, a cultura da soja passou por uma franca expansão por todo o território nacional devido às excelentes condições para a cultura no país. Atualmente é cultivada em praticamente todo o Brasil, desde as altas latitudes gaúchas até as baixas latitudes equatoriais-tropicais. Em algumas regiões brasileiras, as médias de produtividade são superiores às obtidas pela soja norte-americana (Câmara, 1998).

Hoje, o Brasil ocupa o segundo lugar em produção de grãos, perdendo apenas para os Estados Unidos, segundo lugar em exportação de óleos e primeiro lugar em exportação de farelo (Agrianual 2000).

Entre os principais fatores que limitam a produção de soja estão as doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides. No Brasil, com a expansão da soja para novas regiões, nas quais há tendência de predomínio da monocultura, tem ocorrido o aumento contínuo das doenças importantes, causando perdas severas na produção, bem como o agravamento das doenças consideradas atualmente de pouca importância.

Os vírus não são considerados causadores de grandes perdas econômicas na cultura da soja em condições de campo, devido a um intenso trabalho de melhoramento visando a obtenção de cultivares resistentes a esses patógenos. Dentre os vírus que já foram identificados em campos produtores de soja no Brasil, o *Soybean mosaic virus* (SMV) se destaca porque não só é capaz de afetar a quantidade e qualidade da produção, mas pode ainda ser transmitido

pela semente, em porcentagens que dependem do tipo de semente e da cultivar utilizada (Costa, 1977; Almeida, 1981). O SMV foi detectado pela primeira vez no estado de São Paulo, de onde foi se disseminando para todas as regiões produtoras, via sementes infectadas. As perdas causadas por esse vírus variam de acordo com a cultivar e com a época em que a planta for infectada, podendo chegar a mais de 70% (Almeida e Silveira, 1983). Além das perdas em quantidade, a maioria das sementes provenientes de plantas infectadas se mostram manchadas, depreciando a sua qualidade (Costa, 1977).

Devido ao grande potencial do SMV para causar danos e perdas à cultura da soja, um grande esforço foi iniciado no sentido de implementar programas de melhoramento genético visando a obtenção de cultivares resistentes, cujo sucesso tem feito com que as novas cultivares utilizadas apresentem uma alta resistência em campo. Portanto o uso de cultivares resistentes, aliado ao controle do seu afídeo vetor, *Myzus persicae* Sulz, tem feito com que o SMV não seja um problema para o produtor de soja no Brasil. Outros vírus já foram encontrados infectando plantas de soja em campo, entretanto nunca foram associados a perdas relevantes (Almeida et al., 1997).

Em 1984, Deslandes detectou um vírus infectando plantas de soja em um ensaio de cultivares no campo, na subestação da EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais), na região de Lavras – MG que foi denominado de Vírus do amarelo do broto da soja (VABS). Estudos preliminares indicaram que esse vírus era diferente de qualquer outro vírus já encontrado na cultura da soja, e finalmente observou-se que ele ainda não havia sido descrito em nenhuma parte do Brasil e do mundo. Inicialmente considerou-se que esse poderia ser uma estirpe do SMV ou do Vírus do mosaico comum do feijoeiro (*Bean common mosaic virus* - BCMV), pois estudos ao microscópio eletrônico mostraram ser ele um *Potyvirus*, com partículas flexuosas de 750 a 780 nm de comprimento (Deslandes, Costa e Figueira, 1984). Entretanto,

posteriormente, observou-se que ele não apresentou nenhum relacionamento sorológico com esses dois vírus (Figueira, Alves e Kitajima, 1991).

Os sintomas causados pelo VABS na planta de soja, bem como a redução na sua produção, variam de cultivar para cultivar e podem ser muito mais drásticos que os causados pelo SMV, indicando que ele tem um grande potencial para causar perdas significativas nessa cultura. Portanto, o seu estudo e a identificação de possíveis fontes de resistência em soja constituem uma estratégia para impedir que esse vírus venha a ser um problema no futuro. Aliado a isso, o fato desse ser um vírus novo, ainda não descrito no Brasil e no mundo, justifica, por si só, a sua caracterização biológica e molecular.

Neste trabalho, foram realizados alguns estudos visando identificar possíveis hospedeiras para o VABS, entre as plantas cultivadas e daninhas, determinar e comparar o seu efeito com o causado pelo SMV na qualidade e quantidade de produção de oito cultivares de soja sob condições de casa-de-vegetação, e determinar qual seria o seu provável vetor na natureza. Foram feitos também clonagem e seqüenciamento da região da proteína NIb e a comparação dos resultados obtidos com os dados disponíveis no Banco Internacional de Genes, para determinar quais os possíveis parentescos com outros vírus do gênero *Potyvirus*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Origem e distribuição da soja

A soja, originada do Continente Asiático, mais precisamente da China, tem grande importância econômica e nutricional em todo o mundo. Até o final do século XV ficou restrita ao Oriente, quando então chegaram os primeiros navios europeus que a trouxeram para o Ocidente, onde foi distribuída para os jardins botânicos e estações experimentais da Europa.

No Brasil foi introduzida em 1882, na Bahia, mas não obteve sucesso. Em 1892, foi cultivada pela primeira vez em São Paulo, no Instituto Agrônomo de Campinas, mas a sua introdução efetiva ocorreu por imigrantes japoneses em 1908. No Rio Grande do Sul, onde foi cultivada em 1914, apresentou uma evolução mais consistente, e em 1949 ocorreu a primeira exportação brasileira de soja. Sua importância na economia brasileira cresceu acentuadamente na década de 1970, contribuindo para a obtenção de divisas através da exportação de grãos, óleo e farelo. Atualmente a soja é cultivada em todo o território nacional e algumas regiões apresentam rendimentos médios superiores aos obtidos pela soja norte-americana (Câmara, 1998).

Atualmente, o Brasil ocupa um papel importante na produção mundial de soja e derivados. Com a evolução tecnológica, os produtores têm uma produção agrícola perfeitamente adaptada às condições brasileiras, alcançando rendimentos de 3000 a 6000 kg por hectare nas regiões Norte e Centro-Oeste. A principal região produtora é ainda a região Sul, seguida de perto pela região Centro-Oeste. Entre os principais estados produtores, o Paraná está em primeiro lugar, seguido pelos estados de Mato Grosso, Rio Grande do Sul, Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais e Bahia (Agriannual 2000).

O Brasil detém o segundo lugar em produção e exportação de grãos, produzindo cerca de metade da soja norte americana. Em relação à produção e

exportação de farelo de soja e óleo, também ocupa a mesma posição (Agrianual, 2000).

2.2 Vírus que infectam soja

A soja é suscetível a pelo menos cento e onze vírus ou estirpes de vírus, sendo que alguns ocorrem naturalmente e outros só a infectam sob condições experimentais. Apesar de sua suscetibilidade a esse grande número de vírus, nem todos causam grandes perdas econômicas devido ao intenso trabalho de melhoramento genético visando a obtenção de cultivares resistentes às viroses mais importantes (Sinclair e Backman, 1989).

Dentre esses vírus, o *Soybean mosaic virus* (SMV) destaca-se como o mais importante para a cultura da soja, causando perdas consideráveis na produção. Outras viroses de menor importância têm também sido detectadas mais freqüentemente, como, por exemplo, a Queima do broto da soja, causada pelo *Tobacco streak virus* (TSV); o Mosaico amarelo da soja, causado por estirpes do *Bean common mosaic virus* (BCMV); o Mosaico cálico da soja, causado pelo *Alfafa mosaic virus* (AMV); e o Mosaico crespo, causado pelo *Abutilon mosaic virus* (AbMV). Existem alguns vírus capazes de infectar a soja, descritos em outros países, que ainda não foram detectadas no Brasil, como *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Bean pod mottle virus* (BPMV), *Soybean chlorotic mottle virus* (SbCMV), *Soybean crinkle leaf virus* (SCLV), *Soybean dwarf virus* (SbDV), *Soybean indonesian dwarf virus* (ISDV), *Soybean mild mosaic virus* (SbMMV), entre outros (Tanaka e Paiva, 1982; Gazzoni e Yoriniori, 1995; Santos, 1988; Câmara, 1998; Brunt et al., 1996; Almeida et al., 1997; Almeida, 1983; Anjos, Lin e Kitajima, 1985).

O SMV foi identificado pela primeira vez no Brasil em 1955, no estado de São Paulo. Trata-se de um *Potyvirus* que pode ser transmitido pelas sementes, capaz de causar perdas variáveis na produção, de modo que a planta pode nem

mesmo chegar a produzir, dependendo da época de infecção e da cultivar utilizada (Lima Neto e Costa, 1975; Almeida e Silveira, 1983).

Os sintomas apresentados pela planta suscetível dependem da cultivar, da estirpe e da época em que esta for infectada (Lima Neto e Costa, 1979). Em infecções precoces, até os 40 dias após a germinação, as plantas apresentam sintomas mais severos e conseqüentemente maior redução na produção. Os sintomas mais comuns nas folhas infectadas são mosaico, encarquilhamento, enrugamento, deformação do limbo, bolhosidade e drástica redução na sua área. Podem aparecer também lesões escuras nas vagens, e manchas marrons ou pretas nas sementes (Almeida et al., 1997).

A disseminação no campo é feita principalmente pelo pulgão *Myzus persicae*; porém, várias outras espécies, como o *Aphis gossypii*, *A. fabae* e outros, podem também atuar como vetor (Lima Neto e Costa, 1975; Almeida, 1979). A disseminação depende de diversos fatores, como a presença de fontes de vírus na vegetação espontânea, a suscetibilidade das cultivares utilizadas, a época de revoada dos afídeos, a densidade da população de plantas, a taxa de infecção das sementes e outros. Estudando a influência da idade da plantas e do número de afídeos sobre a porcentagem de infecção, Lima Neto e Costa (1979) verificaram que plantas com uma a duas semanas de idade, independente do número de insetos, foram as que apresentaram sintomas mais severos de infecção com o SMV. Observaram ainda que à medida que as plantas crescem, adquirem certa resistência à infecção, mesmo quando suscetíveis, como é o caso da variedade Santa Rosa.

Na década de 1980, o SMV foi identificado em praticamente todos os campos produtores, causando uma alta incidência de sementes manchadas, principalmente na cultivar Santa Rosa, o que resultou em prejuízos significativos para os produtores de sementes. Mesmo causando redução significativa na quantidade de produção, considera-se que o principal prejuízo causado pelo

mosaico comum se deve à diminuição da qualidade das sementes produzidas, pelo aparecimento das manchas de coloração marrom escura (mancha-café), que podem recobrir parte ou toda a semente, dependendo da suscetibilidade da cultivar (Costa, 1977). Experimentos realizados com sementes manchadas revelaram que quanto maior a porcentagem de sementes manchadas empregadas na semeadura, maior o índice de transmissão do SMV, que pode chegar a mais de 40%, dependendo da cultivar e da estirpe do vírus (Costa, 1977; Almeida, 1981).

A maneira mais eficiente, de se controlar o SMV no campo, tem sido através da introdução de cultivares de soja resistentes. Em estudos realizados para localizar variedades resistentes ao SMV, foi verificado que as variedades mais plantadas no estado de São Paulo estavam entre as mais suscetíveis. A redução na produção das variedades suscetíveis Santa Rosa, Mineira, Hardee, Viçõja, IAC-1 e IAC-2 variou de 30 a 100% em plantas inoculadas em estágio de folhas primárias. As variedades Campos Gerais, Bienville e Davis foram as que apresentaram resistência ao SMV proveniente da sua ancestral comum, a Ogden (Lima Neto e Costa, 1975).

Alguns anos depois, Lima Neto (1980) fez uma triagem de variedades, linhagens e introduções de soja resistentes ao SMV por meio de inoculação mecânica e através do vetor *Myzus persicae* em 96 variedades de soja. Dessas variedades testadas, 26 se mostraram resistentes a todos os isolados do vírus e 68 se tornaram infectadas sistemicamente, produzindo sementes manchadas.

Como a resistência ao SMV é controlada por alelos dominantes, isso facilitou bastante a implementação de programas de melhoramento genético da soja, com a finalidade de se fazer a incorporação desses genes em outras variedades (Lima Neto e Costa, 1975). Com o auxílio desses programas, tem sido possível a obtenção de genótipos resistentes, e a sua liberação para os agricultores garante um controle satisfatório dessa virose em condições de

campo (Almeida et al., 1997).

2.3 Vírus do amarelo do broto da soja (VABS)

Esse vírus foi detectado na região de Lavras – MG, no ano de 1983, em experimento envolvendo a multiplicação de cultivares de soja em campo, localizado na Subestação da EPAMIG. Inicialmente acreditava-se ser ele um variante do complexo SMV ou BCMV; porém, estudos feitos por Deslandes, Costa e Figueira (1984) mostraram que se tratava de um vírus diferente do SMV ou BCMV, que ainda não havia sido descrito no Brasil ou em qualquer outra parte do mundo.

Os sintomas induzidos pelo Vírus do amarelo do broto dependem da cultivar e da idade com que essa for infectada. Na cultivar Santa Rosa, inicialmente aparece um mosaico, clareamento das nervuras, sendo facilmente reconhecido por um amarelecimento generalizado do topo e encrespamento dos brotos novos. Podem ser ou não acompanhados por necrose, mas geralmente ocorre paralização no crescimento dos ponteiros. Posteriormente, a planta se torna enfezada, com encurtamento dos entrenós e super-brotamento. As folhas mais novas ficam enrugadas e encarquilhadas e a produção é extremamente reduzida ou quase nula. Esse sintoma pode variar, dependendo da cultivar infectada, podendo causar desde o mosaico dourado até uma necrose drástica das folhas do topo (Deslandes, Costa e Figueira, 1984; Figueira, Costa e Reis, 1987). O VABS é um *Potyvirus* com partículas de 750 a 780 nm de comprimento (Deslandes, Costa e Figueira, 1984; Figueira, Alves e Kitajima 1991) e é capaz de infectar *Vigna sinensis* e variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) causando mosaico, necrose das nervuras, rugosidade, bolhosidade, redução no tamanho e morte prematura da planta (Deslandes, Costa e Figueira, 1984).

Em 1985, Vega, Rezende e Costa constataram que o VABS é o único

Potyvirus capaz de causar lesões locais em mamoeiro Solo e Baiano (*Carica papaya* L.). Observaram também, ao microscópio eletrônico, que o VABS induz, nas células do mamoeiro que apresentam lesão local, a formação de inclusões lamelares, que aparecem em contato com a membrana plasmática, geralmente próximas aos plasmodesmas. Encontraram ainda a presença de massas fibrilares no interior de vacúolos, que nas células em fase de desorganização se depositavam sobre a parede celular, geralmente em áreas próximas aos plasmodesmas. Eles inferiram, então, que a formação dessas massas fibrilares em vacúolos, que depois seriam depositadas sobre as paredes celulares, poderia ser interpretada como uma reação do mamoeiro, provavelmente para dificultar a passagem do vírus de célula para célula através dos plasmodesmas.

Estudos adicionais mostraram que o VABS é sorologicamente relacionado com duas estirpes de um *Potyvirus* da *Canavalia* e com um *Potyvirus* do maracujá mas não com BCMV e SMV, como se acreditava. (Figueira, Alves e Kitajima, 1991).

2.4 O gênero *Potyvirus*

A família *Potyviridae* é a mais numerosa família de fitovírus, contando com 145 espécies. Atualmente essa família compreende, além do gênero *Potyvirus*, cinco outros gêneros: *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Rymovirus* e *Tritimovirus* (Scottish Crop Research Institute, 1998). Os *Potyvirus*, individualmente, possuem pequenas gamas de hospedeiros, embora a gama da família como um todo inclua centenas de espécies de mono e dicotiledôneas. Causam sintomas de mosaico e deformação foliar, são transmitidos mecanicamente, por sementes e por vetores, de maneira não-persistente (estiletar), constituindo-se os afídeos como os mais importantes vetores na natureza retendo o vírus no estilete por um curto período de tempo

(Costa, 1998).

O gênero *Potyvirus*, cujo membro tipo é o *Potato virus Y* (PVY), possui virions filamentosos, não envelopados e flexuosos, variando de 680 a 900 nm de comprimento por 11 a 20 nm de diâmetro, com as subunidades da capa proteica em torno de 30 a 37 kDa. Contém de 4 a 7% de ácido nucleico e 93 a 96% de proteína (Brunt, 1996). O genoma dos *Potyvirus* é composto por uma única molécula de RNA de fita simples, tipo positivo (+ssRNA), e possui uma única ORF, com aproximadamente 10.000 nucleotídeos, que é traduzida na forma de uma poliproteína. O processamento da poliproteína origina nove proteínas funcionais (PI, HC-Pro, P3, CI, 6K1, 6K2, NIa, NIB, CP), com diferentes pesos e diferentes funções, além das regiões 5'e 3' não traduzidas (5'NTR e 3' NTR) (Figura 1). Um aspecto fundamental das proteínas sintetizadas pelos *Potyvirus* é seu caráter multifuncional. Praticamente todas as proteínas cujas funções já foram determinadas atuam em mais de um processo no ciclo da infecção (Shukla et al., 1994).

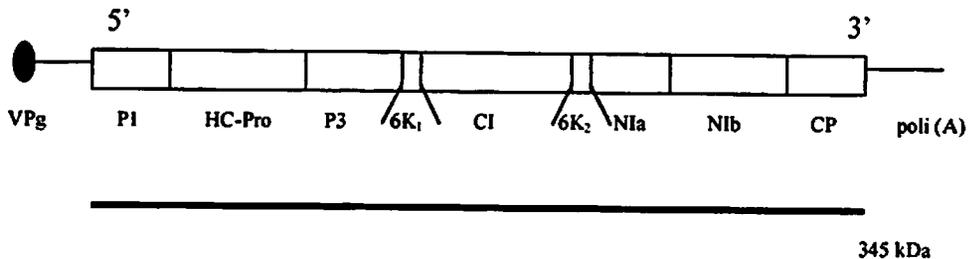


FIGURA 1. Organização do genoma de *Potyvirus* (adaptado de Shukla et al., 1994)

O RNA genômico apresenta uma proteína de origem viral (VPg), ligada à extremidade 5', e uma cauda poli-A na extremidade 3'. A proteína capsidial (CP) é o produto gênico mais estudado dos *Potyvirus*. Além de fazer parte do

capsídeo, está envolvida na transmissão por afídeos, no movimento célula-a-célula, no movimento a longa distância e na indução de sintomas. Estudos da proteína e análise da montagem de partículas virais indicaram a presença de três regiões distintas na CP, sendo uma região amino-terminal, variável em tamanho e seqüência; uma região central, altamente conservada, com 215 a 227 aminoácidos; e uma região carboxi-terminal com 18 a 20 aminoácidos. As regiões amino e carboxi-terminais são voltadas para o exterior da molécula, sendo responsáveis pelas propriedades antigênicas da CP e da partícula viral (Shukla et al., 1994).

A proteína P1, localizada na extremidade amino da poliproteína, é um dos produtos gênicos menos estudados dos *Potyvirus*, bem como o mais variável em tamanho e seqüência de aminoácidos. Varia de 26 kDa para o JGMV (Gough e Shukla, 1993) a 48 kDa para o LMV (Revers et al., 1997). Tem propriedade de proteinase, sendo responsável pela clivagem de seu terminal carboxílico, separando-se da proteína HC-Pro (Verchot, Koonin e Carrington, 1991). Essa propriedade proteolítica é dependente de um resíduo de serina que está localizado no terminal carboxílico da P1, e o sítio ativo, GXSG, é conservado em todos os *Potyvirus* cuja seqüência da P1 já foi determinada (Shukla et al., 1994). Além de sua atividade autoproteolítica, outra função associada com a P1 é a de fator acessório para amplificação do genoma viral. A fim de determinar se a atividade da P1 é essencial, um sítio de clivagem da proteinase NIa foi inserido entre as seqüências de P1 e HC-Pro e analisados em plantas de fumo. Esse mutante recuperou a capacidade de infecção sistêmica, indicando que a presença das proteínas individuais, e não o processamento por P1, é necessária para a infectividade do vírus (Verchot e Carrington, 1995 a, b).

A proteína HC-Pro (Helper Component-Proteinase) é bastante estudada e um grande número de funções já foi a ela atribuído (Maia, Haenni e Bernardi, 1996). Sua denominação diz respeito às funções de componente auxiliar para

transmissão por afídeos e protease. Entretanto, mais quatro funções já foram atribuídas à HC-Pro: fator acessório de amplificação do genoma (Kasschau e Carrington, 1995; Kasschau, Cronin e Carrington, 1997) movimento sistêmico (Cronin et al., 1995; Kasschau, Cronin e Carrington, 1997; Rojas et al., 1997); transmissão via semente (Johansen et al., 1996) e inibidor da resposta de defesa da planta (Pruss et al., 1997; Shi et al., 1997; Vance et al., 1995). Possui também propriedade de se ligar ao RNA (Maia e Bernardi, 1996). A HC-Pro cataliza a proteólise de seu terminal carboxílico, separando-se da proteína P3 (Carrington, Freed e Sanders, 1989). A função de transmissão por afídeos foi determinada em experimentos em que os afídeos se alimentavam de preparações purificadas de PVY, através de membranas, e esses afídeos não se tornavam virulíferos (Govier e Kassanis, 1974). Quando o extrato de plantas infectadas contendo HC-Pro era adicionado, os afídeos adquiriam o vírus e o transmitiam para plantas sadias. A análise de isolados de *Potyvirus* não transmitidos por afídeos indicou que muitos desses isolados apresentam mutações na seqüência de nucleotídeos da região codificadora da HC-Pro. Evidências da interação entre a HC-Pro e a proteína capsidial foram obtidas *in vitro*, por meio de experimentos nos quais a HC-Pro ligou-se apenas à CP de isolados de Tobacco vein mottling virus (TVMV) transmitidos por afídeos (Blanc et al., 1997).

A proteína P3, assim como a P1, é o produto gênico menos estudado dos *Potyvirus*. Essa proteína é detectada isoladamente em células infectadas (Rodriguez-Cerezo e Shaw, 1991) ou em conjunto com as proteínas CI, formando inclusões cilíndricas (Rodriguez-Cerezo et al., 1993) ou NIB, formando as inclusões nucleares (Langenberg e Zhang, 1997). Como CI e NIB estão diretamente envolvidas na replicação viral, sugere-se que a P3 seja um fator acessório de amplificação do genoma. Após a P1, apresenta grande variabilidade de aminoácidos, sendo o segundo produto gênico menos conservado. Possui aproximadamente 38 kDa (Shukla et al., 1994).

A proteína CI (Cylindrical Inclusion) é a maior proteína produzida pelos *Potyvirus*, com um peso molecular de aproximadamente 70 kDa (Lain et al., 1991). Ela é responsável pela formação das inclusões cilíndricas tipo cata-vento (Murphy et al., 1991). Análise da seqüência de nucleotídeos indicou a presença de regiões altamente conservadas e através de estudos “*in vitro*” atribuiu-se a essas regiões as funções de ATPase, ligação a RNA e RNA helicase. Dessa forma, a CI é considerada a RNA helicase dos *Potyvirus*, sendo responsável pela separação da fita dupla de RNA produzida durante a replicação do genoma. Calder e Ingerfeld (1990) levantaram a possibilidade dessa proteína exercer algum papel no movimento célula-a-célula pois verificaram uma associação entre as inclusões e os plasmodesmas, sugerindo que essas inclusões podem facilitar o transporte do RNA viral através dessas organelas.

As proteínas 6K₁ e 6K₂ são processadas durante a replicação dos *Potyvirus*, sendo responsáveis pela associação do complexo replicativo a membranas. A análise de sua seqüência de aminoácidos indica a presença de uma região hidrofóbica, típica de proteínas transmembranas (Shukla et al, 1994).

A proteína NIa (VPg-Pro) consiste de dois polipeptídeos com funções distintas: o VPg, localizado nos 21 kDa da porção amino, e a Pro, principal proteinase dos *Potyvirus*, sendo responsável pela maioria das clivagens da poliproteína, localizada nos 24 kDa da porção carboxílica (Dougherty et al., 1988 por Zerbini e Maciel-Zambolim, 1999). A VPg é ligada covalentemente ao RNA genômico e essa ligação no PVY serve como oligonucleotídeos iniciadores para a síntese de fitas do RNA de polaridade negativa. O acúmulo da cada proteína é distinto (Schaad et al., 1996), sendo que essa característica é função da afinidade dos sítios de clivagem reconhecidos pela NIa. A seqüência VXXQ/ASGV é considerada a seqüência padrão de reconhecimento pela proteinase. Esse reconhecimento pode ser afetado pela presença de aminoácidos básicos ou ácidos, localizados logo acima ou abaixo dessa seqüência, e esses

aminoácidos fazem com que certas proteínas sejam liberadas antes de outras. O sítio de clivagem entre a VPg e a 6K₂ é sub-ótimo, e isso faz com que a VPg permaneça ligada ao complexo de replicação viral. Sendo assim, a clivagem tardia permite que a VPg exerça sua função de primer para a replicação do RNA viral (Restrepo-Hartwig e Carrington, 1992). Outra função atribuída à VPg é a de movimento à longa distância, entretanto, a forma como ela participa desse processo ainda não foi determinada (Schaad e Carrington, 1996).

A proteína Nib (Nuclear Inclusion b) é a RNA polimerase dependente do RNA (RdRp) dos *Potyvirus*. Essa proteína contém a seqüência GDD conservada em todas as Nib já seqüenciadas (Hong e Hunt, 1996). Entre suas funções está o reconhecimento de seqüências do RNA viral e interação com fatores do hospedeiro, possuindo a seqüência de aminoácidos mais conservada dentro da família *Potyviridae* (Shukla et al., 1994). Mutações nessa seqüência ou no sinal de localização nuclear da Nib eliminam totalmente a infectividade dos clones. Hong et al. (1995) utilizaram um sistema duplo-híbrido de levedura, demonstrando que a proteína Nib do TVMV interage com a NIa e com a proteína capsidial. Entretanto, mutações na seqüência conservada diminuem a interação entre Nib e CP, mas não com a NIa. Mutações na NIa, correspondente à VPg, eliminam a interação entre NIa e Nib. Esses resultados demonstram que domínios funcionais distintos de Nib são responsáveis pela interação com NIa e CP, refletindo as várias funções exercidas pela Nib no processo de replicação. Além dessas proteínas funcionais, os *Potyvirus* possuem ainda as regiões 5'NTR e 3'NTR, sendo que a primeira atua como promotora da tradução e replicação do RNA viral e a segunda promotora da replicação do RNA viral.

A família *Potyviridae*, por causar sérias doenças em plantas no mundo todo, tem sido intensivamente estudada. O maior avanço desses estudos ocorreu nos últimos dez anos, com o conhecimento da estrutura molecular dos vírus, bem como da organização e seqüência do genoma, modo de replicação e

processamento da poliproteína. Esses dados incrementam os conhecimentos sobre a biologia e sintomatologia dos vírus, possibilitando uma classificação mais precisa desses patógenos (Shukla et al., 1994).

Técnicas moleculares, como seqüenciamento, são de fundamental importância para identificação e classificação de um *Potyvirus*. Dois métodos têm sido utilizados para determinar a seqüência de nucleotídeos do DNA: sendo o método enzimático ou de terminação da cadeia com dideoxirribonucleosídeo trifosfato de Sanger e o método de degradação química do DNA desenvolvido por Maxam e Gilbert.

O método dideoxi ou enzimático, desenvolvido por Sanger, utiliza a DNA polimerase para sintetizar a cópia complementar da fita simples de DNA e se baseia na habilidade da DNA polimerase em usar 2', 3'-dideoxynucleosídeos trifosfatos (ddNTPs) como substrato. Os dideoxynucleosídeos trifosfatos não apresentam a hidroxila no carbono 3', de forma que, uma vez incorporados, impedem a adição de outro nucleotídeo, terminando, assim, o alongamento da cadeia (Sanger, 1981; Ausubel, 1995; Passaglia e Zaha, 1996).

Esse método consiste basicamente dos seguintes passos: um "primer" de oligonucleotídeos é anelado na fita molde de ssDNA; ocorre a extensão da fita usando a DNA polimerase em quatro misturas de reações separadas, cada uma contendo um dNTP marcado, uma cadeia que termina em um ddNTP e a mistura de outros três dNTPs não marcados; quatro grupos de reações terminados em A, C, G ou T são separados, de acordo com o tamanho, por eletroforese em quatro linhas adjacentes em um gel de poliacrilamida de alta resolução. As seqüências de DNA são lidas de uma seqüência padrão (Hyone-Myong, 1996).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Vírus e fonte de inóculo

Tanto o VABS como o SMV foram mantidos em plantas de soja cv. Santa Rosa na qual causam sintomas distintos. Os sintomas induzidos pelo VABS se iniciam com clareamento das nervuras e evoluem para mosaico, embolhamento, amarelecimento dos brotos novos e enfezamento, enquanto que os causados pelo SMV se caracterizam por um mosaico verde escuro, severo enrugamento das folhas ao longo da nervura principal, enfezamento e discreto superbrotamento. O SMV foi proveniente da coleção do Dr. A. S. Costa do Instituto Agronômico de Campinas – SP.

A cada três semanas os vírus foram transmitidos mecanicamente para plantas novas, mantidas em casa-de-vegetação no DFP-UFLA para multiplicação e manutenção do inóculo. Foi também mantida uma fonte recorrente constituída de folhas infectadas e dessecadas, estocadas -20 °C.

3.2 Inoculação mecânica em hospedeiras diversas

O VABS foi inoculado mecanicamente, conforme descrição anterior, nas seguintes plantas silvestres e cultivadas: *Alternanthera tenella*, *Bidens pilosa*, *Brassica oleracea*, *Cucurbita pepo*, *Cucumis sativa*, *Canavalia* sp, *Capsicum annuum* cv. Agronômico 10G, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *C. murale*, *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa*, *Lactuca sativa* cv. Regina, *Licopersicum esculentum* cv. Santa Clara, *Nicandra physaloides*, *Nicotiana tabacum*, *N. benthamiana*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *Carica papaya* cv. Solo, *Phaseolus vulgaris* cvs. Preto Campinas e Carioca, *Vigna unguiculata*, *Passiflora* sp. Essas plantas foram semeadas em bandejas e transplantadas quando apresentavam cerca de seis folhas definitivas para sacos plásticos com capacidade de 2 kg contendo, como substrato, terra, esterco e

areia, na proporção 3:1:1, devidamente esterilizados. Após a inoculação as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação por aproximadamente 40 dias, até a fase final de observação dos sintomas.

3.3 Efeito do VABS e do SMV em oito cultivares de soja

Na avaliação do efeito do Vírus do amarelo do broto da soja (VABS) e do Vírus do mosaico da soja (Soybean Mosaic Virus - SMV) sobre a produtividade de cultivares de soja, empregaram-se as seguintes cultivares: Cristalina, Doko, IAC-8, Numbaíra, Paraná, UFV-1, UFV-4 e UFV-5.

As sementes foram plantadas em vasos de 5 kg, contendo como substrato, terra, esterco e areia, na proporção 3:1:1, devidamente esterilizados, estabelecendo duas plantas por vaso. Foram feitos três experimentos distintos, sendo inoculação com o VABS, com o SMV e as testemunhas. Cada experimento constituiu de quatro parcelas, com 26 plantas cada uma, totalizando 104 plantas por cultivar e por vírus. As plantas com aproximadamente dez a quinze dias após a germinação, previamente polvilhadas com Carborundum (500 mesh), foram inoculadas mecanicamente, via extrato foliar infectado com o VABS. O tampão de inoculação utilizado foi o fosfato de sódio 0,01M, pH 7,0, contendo sulfato de sódio na mesma molaridade. Após a lavagem das folhas com água corrente, os vasos foram mantidos em casa-de-vegetação até a fase de colheita. Posteriormente as plantas foram arrancadas separadamente, com cuidado, colocadas dentro de um saco de papel e levadas para o laboratório para contagem e avaliação das vagens e sementes produzidas.

A análise estatística foi feita utilizando-se o Sistema de Análise Estatística da Universidade Federal de Viçosa (SAEG). Antes da análise de variância, fez-se a correção dos dados ($\arcsin \sqrt{x}$) (Gomes, 1990) e usou-se teste de média Scott-Knott.

3.4 Transmissibilidade pelo vetor

Foram testadas duas espécies de afídeos: *Myzus persicae* e *Aphis gossypii*. A colônia de *M. persicae* foi estabelecida em plantas sadias de *Datura stramonium* e de *A. gossypii* em plantas sadias de algodão, ambas mantidas em gaiolas apropriadas.

Inicialmente os pulgões foram submetidos a um período de jejum de 60 minutos, em placas de Petri, e em seguida foram colocados em plantas de soja infectadas, por um período de 30 minutos, para aquisição do vírus. Posteriormente foram transferidos 10 pulgões por plantas de soja sadia (cv. Santa Rosa) onde ficaram por 24 horas tendo sido inoculadas 10 plantas em cada teste com três repetições. Após esse período, os insetos foram eliminados com a aplicação de Orthene 750Br (Acephate) e as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação.

3.5 Microscopia eletrônica

A observação dos cortes ultrafinos de tecidos foliares de soja, infectados com o VABS, foi feita ao microscópio eletrônico de transmissão. Para a obtenção dos cortes, foram utilizados pequenos fragmentos de folhas apresentando sintomas característicos e também de folhas de soja sadia, utilizadas como controle. Os pedaços de folhas foram fixados com o fixador Karnovsky modificado (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 4%, cloreto de cálcio 5 mM e tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2). Os fragmentos foram lavados durante dez minutos, por três vezes, com tampão cacodilato 0,1 M, e em seguida pós-fixados em tetróxido de ósmio 2% diluído em tampão cacodilato 0,2 M, pH 7,2, por uma hora, à temperatura ambiente. Após essa fixação, os fragmentos foram contrastados em bloco durante a noite, a 4 °C, em acetato de uranila 2%, e após lavados durante cinco minutos, por três vezes, em solução salina 0,9%. Em seguida foi feita a desidratação em séries crescentes de acetona

em água a 25%, 50% e 70% por cinco minutos, seguindo-se dois tratamentos de dez minutos cada um, com acetona 90%; e por último três tratamentos de vinte minutos cada um com acetona pura. O passo seguinte foi a infiltração dos fragmentos em Spurr (5 g de “vinilyclohexene dioxide”, 3 g de “diglycidyl ether of propyleneglycol”, 13 g de “nonenyl succine anhidride” e 0,2 g de “dimethyl amino ethanol”), dissolvido em acetona da seguinte forma: Spurr + acetona (1:1) por três horas à temperatura ambiente; Spurr + acetona (2:1) por três horas a temperatura ambiente e Spurr a 4 °C por toda a noite.

No dia seguinte, os fragmentos foram transferidos para moldes de borracha, que foram preenchidos com Spurr e colocados em estufa a 80 °C por doze horas para polimerização da resina, formando o bloco. Os cortes ultrafinos foram feitos no ultramicrotomo REICHERT-JUNG e colocados em grades de cobre (400 mesh) previamente cobertas com colódio e metalizadas com carbono. Esses cortes foram contrastados com acetato de uranila 3% por 20 minutos, lavados com água bidestilada, e contrastados novamente com citrato de chumbo durante dez minutos e lavados com água bidestilada. Os cortes foram observados no microscópio eletrônico de transmissão EM-109 Zeiss e fotografados.

3.6 Clonagem e seqüenciamento

3.6.1 Purificação parcial do vírus

A purificação parcial do vírus foi feita utilizando-se o protocolo descrito por Lane (1992). Foram utilizadas, na purificação, 4 g de folhas de soja infectada, quinze dias após a inoculação, maceradas com auxílio de nitrogênio líquido, na presença de 15 ml de tampão citrato de amônia (0,1 M, pH 6.5) contendo 150 µl de iodoacetamida (0,25 M), 150 µl de Na-Dieca (0,15 M) e 50 µl de 2-Mercapthoetanol. O extrato foi filtrado em gaze, transferido para tubos e centrifugado a 8.000 g (rotor SA600) por 10 minutos. O sobrenadante foi clarificado com 0,5 ml de Triton-X100 sob agitação, até total dissolução do

Triton. Em seguida fez-se centrifugação em almofada de sacarose (20%) a 29.000 rpm por 150 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense durante a noite em 1 ml de tampão fosfato (0,02 M pH 7,2) a 4 °C. Após a centrifugação, a 14.000 rpm por 5 minutos, o vírus em solução foi coletado e armazenado a 4 °C .

3.6.2 Extração do RNA viral

A extração do RNA viral foi feita a partir de 100 µl do vírus parcialmente purificado (item 3.6.1), diluído em 100 µl de água ultra pura autoclavada, 50 µl do tampão de extração (Tris-glicina 0,2 M; NaCl 0,2 M; EDTA 20 mM; pH 9,5) , 20 µl de SDS (20%) e 2,7 µl de Proteinase K (20 mg/ml). A solução foi agitada, centrifugada a 14.000 rpm por 2 minutos (Centrífuga Eppendorf 5402) e incubada em banho-maria a 37 °C, por 1 hora. As proteínas virais foram removidas pela adição de fenol/clorofórmio (1:1 v/v), agitação e centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa (250 µl) foi transferida para tubo limpo e novamente submetida ao tratamento com fenol/clorofórmio, agitando e centrifugando a 14.000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para tubo limpo e o RNA precipitado pela adição de 1/20 do volume de NaOAc (3M, pH 5,5) e 2,5 volumes de etanol absoluto. Após incubação por 1 hora a -20 °C, o RNA foi recolhido por centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 ml de etanol a 70% e centrifugado a 14.000 rpm por 2 minutos. O precipitado foi seco a vácuo por 5 minutos, ressuspense com 20 µl de água ultra pura autoclavada, corado com brometo de etídeo, observado em gel de agarose (0,9%) e armazenado a -80 °C para posterior uso.

3.6.3 RT-PCR

Para síntese do cDNA foram utilizados 5 µl do RNA viral, 1 µl do oligonucleotídeo iniciador Oligo T14 (TTT TTT TTT TTT TT) e 6 µl de água. Os tubos foram incubados a 70 °C por 10 minutos e imediatamente colocados no gelo por, no mínimo, um minuto. Adicionaram-se, então, 2 µl do tampão da reação 10X (0,5 M Tris-HCl; 0,7 M KCl; 0,1 M MgCl₂ pH8,0), 2 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl dNTP (10 mM), 2 µl DTT (0,1 M) e 1 µl da enzima transcriptase reversa, incubando por 1 hora a 37 °C. Em seguida fez-se a incubação da reação por 15 minutos a 70 °C para inativação da enzima e o cDNA foi armazenado a -80 °C para posterior utilização em PCR.

A reação da polimerase em cadeia foi empregada para amplificação de parte do genoma do VABS, a partir do cDNA armazenado. Foram utilizados 5 µl do tampão da reação (10X), 3 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl de dNTP, 1 µl da Taq DNA Polimerase, 1 µl do oligonucleotídeo iniciador Oligo T14 (TTT TTT TTT TTT TT), 1 µl do oligonucleotídeo iniciador degenerado para *Potyvirus* (GCG GGA TCC GTN TGY GTN GAY GAY TTT YAA YAA) e 5 µl do cDNA. O volume foi completado para 50 µl com água ultra pura autoclavada.

A reação consistiu de 30 ciclos, com a desnaturação da fita por 1 minuto a 94 °C, anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores por 2 minutos a 42 °C e extensão da fita por 2 minutos a 72 °C. Uma alíquota de 5 µl do produto amplificado foi analisada por eletroforese em gel de agarose (0,9%), em tampão Tris-borato-EDTA (TBE), corado com brometo de etídeo, e o restante foi armazenado a -20 °C.

3.6.4 Clonagem

Os fragmentos amplificados por PCR foram clonados no vetor pCR 2.1, utilizando o "kit" TOPO TA (Invitrogen, San Diego, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Foram utilizados 2 µl do produto fresco da



PCR, 1 μ l do plasmídeo PCR TOPO vector e 2 μ l de água esterilizada. A reação foi incubada por cinco minutos à temperatura ambiente e 2 μ l foram transferidos para tubos contendo células competentes de *E. coli* acrescidas de 2 μ l de Beta-Mercaptoethanol. Os tubos foram colocados por 30 minutos no gelo, 60 segundos em banho-maria a 42 °C e novamente no gelo por dois minutos. Após adição de 250 μ l de meio SOC, o material foi incubado sob agitação por 30 minutos, a 37 °C.

Para crescimento das colônias utilizaram-se placas de Petri com meio sólido 2YT (16g Triptona, 10g Extrato de Levedura e 5g NaCl em 1000 ml de água destilada) contendo ampicilina, previamente revestidas com 2YT líquido (40 μ l), X-GAL (50 μ l) e IPTG (10 μ l). 150 μ l das células bacterianas foram espalhados em cada placa com alça de Drigalski, e as placas foram incubadas a 37 °C durante a noite.

As colônias transformadas (brancas) foram individualmente transferidas para tubos contendo 2,5 ml de 2YT líquido. Os tubos foram incubados a 37 °C sob agitação, por 12 horas.

3.6.5 Purificação do plasmídeo

A purificação dos plasmídeos, para seqüenciamento, foi feita pelo método de Acetato de sódio (NH_4Oac) (Sambrook et al., 1998). 1,5 ml de células bacterianas foram transferidos para tubos de microcentrífuga e submetidos a 14.000 rpm por dois minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em 100 μ l da solução I (25 mM Tris HCl pH 8,0; 10 mM EDTA e 50 mM D-Glucose), deixando em repouso por cinco minutos à temperatura ambiente. Em seguida adicionaram-se 200 μ l da solução II (0,2 N NaOH e 1% SDS) misturando gentilmente por inversão dos tubos. Após cinco minutos em repouso no gelo, foi adicionada a solução III (150 μ l de NH_4Oac 10,5 M). Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um tubo limpo

e o plasmídeo foi precipitado pela adição de 600 µl de isopropanol, incubação no gelo e centrifugação. O precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 70% e ressuspenso em 25 µl de TE + RNase.

Todos os plasmídeos foram colocados em um mesmo tubo completando o volume, com TE livre de RNase, para 500 µl. Adicionou-se o mesmo volume de fenol/clorofórmio (1:1). A fase aquosa (400 µl), após agitação e centrifugação, foi transferida para um tubo limpo, ao qual foi adicionado volume igual de clorofórmio para retirar o excesso de fenol. Novamente transferiu-se a fase aquosa para um tubo limpo, ao qual foi adicionado 1/10 do volume de NaOAc (3M pH 5,5) e 2,5 volumes de etanol absoluto. Nessa fase o tubo foi colocado no freezer -80 °C para precipitação do DNA. Após centrifugação, o precipitado foi lavado em etanol 70%, ressuspenso em 20µl de TE livre de RNase, sendo então utilizado para o seqüenciamento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Inoculação mecânica em hospedeiras diversas

Os sintomas apresentados pelas plantas inoculadas mecanicamente podem ser observados na tabela 1. Algumas das espécies testadas não apresentaram sintomas, como a maioria das Solanáceas e todas as Cucurbitáceas.

Dentre as Solanáceas testadas, apenas *Nicotiana benthamiana* foi infectada apresentando inicialmente clareamento das nervuras, seguido por um mosaico leve (Figura 2A). Nas espécies testadas, que não apresentaram sintomas, foi feita a retroinoculação para confirmar se o vírus poderia ser recuperado das plantas inoculadas. Entretanto não foi possível recuperar o vírus de nenhuma das plantas assintomáticas.

As espécies *Chenopodium amaranticolor*, *Carica papaya*, *Alternanthera tenella*, e *C. quinoa* demonstraram ser ótimas diferenciadoras para o VABS pelo fato de terem apresentado lesões locais nas folhas inoculadas (Figuras 2B, C e D).

Das plantas testadas da família das Leguminosas, excluindo o feijoeiro Carioca, todas as demais espécies da família foram infectadas de forma sistêmica pelo VABS e SMV. O Feijoeiro carioca se mostrou resistente ao SMV, porém reagiu ao VABS com severa necrose das nervuras nas folhas inoculadas, bem como infecção sistêmica nas folhas novas, com morte dos ponteiros (Figura 3). As plantas de soja infectadas com o VABS apresentaram sintomas como clareamento das nervuras, encarquilhamento, morte dos ponteiros e um amarelecimento generalizado dos brotos (Figura 4).

Nas demais Leguminosas, os sintomas induzidos pelo VABS foram bem mais severos que os provocados pelo SMV. As plantas que apresentaram lesões locais foram consideradas como excelentes indicadoras para o VABS, podendo ser usadas na sua diagnose.

TABELA 1. Suscetibilidade apresentada por plantas silvestres e cultivadas, inoculadas mecanicamente com VABS. Lavras-MG, 2000.

Espécies de Plantas	Sintomas apresentados
<i>Alternanthera tenella</i>	ACL/0
<i>Bidens pilosa</i>	0/0
<i>Canavalia sp</i>	0/M; E; B
<i>Capsicum annuum</i>	0/0
<i>Carica papaya</i>	LLN/0
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LLN/0
<i>Chenopodium murale</i>	0/0
<i>Chenopodium quinoa</i>	LLN/0
<i>Cucurbita maxima</i>	0/0
<i>Cucurbita pepo</i>	0/0
<i>Datura stramonium</i>	0/0
<i>Lactuca sativa</i>	0/0
<i>Lycopersicon esculentum</i>	0/0
<i>Nicotiana benthamiana</i>	0/M; CNe
<i>Nicotiana glutinosa</i>	0/0
<i>Nicotiana rustica</i>	0/0
<i>Nicotiana tabacum</i>	0/0
<i>Passiflora sp</i>	0/0
<i>Phaseolus vulgaris (Carioca)</i>	NNe/ E;MP
<i>Phaseolus vulgaris (Preto Campinas)</i>	NNe/ M; MP
<i>Physalis floridana</i>	0/0
<i>Vigna unguiculata</i>	0/M

Sintomas em folhas inoculadas/folhas não inoculadas: ACL (anéis cloróticos locais); B (bolhosidade); CNe (clareamento das nervuras); E (encarquilhamento); LLN (lesão local necrótica); M (mosaico); ML (mosaico leve); MP (morte prematura); NNe (necrose das nervuras); 0 (sem sintomas).

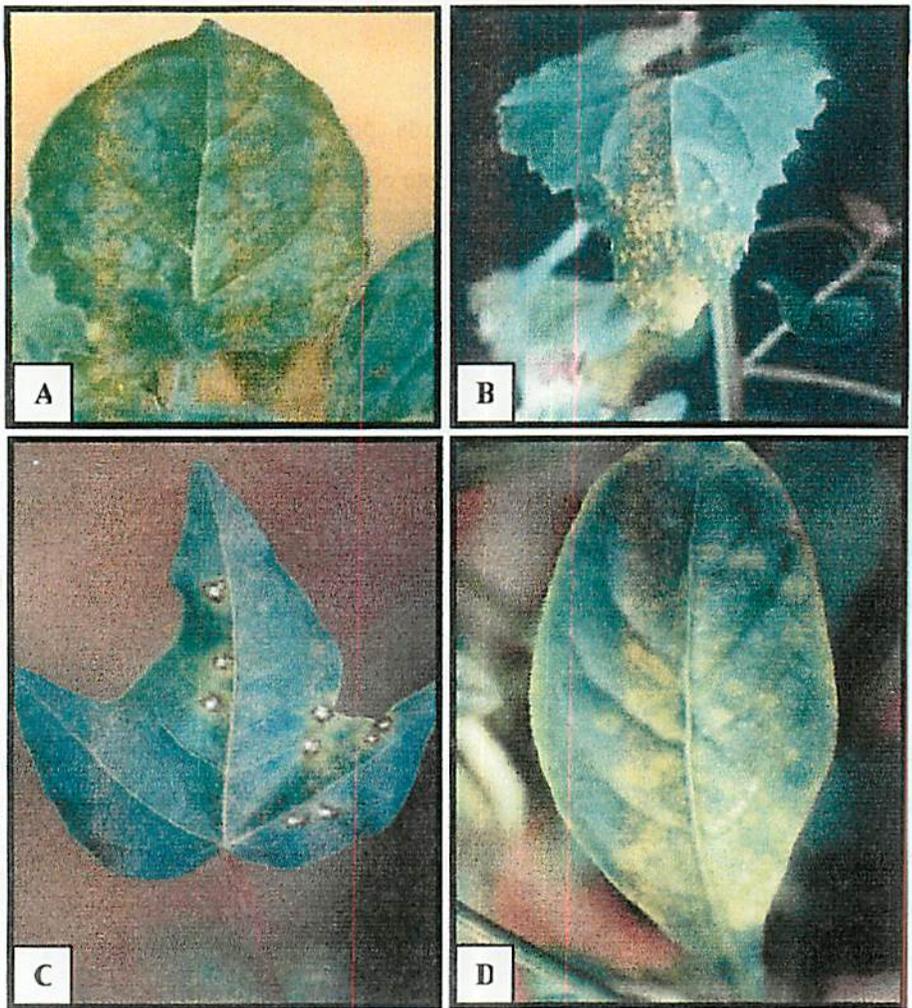


FIGURA 2. Sintomas provocados por VABS em hospedeiras. A: folha de *Nicotiana benthamiana* apresentando clareamento das nervuras decorrente de infecção sistêmica pelo VABS, 15 dias após inoculação mecânica. B, C e D: folhas de *Chenopodium amaranticolor*, *Carica papaya* e *Alternanthera tenella* (respectivamente) apresentando lesões locais, cerca de 20 dias após inoculação.



FIGURA 3. Planta de feijoeiro, cv. Carioca, infectada com o VABS, apresentando severa necrose das nervuras e morte do ponteiro, 25 dias após inoculação.



FIGURA 4. Planta de soja cv. Santa Rosa infectada com o VABS apresentando sintomas de mosaico, encarquilhamento, bolhosidade e amarelecimento dos brotos novos, 45 dias após inoculação.

4.2 Efeito do VABS e do SMV em oito cultivares de soja

O efeito da inoculação do VABS e do SMV na produção de vagens de oito cultivares de soja, pode ser avaliado pelos resultados discriminados na tabela 2 e figura 5. Pode-se verificar que a maioria das cultivares responderam de modo bastante distinto a cada um desses vírus. As cultivares IAC-8 e UFV-5 foram suscetíveis a ambos os vírus, porém com uma maior suscetibilidade ao VABS. Essas duas cultivares apresentaram porcentagens semelhantes de redução no número de vagens, quando infectadas com o VABS, tendo sido de 72,1 e 69,9% respectivamente. Quando infectadas com o SMV, essa redução foi de 50,4 e 52,1%. A cultivar Doko foi altamente resistente ao VABS (9,4% de redução) e suscetível ao SMV (77,7 % de redução). Ao contrário, as cultivares Paraná, Numbaíra e Cristalina foram resistentes ao SMV e suscetíveis ao VABS, apresentando reduções de 44,5, 99,7 e 51,7%, respectivamente. Observou-se que algumas plantas da cultivar Numbaíra nem chegaram a produzir vagens e sementes.

As demais cultivares, UFV-1 e UFV-4, apresentaram resultados semelhantes, e não tiveram redução considerável no número de vagens quando infectadas com ambos os vírus. Apenas a cultivar UFV-1 apresentou uma redução de 6,7 %, quando infectada com o VABS e de 9,9% quando infectada com o SMV, porém estas não foram estatisticamente diferente das plantas controle.

TABELA 2. Efeito dos vírus ABS e SMV na produção de vagens de oito cultivares de soja (*Glycine max* L. (Merrill) e redução em relação à testemunha. Lavras, MG, 1999.

Cultivar	Número de vagens por planta sadia (NVS), planta infectada (NVI) e porcentagem de redução (%R) provocados pelo VABS e SMV				
	VABS		Testemunha	SMV	
	NVI	%R	NVS	NVI	%R
Cristalina	24,3 bA	51,7 aB	81,3 aA	56,0 aA	32,9 aA
Doko	20,5 aA	9,4 bC	19,6 aD	4,3 bD	77,7 aA
IAC-8	17,0 cA	72,1 aA	63,0 aB	31,0 bB	50,4 bA
Numbaíra	0,7 bB	99,7 aA	24,0 aC	27,0 aB	4,4 bB
Paraná	18,0 bA	44,5 aB	31,0 aC	35,0 aB	6,0 bB
UFV-1	17,2 aA	6,7 aC	18,0 aD	16,5 aC	9,9 aB
UFV-4	19,1 aA	0 aD	16,0 aD	17,2 aC	0 aB
UFV-5	27,0 bA	69,9 aA	91,0 aA	40,2 bB	52,1 aA

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

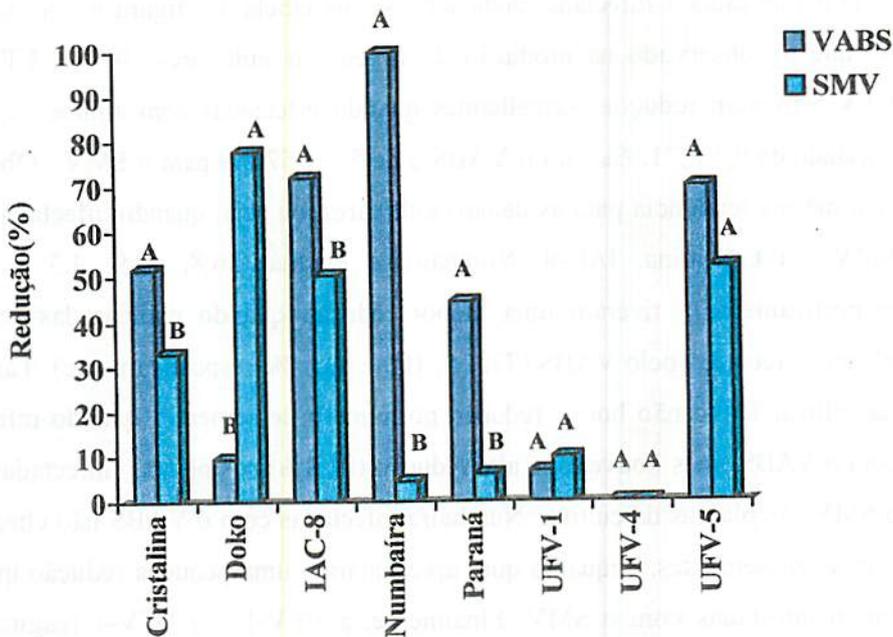


FIGURA 5. Redução da produção de vagens de oito cultivares de soja (*Glycine max* L. (Merrill)) infectadas com os vírus ABS e SMV em relação à testemunha. Lavras, MG, 1999.

Esses resultados são bastante interessantes, pois permitem detectar e caracterizar as fontes de resistência para ambos os vírus, podendo constituir uma primeira etapa para chegar à sua origem. Pode-se observar, pela reação das cultivares Doko, Numbaira e Paraná, que a resistência a esses dois *Potyvirus* é controlada por genes distintos. Para descobrir a origem dessa resistência, basta analisar a genealogia das cultivares estudadas para verificar se há uma origem comum, uma vez que foi encontrada resistência somente ao VABS (Doko) ou somente ao SMV (Paraná, Numbaira e Cristalina) e também a ambos os vírus (UFV-1 e UFV-4).

O efeito do VABS e do SMV no número de sementes produzidas por cada planta sadia e infectada, pode ser vista na tabela 3 e figura 6. A exemplo do que foi observado na produção de vagens, as cultivares UFV-1, UFV-4 e UFV-5 tiveram reduções semelhantes quando infectadas com ambos os vírus, variando de 9,3 a 71,9% para o VABS e de 5,2 a 57,2% para o SMV. Observa-se a mesma tendência para as demais cultivares, ou seja, quando infectadas com SMV, a Cristalina, IAC-8, Numbaíra e Paraná (36,8; 49,9; 4,3 e 4,7%, respectivamente) tiveram uma menor redução quando comparadas com as plantas infectadas pelo VABS (73; 75; 100 e 60,6 %, respectivamente). Também na cultivar Doko não houve redução no número de sementes quando infectada com o VABS, mas houve uma alta redução (81,8%) nas plantas infectadas com o SMV. As plantas da cultivar Numbaíra infectadas com o VABS não chegaram a produzir sementes, enquanto que apresentaram uma pequena redução quando foram infectadas com o SMV. Finalmente, a UFV-1 e a UFV-4 reagiram de forma semelhante aos dois vírus, apresentando uma redução de 16,3 e 9,3% para o VABS e 13,2 e 5,2%, para o SMV. Pelos dados das tabelas 2 e 3 pode-se observar que as cultivares UFV-1, UFV-4 e Doko foram as mais resistentes e a Numbaíra foi a mais suscetível ao VABS, enquanto para o SMV, as cultivares Numbaíra, Paraná, UFV-1 e UFV-4 foram as mais resistentes e a Doko a mais suscetível.

TABELA 3. Efeito dos vírus ABS e SMV na produção de sementes de oito cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e redução em relação à testemunha. Lavras, MG, 1999.

Cultivar	Número de sementes por planta sadia (NSS), planta infectada (NSI) e porcentagem de redução (%R) provocados pelo VABS e SMV				
	VABS		Testemunha	SMV	
	NSI	%R	NSS	NSI	%R
Cristalina	33,5 bA	73 aB	152,0 aA	97,3 aA	36,8 bB
Doko	37,7 aA	9,8 bC	35,1 aE	6,3 bC	81,8 aA
IAC-8	20,4 cA	75 aB	105,4 aB	52,2 bA	49,9 bB
Numbaíra	0 bB	100 aA	46,5 aD	56,1 aA	4,3 bC
Paraná	27,3 bA	60,6 aB	67,3 aC	65,3 aA	4,7 bC
UFV-1	27,4 aA	16,3 aC	33,0 aE	28,7 aB	13,2 aC
UFV-4	29,9 aA	9,3 aC	25,2 aE	29,7 aB	5,2 aC
UFV-5	44,5 bA	71,9 aB	159,5 aA	56,6 bA	57,2 aB

*Média seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

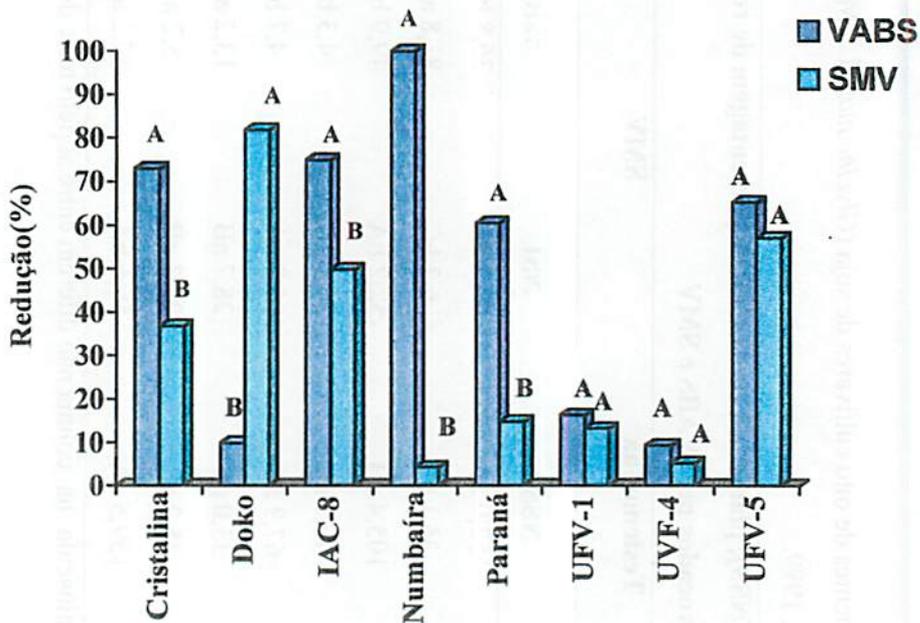


FIGURA 6. Redução na produção de sementes de oito cultivares de soja (*Glycine max* L. (Merrill)) infectadas com o VABS e SMV em relação à testemunha. Lavras, MG, 1999.

O peso de 100 sementes e a produção total (em gramas) por planta podem ser observados na tabela 4 e nas figuras 7 e 8. A redução no peso de 100 sementes provocada pela infecção com VABS, variou de 6,8 (cv. Paraná) a 25,4 % (cv. Cristalína), enquanto para a cultivar Numbaíra, não houve produção de sementes, portanto considera-se que a redução foi de 100% quando comparada com a testemunha. As cultivares Cristalína, IAC-8, Paraná e UFV-5 foram as que mostraram a maior porcentagem de redução na produção total da planta. Isso foi devido a uma combinação na redução do número de sementes e

vagens por planta com a redução no peso das sementes. Para o SMV, essa redução variou de 27,3% para a cultivar UFV-1 a 87,2% para a Doko, enquanto a Numbaíra continuou sem nenhuma redução, a exemplo do que foi observado para a produção de vagens e sementes. Costa (1977) também observou uma redução significativa no peso das sementes de diversas cultivares de soja infectadas com o SMV, e notou que as sementes manchadas em 50 a 100% de sua área tenderam a apresentar um maior decréscimo no seu peso.

TABELA 4. Efeito dos vírus ABS e SMV no peso de cem sementes e produção por planta sadia e infectada de oito cultivares de soja (*Glycine max* L. (Merrill)), Lavras, MG, 1999.

Cultivar	VABS						Planta sadia						SMV								
	Peso de 100 sementes (PS) e produção (Pr/P), em gramas, por planta sadia e infectada com VABS e SMV com respectivas porcentagens de redução						%						%								
	PS	%R	Pr/P	%R	PS	Pr/P	PS	Pr/P	PS	%R	Pr/P	PS	%R	Pr/P	%R						
Cristalina	14,0 bB	25,4 bB	5,8 cA	75,2 aA	18,5 aA	28,1 aA	10,6 cB	42,9 aA	10,2 bA	63,9 aA	Doko	13,1 bC	12,5 bB	4,9 aA	19,2 bB	15,0 aC	5,3 aD	10,5 cB	29,8 aB	0,7 bC	87,2 aA
IAC-8	15,1 bA	16,3 aB	3,8 cB	79,2 aA	18,3 aA	19,1 aB	12,1 cB	33,6 aA	6,3 bA	66,1 aA	Numbaíra	0 cE	100 aA	0 bC	100 aA	14,1 bC	6,6 aD	15,0 aA	0 bC	8,4 aA	0 bD
Paraná	15,4 aA	6,8 bB	4,2 bB	62,4 aA	16,3 aB	10,8 aC	9,7 bB	40,3 aA	6,4 bA	38,7 aB	UFV-1	11,6 bD	14,9 aB	3,2 aB	26,9 aB	13,7 aC	4,5 aD	10,8 bB	20,9 aB	3,1 aB	27,3 aC
UFV-4	15,8 aA	7,2 bB	4,7 aA	13,2 aB	16,5 aB	4,2 aD	8,6 bB	48,2 aA	2,5 aB	42,6 aB	UFV-5	14,7 aB	9,9 bB	6,5 bA	69,6 aA	16,2 aB	25,7 aA	9,5 bB	41,2 aA	6,5 bA	73,9 aA

*Média seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

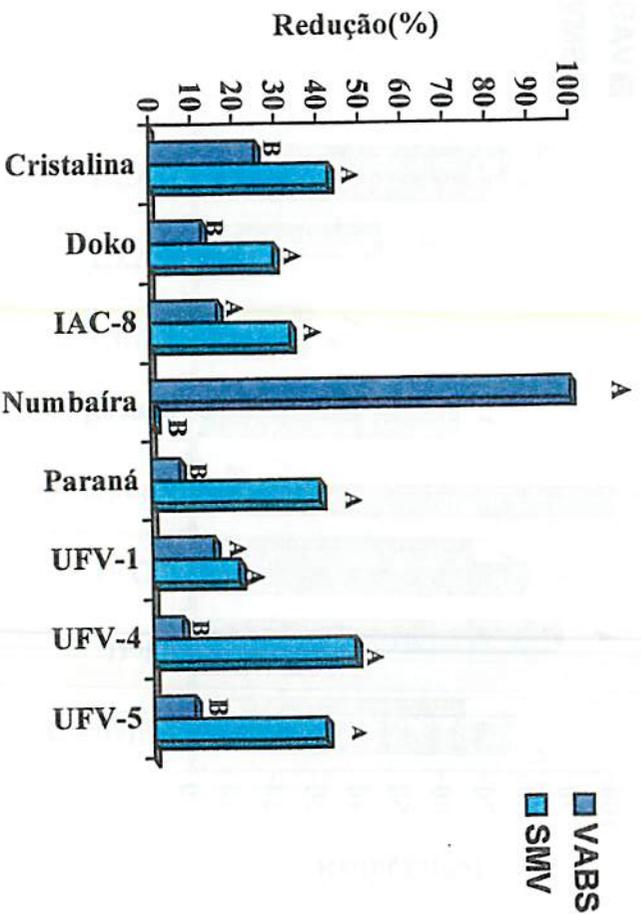


FIGURA 7. Redução do peso de cem sementes de oio cultivares de soja (*Glycine max* L. (Merrill)) infectadas com os vírus ABS e SMV em relação à testemunha. Lavras, MG, 1999.

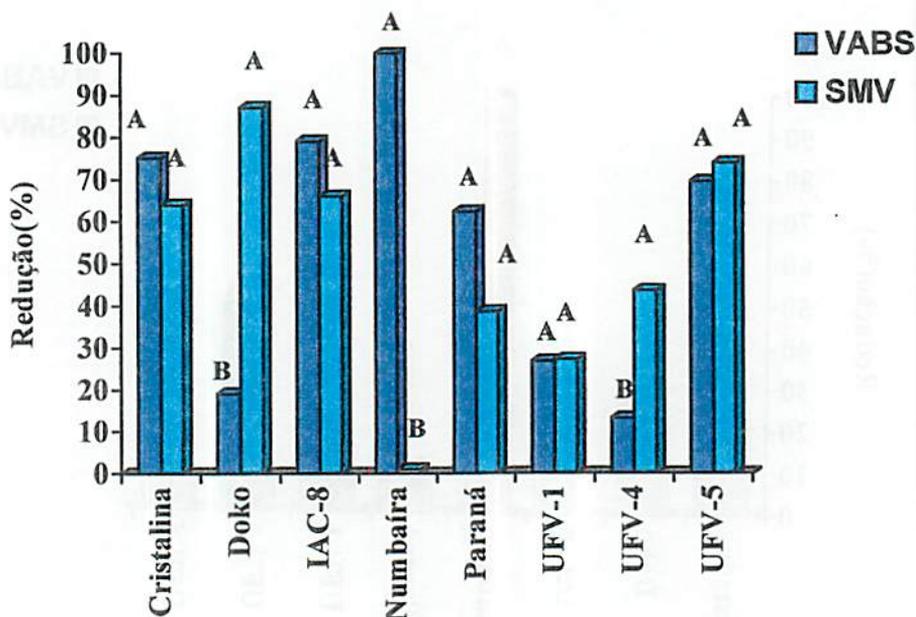


FIGURA 8. Efeito dos vírus ABS e SMV na redução da produção por planta de oito cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) em relação à testemunha. Lavras, MG, 1999.

Em relação à produção de sementes manchadas (Tabela 5), observou-se que ambos os vírus induziram essas manchas em maior ou menor intensidade dependendo da cultivar analisada. O VABS induziu as maiores porcentagens de sementes manchadas nas cultivares suscetíveis (22,6 a 78,5%), enquanto o SMV induziu porcentagens menores (28,7 a 59,4%), porém em um maior número de cultivares, inclusive nas mais resistentes, como UFV1 (28,7%) e UFV4 (29,4%). A análise de variância mostrou que houve efeito dos tratamentos (vírus ABS e SMV) e das cultivares no número de vagens, número de sementes de soja e

número de sementes manchadas nas condições estudadas.

TABELA 5. Efeito dos vírus ABS e SMV na pigmentação das sementes de soja (*Glycine max* L. Merrill), Lavras, MG, 1999.

Cultivar	Porcentagem (%) de sementes manchadas em plantas sadias, infectadas com o VABS e o SMV		
	Testemunha	VABS	SMV
Cristalina	0 cA	78,5 aA	30,5 bA
Doko	0 cA	6,3 bB	30,2 aA
IAC-8	0 bA	58,7 aA	49,0 aA
Numbaíra	0 aA	0,0 aB	0,2 aA
Paraná	0 cA	22,6 bB	59,4 aC
UFV-1	0 bA	0,1 bB	28,7 aA
UFV-4	0 bA	0,0 bB	29,4 aA
UFV-5	0 bA	68,1 aA	43,1 aA

*Média seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

O fato de o VABS também induzir o aparecimento de manchas nas sementes das cultivares de soja infectadas mostra que ele é um vírus que além de causar redução na quantidade de sementes, também afeta de modo bastante significativo a sua qualidade, aumentando os prejuízos causados à planta. Costa (1977), comentando o aparecimento da mancha-café nas plantas infectadas com o SMV, ressaltou que essas constituem o principal prejuízo causado por esse vírus em plantas de soja, podendo prejudicar a germinação, a produção em peso e também o conceito de semente certificada ou fiscalizada, já que a semente seria a principal forma de disseminação desse vírus.

Em estudos anteriores, conduzidos por Deslandes, Costa e Figueira (1984), não se observaram manchas nem a transmissão do VABS através das sementes (Figueira - dados não publicados). Também não conseguiu a transmissão do vírus quando utilizou sementes manchadas das oito cultivares aqui estudadas. Entretanto novos estudos, inclusive envolvendo outras cultivares, devem ser conduzidos para confirmar a não transmissibilidade do VABS através da sementes.

No caso de plantas infectadas com o SMV, Almeida (1981) observou que quanto maior a quantidade de sementes manchadas, maior é a porcentagem de transmissão. Entretanto, é importante salientar que a taxa de transmissão do vírus pelas sementes, depende da cultivar utilizada e da estirpe do vírus (Porto e Hagedorn, 1975; Costa, 1976).

4.3 Transmissibilidade pelo vetor

Os resultados da inoculação por vetores estão discriminados na Tabela 6. O afídeo *Myzus persicae* foi o mais eficiente na transmissão das partículas virais, e 21 das 30 plantas inoculadas, nas três repetições, apresentaram sintomas, perfazendo um total de 70% de transmissão com um tempo de aquisição de 30 minutos. O afídeo *Aphis gossypii* apresentou uma menor eficiência, atingindo a porcentagem de infecção chegou a 40%. As plantas controle, em que foram utilizados afídeos não virulíferos, não apresentaram sintomas.

Os sintomas apresentados pelas plantas inoculadas via vetor foram menos drásticos que os apresentados por plantas inoculadas mecanicamente. Isso provavelmente foi devido a uma menor concentração de partículas inoculadas pelo vetor e também pela ausência do “stress” que ocorre na inoculação mecânica.

TABELA 6. Resultados da inoculação do VABS pelos vetores *Myzus persicae* e *Aphis gossypii*. Lavras – MG, 2000

Afídeo	Número de plantas testadas (PT), plantas infectadas (PI) e porcentagem de infecção (%I)		
	PT	PI	I (%)
<i>M. persicae</i>	30	21	70
<i>A. gossypii</i>	30	12	40

4.4 Microscopia eletrônica

Ao microscópio eletrônico foram observadas inclusões do tipo catavento, típicas de *Potyvirus*, em cortes ultrafinos de folhas de soja infectadas com o VABS (Figuras 9A e 9B). Não foram observadas inclusões em tecidos foliares de plantas de soja sadia.

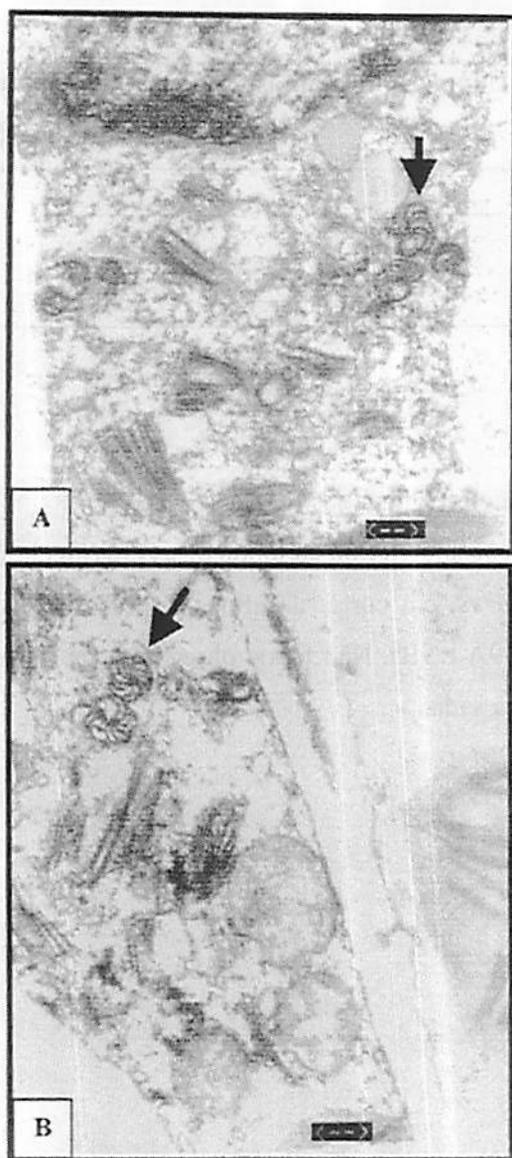


FIGURA 9. Fotomicrografias obtidas ao microscópio eletrônico, de tecidos de plantas de soja, cv. Santa Rosa, infectados com o VABSV. A e B: inclusões citoplasmáticas do tipo catavento, no citoplasma das células, induzidas pelo VABSV. A barra equivale a 4 μm .

4.5 Clonagem e seqüenciamento

O RNA viral, obtido a partir do material minipurificado, foi observado em gel de agarose (0,9%) na forma de uma banda com aproximadamente de 10.000 nucleotídeos (Figura 10), dentro do esperado para *Potyvirus*.

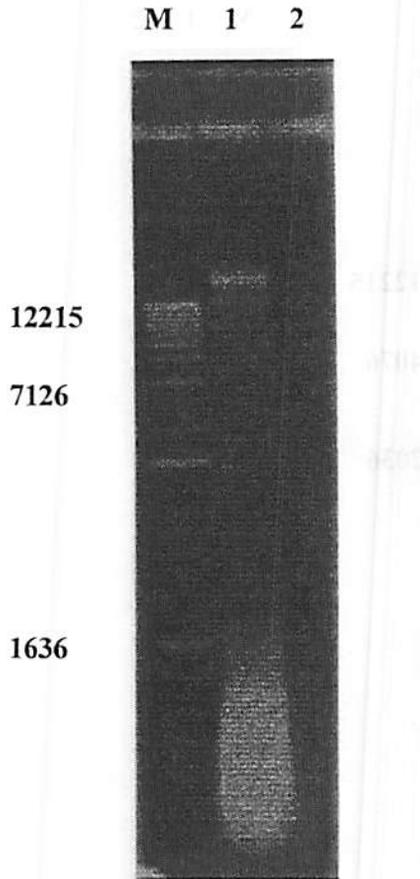


FIGURA 10. Eletroforese do RNA genômico do VABS em gel de agarose 0,9%. M: marcador molecular de DNA (1 Kb “ladder”), 1: VABS e 2: controle negativo. Os comprimentos das bandas (em pares de bases) estão indicados à esquerda no gel.

O fragmento do genoma do VABS, com cerca de 2.000 pb, obtido por RT-PCR, com os oligonucleotídeos iniciadores ("primers") cujas seqüências estão descritas no item 3.5.4, pode ser observado na figura 11. Esse fragmento corresponde às regiões da capa proteica e da proteína Nib.

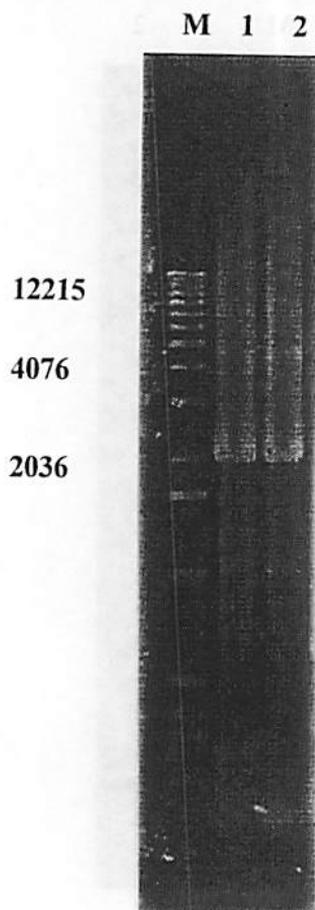


FIGURA 11. Fragmentos de cDNA, amplificados por RT-PCR e analisados em gel de agarose 0,9%. M: marcador molecular de DNA (1 Kb "ladder"); 1 e 2: banda amplificada a partir de RNA extraído de vírus minipurificado de planta de soja infectada com VABS. À esquerda estão indicados os respectivos pesos moleculares.

A clonagem do material obtido por RT-PCR, foi confirmada pela clivagem do plasmídeo recombinante com a enzima *EcoR* I e eletroforese em gel de poliacrilamida, conforme pode ser verificado na figura 12.

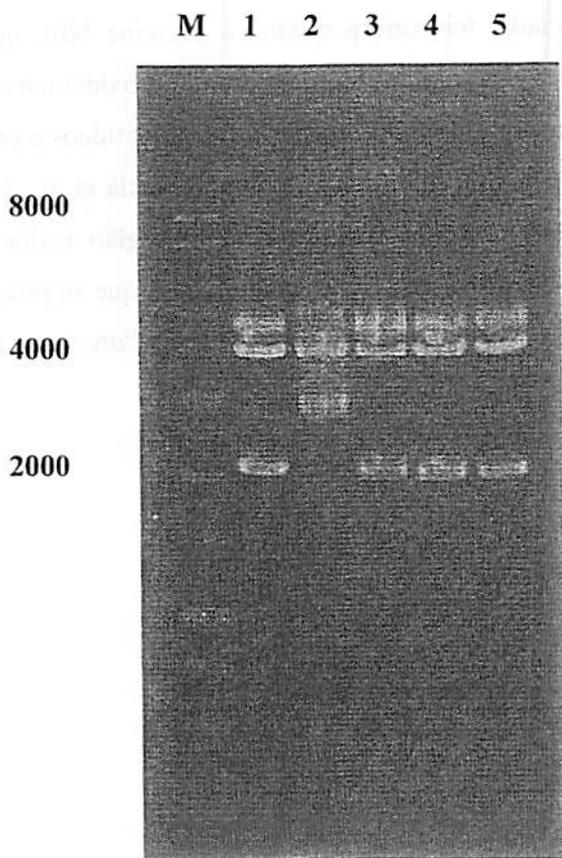


FIGURA 12. Eletroforese, em gel de agarose 0,9%, dos produtos obtidos após a clivagem do plasmídeo recombinante com a enzima de restrição *EcoR* I, M: marcador molecular de DNA (1 Kb “ladder”), 1, 3, 4 e 5: clones do VABS; 2: controle sem clivagem. O tamanho das bandas (em pares de bases) estão indicados à esquerda no gel.

Do fragmento clonado foi possível obter a seqüência com 481

nucleotídeos (Figura 13). Após o alinhamento com outras seqüências disponíveis no Banco Internacional de Genes, a seqüência do VABS apresentou homologia de 88, 88, 80, 76 e 74% com as estirpes G2, G7 do SMV, *Watermelon mosaic virus 2* (WMV2), BCMV e *Peanut stripe virus* (PStV), respectivamente (Tabela 7). A região seqüenciada, foi correspondente à proteína N1b, que é bastante conservada dentro do gênero *Potyvirus* e possui aproximadamente 57 kDa. Como o fragmento seqüenciado foi de apenas 481 nucleotídeos e está localizado numa das regiões mais conservadas dos *Potyvirus* (Shukla et al., 1994) existe a necessidade de se fazer o seqüenciamento de uma região maior do genoma, principalmente a que envolve a proteína capsidial, para que se possa avaliar um pouco melhor o seu relacionamento com outros *Potyvirus* já descritos.

TABELA 7. Porcentagens de homologia das seqüência de nucleotídeos correspondente à proteína Nib do fragmento de VABS em comparação com a seqüência de outros *Polyvirus* depositadas no genBank.

	ABS*	SMVG2	SMVG7	SMV Nib	WMV2	BCMV	PStV
ABS	88	88	88	88	80	76	74
SMVG2		95	95	92	80	76	76
SMVG7			95	95	80	76	77
SMV Nib					81	75	76
WMV2						76	75
BCMV							79
PStV							

*Valores expressos em porcentagem.

Números de acesso no genBank: SMV G2: JQ1661; SMV G7: Q1662; SMV Nib: CAA65445.1; WMV 2: JQ0498;

BCMV: AAB02170.1; PStV: AAB01025.1

VABS GTGGGATCCGCTCGGIGGATGATTTTAAACAACCAGTTCTACAGCCTCAATCTTACATGT
 SMVG7 GGAGCAAAGGTTTGTGTGATGATTTCAACAACCAATTTTACAGTCTCAATCTTACATGT
 SMVNIb GGAGCAAAGGTTTGTGTGATGATTTCAACAACCAATTTTACAGTCTCAATCTTACATGC
 SMVG2 GGAGCAAAGTTTGTGTGATGATTTCAACAACCAATTTTACAGCCTCAATCTTACATGT
 WMV2CP GGAGCTAAAGTTTGCCTGATGATTTCAATAATCAATTTATAGCTTCAATTTAAATGT
 BCMVNIb GGGCGAAGGTGTGTGATGACTTAAACAACCAATTTCTATTCCTTCAACTTAATTTGT
 PStV GGAGCGAAGGTTTGTGTGATGATTTTAAACAACCAATTTCTATAGTCTCAACTTAGAGTGT
 * * ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

VABS CCATGGACAGTTGGTATGACCAAAATTTTACAGAGGTTGGGACAAAGTTGATGAGAAAGTCTA
 SMVG7 CCATGGACAGTCGGGATGACCAAAATTTTATAGAGGTTGGGACAAAGTTGATGAGGAGTTTA
 SMVNIb CCATGGACAGTTGGGATGACAAAATTTTATAGAGGTTGGGACAAAGTTGATGAGAAAGTTTA
 SMVG2 CCATGGACAGTTGGGATGACCAAAATTTTATAGAGGTTGGGATAAGTTGATGAGAAAGTTTA
 WMV2CP CCGTGGACAGTTGGCATGACTAAGTTTATGGGGTTGGGATAAGCTAATGAGAAAGTTTG
 BCMVNIb CCTTGGACGGTAGGAATGACAAAAGTTTGTGGGGCTGGGATAAGTTGATGCGGAGCACTT
 PStV CCATGGACTGTGGGATGACAAAATTTCTATGGAGGATGGGATACCCCTGATGAGGAAAGTTG
 ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

VABS AGGGAATGCTTGAATAATCTATGCTGAAATAGTCTACACACCAATCTTAGCACCTGAT
 SMVG7 AGAGAAATGCTAGAAAACCTCTATGCTGAGATAGTCTACACACCAATTTAGCACCTGAT
 SMVN1b AGAGAAATGCTAGAAAACCTCTATGCTGAGATAGTCTACACACCAATTTAGCACCTGAT
 SMVG2 AGAGAAATGCTAGAGAACCTCTATGCTGAAATAGTCTACACACCAATTTAGCACCTGAT
 WMV2CP AGGGAATGCTTGAAAAACCTTTACGCTGAGATAGTTTACACACCAATCTTAGCACCTGAT
 BCMVN1b AAAGAAATGCTGGAGAAATTTGTATGCTGAAATGCTCTACACGCCAATACTCACACCCAGAT
 PstV GAAGAGATGCTTGAATAATCTGTATGCTGAGATCGTGTACACACCCATATGGCACCCAGAT
 ** ***** ** * ** ***** ** * ** ***** ** * ** ***** **

VABS GGCACAATTTTAAAGAAGTTCAGAGGAACAACAACAGTGGGCAACCACTACAGTTGTGGAC
 SMVG7 GGTACAATTTTAAAGAAGTTCAGAGGAACAACAACAGCGGGCAACCACTACAGTTGTGGAC
 SMVN1b GGTACAATTTTAAAGAAGTTCAGAGGAACAACAACAGCGGGCAGCCATCTACAGTTGTGGAC
 SMVG2 GGCACAATTTTAAAGAAGTTCAGAGGAACAACAACAGTGGGCAACCACTCACAGTTGTGGAC
 WMV2CP GGTACAATTTTAAAAAGTTCAGAGGGAAACAACAGTGGCAGCCATCTACAGTTGTGAC
 BCMVN1b GGGACAATTTTCAAGAAGTTCAGGGGCAATAACAGTGGACAACCTTCAACAGTTGTGGAC
 PstV GGGACAGTGTTTAAAAAGTTCAGAGGAACAACAATAGTGGCAACCTTCCACAGTTGTGGAC
 ** *** * ** * ** ***** ** * ** ***** ** * ** ***** **

VABS AATACCTTGATGGTTGGTAATCGCCATGTACTACTCATGTGTAAAGCAAGGGTGGTCAGA
 SMVG7 AACACCTTGATGG-TAGTCATTGCCGTGTACTATTCTTTGTTGTAG-CAAGGGTGGTCAGA
 SMVNIb AATACCTTGATGG-TGGTCATTGCCATGTACTATTCTTTGTTGTAAGCAAGGTTGGTCAGA
 SMVG2 AATACCTTGATGG-TAGTCATTGCCCTGTACTATTCTTGGTTGTAACAAGGGTGGTCAGA
 WMV2CP AATACACTTATGG-TTGTCACTTGCATATGATATATTTCGTGCTGTAACAAGGCTGGTCAGA
 BCMVNIb AACACACTGATGG-TTGTCACTTCCATGTACTACTCATGCATAAAAGAGGCTGGACTTA
 PStV AACACACTCATGG-TTGTAAATGTCAGTGTATTATTTCATGTCACAAAAGTGGGCTGGAGTGA
 ** ** * **** * ** ** * **** ** ** * ** ** *

VABS TGAGGACATTCAGAAAGATTGG-TGTTTTTCGCCAATGG-TGATGACATCATCCTGGCA
 SMVG7 GGAGGACATTCAGGAAAGATTAG-TGTTTTTCGCCAATGG-TGATGACATCATCCTTGCA
 SMVNIb GGAGGATATTCAGGAAAGATTAG-TGTTTTTCGCCAATGG-TGATGACATCATCCTGGCG
 SMVG2 GGAGGACATTCAGGAAAGATTAG-TGTTTTTCGCCAATGG-CGATGACATCATCCTTGCA
 WMV2CP GGAGGACATTCAGGAAAGGAGGCTGG-TGTTCTTTGCCAATGG-TGATGATATTAATCCTGGCA
 BCMVNIb TGATGATATTCAGGAGAGGCTAG-TTTTCTTTGCCAACGG-TGATGATATTAATCCTAGCA
 PStV TGAAGATATTCAGAGGCGCTTAG-TCCTTCTTTGCCAATGG-GGATGACATCATCCTTTCT
 ** ** * **** * * * * * ** ** * **** ** ** *

VABS	GGT
SMVG7	GTT
SMVNIb	GTT
SMVG2	GTT
WMV2CP	GTT
BCMVNIb	GTT
PStV	GTG
	*

FIGURA 13. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos correspondente a 481 nt, do fragmento amplificado por RT-PCR e clonado no vetor pCR 2.1 com o kit "TA cloning" (Invitrogen, San Diego, EUA). (*) nucleotídeos homólogos.

5 CONCLUSÕES

1. O VABS induziu em plantas de soja, cv. Santa Rosa, o aparecimento de inclusões citoplasmáticas do tipo catavento, típicas da família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*.
2. O VABS foi transmitido pelos afídeos *M. persicae* Sulz. e *A. gossypii* sendo o primeiro mais eficiente na transmissão.
3. Com base nos sintomas induzidos pelo VABS nas plantas hospedeiras testadas, pode-se afirmar que esse é completamente diferente dos demais vírus até hoje descritos infectando soja.
4. As plantas de mamoeiro (*C. papaya*) cv. Solo reagem ao VABS com lesão local necrótica, com halo mais escuro, as de *C. amaranticolor* e *C. quinoa* com lesões circulares cloróticas e as de *A. tenella* com anéis cloróticos, o que as torna excelentes indicadoras para esse vírus.
5. O VABS apresentou uma interação diferencial com as oito cultivares de soja testadas, tendo sido observada desde uma alta suscetibilidade (cv. Numbaíra) até uma alta resistência (cv. Doko).
6. O VABS foi capaz de induzir perdas consideráveis na qualidade (sementes manchadas e/ou deformadas) e na quantidade de produção em 5 das oito cultivares testadas: Numbaíra, Cristalina, IAC-8, UFV-5 e Paraná, sendo que as demais foram bastante resistentes (Doko, UFV-1 e UFV-4).

7. As cultivares de soja testadas mostraram uma reação de suscetibilidade e resistência ao VABS diferentes da mostrada para o SMV, indicando que a resistência a esses dois *Potyvirus* é controlada por genes distintos.
8. O aparecimento de diversas combinações de suscetibilidade e resistência ao VABS e SMV, como a Numbaíra, que é suscetível ao VABS e resistente ao SMV; a Doko, que é resistente ao VABS e suscetível ao SMV, bem como cultivar suscetível (IAC-8) ou resistente (UVF-4) aos dois vírus, podem permitir a detecção dos genes responsáveis por essa resistência.
9. As porcentagens de homologia obtidas através do alinhamento da seqüência de nucleotídeos do VABS com outros *Potyvirus* foram iguais ou maiores que 80% para os seguintes vírus: SMV (estirpes G2 e G7) e WMV2 (*Watermelon mosaic virus* – estirpe 2); de 76% com o BCMV (*Bean common mosaic virus*) e de 74% com o PStV (*Peanut stripe virus*).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL - Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2000, 521 p.
- ALMEIDA, A.M. R. Distribuição e prevalência de estirpes do Vírus do Mosaico Comum da Soja no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, n. 2, p. 349-352, Jun. 1983.
- ALMEIDA, A. M. R. Efeito da utilização de sementes de soja manchadas pelo Vírus do Mosaico Comum, sobre a emergência, rendimento e percentagem de sementes colhidas com mancha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 16, n. 2, p. 241-244, Mar. 1981.
- ALMEIDA, A. M. R. Transmissão experimental do Vírus do mosaico Comum da Soja com afídeo que ocorre em picão preto (*Bidens pilosa*). **Fitopatologia Brasileira**., Brasília, v. 4, n. 3, p. 509-510, Out. 1979.
- ALMEIDA, A.M. R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A. **Doenças da soja (*Glycine max* L.)** In: GALLI, F. (Coord.) Manual de Fitopatologia. 3 ed.. São Paulo: Ceres, 1997.
- ALMEIDA, A. M. R.; SILVEIRA, J. M. Efeito da idade de inoculação de plantas de soja com o Vírus do Mosaico Comum da Soja e da percentagem de plantas infectadas sobre o rendimento e algumas características econômicas. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 8, n.2, p. 229-236. Jun. 1983.

- ANJOS, J. R. N.; LIN, M. T.; KITAJIMA, E. W. Caracterização de um isolado do Vírus do Mosaico Comum da Soja. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 10, n. 2, p.143-158. 1985.
- AUSUBEL, F.M. (ed.). **DNA Sequencing: Overview of DNA sequencing methods in short protocols in molecular biology**. 3rd ed., 1995.
- BLANC, S.; LOPEZ MOYA, J. J. M.; WANG, R.; GARCIA LAMPASONA, S.; THORNBURY, D. W.; PIRONE, T. P.; WANG, R. Y. A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a *Potyvirus*. **Virology**, Orlando, v. 231, n. 1, p.141-147. Apr. 1997.
- BRUNT, A . A .; CRABTREE, K.; DALLWITZ, M.J.; GIBBS, A .J. and WATSON, L. Viruses of plants: descriptions and lists from de VIDE Database. Cambridge: CAB International, 1996. 1484 p.
- CALDER, V. L.; INGERFELD, M. The roles of the cylindrical inclusion protein of a potyvirus in the induction of vesicles and in cell-to-cell spread. **Journal of Structural Biology**, Orlando, v. 105, n. 1/3, p.62-66. Oct./Dec. 1990.
- CÂMARA, G. M. S. (Coord.) **Soja: Tecnologia de Produção**. Piracicaba: Ed. ESALQ, , 1998. 293 p.
- CARRINGTON, J.C.; FREED, D. D.; SANDERS, T. C. Autocatalytic processing of the *Potyvirus* helper component proteinase in *Escherichia coli* and in vitro. **Journal of General Virology**. Reading, v. 63, p. 4459-63, 1989.

- COSTA, A. S. Investigações sobre moléstias da soja no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 3, n. 1, p. 3-30, Jan./Mar. 1977.
- COSTA, C. L. Vetores de vírus de plantas – 1. Insetos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, p. 103-171, 1998.
- CRONIN, S.; VERCHOT, J.; HALDEMAN-CAHILL, R. SCHAAD, M. C.; CARRINGTON, J. C. Long distance movement factor: a transport function of the *Potyvirus* Helper Component Proteinase. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 5, p. 549-559, May 1995.
- DESLANDES, J.A. ; COSTA, A.S.; FIGUEIRA, A.R. Amarelo do Broto da Soja causado por Potyvirus diferente do Mosaico Comum, registrado em Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 10, n. 1/2, p. 25/26, Jan./Jun. 1984. (Resumo 11).
- DOUGHERTY, W. G.; CARRINGTON, J. C.; CARY, S. M. e PARKS, T. W. Biochemical and mutational analysis of a plant virus cleavage site. **Embo Journal**. v. 7, p. 1281-1287, 1988.
- FIGUEIRA, A.R.; ALVES, A.M.C.; KITAJIMA, E. Studies with Soybean Yellow Shoot Virus: new potyvirus detected in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 81, n. 6, 1991. (Resumo)
- FIGUEIRA, A.R.; COSTA, A.S.; REIS, C.H. Mosaico Dourado em certas variedades de soja e feijoeiro associado à infecção pelo vírus do Amarelo do Broto da Soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 2, p. 145, jun. 1987. (Resumo 152)

- FIGUEIRA, A.R.; REIS, C.H.; DESLANDES, J.A. Suscetibilidade de cultivares de soja ao Vírus do Amarelo do Broto (VABS). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, n. 2, jun./1986. (Resumo)
- GAZZONI, D. L.; YORIMIORI, J. T. **Manual de identificação de pragas e doenças da soja**. Brasília: EMBRAPA, 1995, 128 p.
- GOMES, F. P. Curso de estatística experimental. 13 ed. Piracicaba: 1990. 467 p.
- GOUGH, K. H.; SHUKLA, D. D. Nucleotide sequence of Johnsongrass Mosaic Potyvirus genomic RNA. **Intervirolgy**. Basel, v. 36, n. 3, p.181-192, 1993.
- GOVIER, D. A.; KASSANIS, B. Evidence that a component other than the virus particle is needed for aphid transmission acquire Potato Virus Y. **Virology**, Orlando, v. 57, p. 285-286, 1974.
- HONG, Y.; HUNT, A. G. RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. **Virology**, Orlando, v. 226, n. 1, p.146-151, Dec. 1996.
- HONG, Y.; LEVAY, R.; MURPHY, J. F.; KLEIN, P. G.; SHAW, J. G.; HUNT, A. G. A potyvirus polymerase interacts with the viral coat protein and VPg in yeast cell. **Virology**, Orlando, v. 214, n. 1, p. 159-166, Dec. 1995.
- HYONE-MYONG, E. **Enzimology primer for recombinant DNA technology**. Academic Press, Inc. 1996, 702 p.

- JOHANSEN, I. E.; DOUGHERTY, W. G.; KELLER, K. E.; WANG, D.; HAMPTON, R. O. Multiple viral determinants affect seed transmission of pea seedborne mosaic virus in *Pisum sativum*. **Journal of General Virology**, Reading, v. 77, pt. 12, p. 3149-3154, Dec. 1996.
- KASSCHAU, K. D.; CARRINGTON, J. C. Requirement of HC-Pro processing during genome amplification of *Tobacco Etch Potyvirus*. **Virology**, Orlando, v. 209, n. 1, p. 268-273, May 1995.
- KASSCHAU, K. D.; CRONIN, S.; CARRINGTON, J. C. Genome amplification and long distance movement functions associated with the central domain of Tobacco Etch Potyvirus helper component proteinase. **Virology**. Orlando, v. 228, n. 2, p. 251-262, Feb. 1997.
- LAIN, S.; MARTIN, M. T.; RIECHMAN, J. L.; GARCIA, J. J. Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection-nucleic acid-stimulated ATPase activity of the Plum pox potyvirus helicase-like protein. **Journal of Virology**, Washington, v. 65, n. 1, p. 1-6, Jan. 1991.
- LANGENBERG, W. G.; ZHANG, L. Immunocytology shows the presence of Tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. **Journal of Structural Biology**, Orlando, v. 118, n. 3, p. 243-247, Apr. 1997.
- LIMA NETO, V. C. Triagem de variedades, linhagens e introduções de soja para resistência ao Vírus do Mosaico comum da Soja. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, Curitiba, v. 2, p. 4-8, 1980.

- LIMA NETO, V. C. & COSTA, A. S. Influência da idade da planta e do número de vectores na transmissão do Mosaico comum da Soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 4, n. 3, p. 397-400, Out. 1979.
- LIMA NETO, V. C. & COSTA, A. S. Localização de resistência ao Vírus do Mosaico Comum da Soja. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 1, n. 3, p. 221-230, Set. 1975.
- MAIA, I. G.; BERNARDI, F. Nucleic acid-binding properties of a bacterially expressed Potato virus Y helper component-proteinase. **Journal of General Virology**, Reading, v. 77, pt. 5, p. 869-877, May 1996.
- MAIA, I. G.; HAENNI, A. L.; BERNARDI, F. Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. **Journal of General Virology**, Reading, v. 77, pt. 7, p.1335-1341, July 1996.
- MURPHY, J. F.; JARLFORS, U.; SHAW, J. G. Development of cylindrical inclusions of potyvirus-infected protoplasts. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n. 4, p. 371-374, Apr. 1991.
- PASSAGLIA, L.M.P. & ZAHA, A. Técnicas de DNA recombinante. In **Biologia molecular básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996. 336 p.
- PRUSS, G.; GE, X.; SHI, X. M.; CARRINGTON, J. C.; VANCE, V. B. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 6, p. 859-868, June 1997.

- RESTREPO-HARTWIG, M. A.; CARRINGTON, J. C. Regulation of nuclear transport of a plant potyvirus protein by autoproteolysis. **Journal of General Virology**, Washington, v. 66, n. 9, p. 5662-5666, Sept. 1992.
- REVERS, F.; YANG, S. J.; WALTER, J.; SOUCHE, S.; LOT, H.; GALL, O. L.; CANDRESSE, T.; DUNEZ, J.; LE GALL, O. Comparison of the complete nucleotide sequences of two isolates of Lettuce Mosaic Virus differing in their biological properties. **Virus Research**, Amsterdam, v. 47, p.167-177, 1997.
- RODRIGUEZ-CEREZO, E.; AMMAR, E. D.; PIRONE, T. P.; SHAW, J. G. Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. **Journal of General Virology**, Reading, v. 74, pt. 9, p. 1945-1949, Sept. 1993.
- RODRIGUEZ-CEREZO, E.; SHAW, J. G. Two newly detected nonstructural viral proteins in potyvirus-infected cells. **Virology**, Orlando, v. 185, n. 2, p. 572-579, Dec. 1991.
- ROJAS, M. L. ZERBINI, F. M.; ALLISON, R. F.; GILBERTSON, R. L.; LUCAS, W. G. Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. **Virology**, Orlando, v. .237, n. 2, p. 283-295, Oct. 1997.
- SANGER, F. Determination of nucleotide sequences in DNA. **Science**, Madison, v. 214, p. 1205-1214, Dec. 1981.

- SANTOS, O . S. (Coord.). **A Cultura da soja - Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná.** Rio de Janeiro: Globo, 1988. 299 p. (Coleção do Agricultor).
- SCHAAD, M. C.; CARRINGTON, J. C. Supression of long-distance movement of Tobacco etch virus in a nonsusceptible host. **Journal of General Virology.** Washington, v. 70, n. 4, p.2556-2561, Apr. 1996.
- SCHAAD, M. C.; HALDEMAN-CAHILL, R.; CRONIN, S.; CARRINGTON, J. C. Analysis of the VPg-proteinase (NIa) encoded by Tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing and genome amplification. **Journal of General Virology,** Washington, v. 70, n. 10, p. 7039-7048, Oct. 1996.
- SCOTTISH CROP RESEARCH INSTITUTE. The Taxonomy of Plant Viruses. In: International Congress of Plant Pathology, 1998, Edinburgh. **Anais eletrônico ... 1998.** Disponível: www.scri.sari.ac.uk/vir/ictvhome.html. [capturado em mar. 2000] .
- SHI, X. M.; MILLER, H.; VERCHOT, J.; CARRINGTON, J. C.; VANCE, V. B. Mutations in the region encoding the central domain of helper component-proteinase (HC-Pro) eliminate Potato virus X/potyviral synergism. **Virology,** Orlando, v. 231, n. 1, p. 35-42, Apr. 1997.
- SHUKLA et al. **The Potyviridae.** Wallingford: CAB International, 1994. 516p.
- SINCLAIR, J.B.; BACKMAN, P.A . (eds). **Compendium of soybean diseases.** 3. ed. Auburn, Illinois: APS Press, 1989. 106p.

- TANAKA, M.A.S.; PAIVA, F.A. Doenças causadas por vírus, bactérias e nematóides. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 8, n. 94, p.34-38, Out. 1982.
- VANCE, V.B.; BERGER, P. H.; CARRINGTON, J. C. ; HUNT, A. G.; SHI, X. M. 5' proximal potyviral sequences mediate Potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. **Virology**, Orlando, v. 206, n. 1, p. 583-590. Jan. 1995.
- VEGA, J.; REZENDE, J. A. M.; COSTA, A.S. Aspectos ultraestruturais das lesões locais induzidas pelo Vírus do Amarelo do Broto da Soja em mamoeiro. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 11, n. 1/2, p. 64-65, jan./jun. 1985. (Resumo, 41).
- VERCHOT, J.; CARRINGTON J. C. Debilitation of plant potyvirus infectivity by P1 proteinase-inactivating mutations and restoration by second-site modifications. **Journal of General Virology**, Washington, v. 69, n. 3, p. 1582-1590, Mar. 1995a.
- VERCHOT, J.; CARRINGTON, J. C. Evidence that the potyviruses P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. **Journal of General Virology**, Washington, v. 69, n. 6, p. 3668-3674, June 1995 b.
- VERCHOT, J.; KOONIN, E. V.; CARRINGTON, J. C. The 35 kDa protein from the N-terminus of the potyviral poliprotein function as the third viral-encoded proteinase. **Virology**, Orlando, v. 185, n. 2, p. 527-35, Dec. 1991.

ZERBINI, F. M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. A família Potyviridae – parte I.
Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP), Passo Fundo, v. 7, p. 1-
65, 1999.