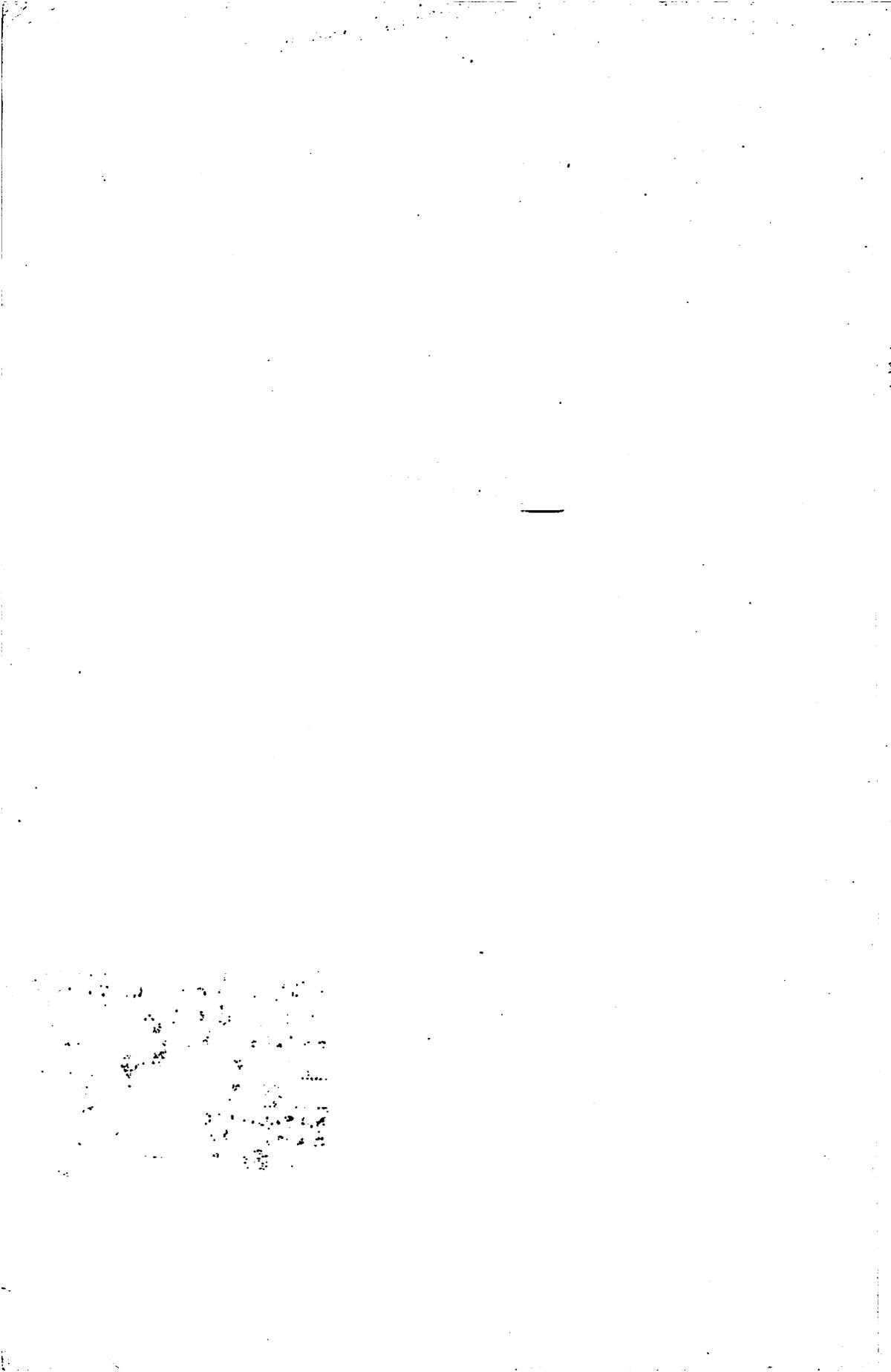


**ESTUDOS BIOLÓGICOS, MOLECULARES E
DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DO VÍRUS
DA MANCHA-ANULAR DO CAFEIEIRO**

CLAUDINE MÁRCIA CARVALHO

1999



47757

33521 MFN.

CLAUDINE MÁRCIA CARVALHO

**ESTUDOS BIOLÓGICOS, MOLECULARES E DE MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DO VÍRUS DA MANCHA-ANULAR DO CAFEIEIRO**

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

Orientadora

Prof. Dra. Antônia dos Reis Figueira

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
1999

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

Carvalho, Claudine Márcia

Estudos biológicos, moleculares e de microscopia eletrônica do vírus da
Mancha-anular do cafeeiro / Claudine Márcia Carvalho. -- Lavras : UFLA, 1999.
58 p. : il.

Orientador: Antônia dos Reis Figueira.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Rhabdovirus*. 2. *Coffee ringspot virus*. 3. *Brevipalpus phoenicis*. 4. RT-PCR. 5. Random primers. 6. Ultraestrutura. 7. Hospedeiro. 8. *Alternanthera tenella*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-576.6484

-633.7398

CLAUDINE MÁRCIA CARVALHO

**ESTUDOS BIOLÓGICOS, MOLECULARES E DE MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DO VÍRUS DA MANCHA-ANULAR DO CAFEIEIRO**

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

APROVADA em 07 de julho de 1999

Dra. Alessandra de Jesus Boari

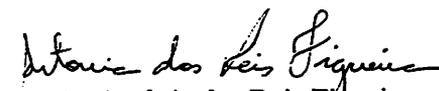
UFLA

Prof. Dra. Neusa de Lima Nogueira

CENA/USP

Dr. Paulo Rebelles Reis

EPAMIG – CTSM


Prof. Antônia dos Reis Figueira
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1999

A Deus, por mais essa vitória.

Agradeço.

**As meus pais Ildeu e Celeste, pela minha formação, carinho, estímulo e
compreensão.**

Dedico.

**As minhas irmãs
Ana Vânia, Daniele e Taísa
Ofereço.**

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e pela força.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

A Professora Antônia dos Reis Figueira pela orientação, amizade, dedicação, disponibilidade, estímulo e sobretudo pela confiança depositada.

Ao Dr. Paulo Rebelles Reis, pela co-orientação e disponibilidade.

A Dra. Alessandra de Jesus Boari pela colaboração em todas as etapas de execução desse trabalho, pelos ensinamentos prestados, amizade e principalmente pelo apoio nos momentos mais difíceis da minha caminhada.

A Professora Neusa de Lima Nogueira pela valiosa contribuição nos trabalhos de microscopia eletrônica, amizade e por todos os ensinamentos prestados, os quais foram valiosos.

Ao Luiz Américo Passeto e aos produtores rurais de Coromandel pelo envio de amostras.

Ao Carlos Roberto Torres pela amizade e auxílio nas etapas desse trabalho.

Aos amigos do laboratório de Virologia e do Centro de Indexação pelo companheirismo, respeito e apoio durante meu curso.

Aos colegas do laboratório de acarologia – EPAMIG, pela agradável convivência e colaboração.

A todos os colegas do curso de Fitopatologia pelos bons momentos vivenciados e amizade.

Aos professores do Departamento Fitopatologia, pela amizade e conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do DFP, pelos auxílios prestados.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!!!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Coleta do vetor e do vírus em campos produtores.....	14
3.2. Obtenção de hospedeiras e inoculação mecânica.....	14
3.3. Testes de transmissão através do ácaro vetor.....	15
3.4. Testes de gama de hospedeiras.....	16
3.5. Microscopia eletrônica.....	18
3.6. Purificação parcial do CoRSV.....	19
3.7. Extração do RNA viral.....	19
3.8. Amplificação dos fragmentos de DNA através de “primers” ao acaso.....	20
3.9. Clonagem dos fragmentos amplificados em <i>Escherichia coli</i>	21
3.10. Purificação do plasmídeo.....	22
3.11. Clivagem enzimática do plasmídeo.....	23
3.12. Testes de hibridização com cDNA.....	23
3.12.1. Aplicação da amostra.....	24
3.12.2. Hibridização e lavagens.....	24
3.13. Sequenciamento.....	25
3.14. Transcrição reversa – reação em cadeia de polimerase.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1. Ocorrência do CoRSV em Minas Gerais.....	27
4.2. Inoculação mecânica do CoRSV em diferentes espécies de plantas.....	29
4.3. Testes de transmissão através do ácaro vetor.....	34

4.4. Microscopia eletrônica.....	36
4.5. RNA viral.....	44
4.6. Amplificação dos fragmentos de DNA do vírus utilizando “primers” ao acaso.....	45
4.7. Clonagem dos fragmentos obtidos.....	46
4.8. Testes de hibridização com cDNA.....	48
4.9. Sequenciamento.....	49
4.10. RT-PCR.....	49
5. CONCLUSÕES.....	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

RESUMO

CARVALHO, Claudine Márcia. **Caracterização biológica e molecular do vírus da mancha anular do cafeeiro.** Lavras: UFLA, 1999. 58p. (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia)*

Foram feitas algumas observações de campo com a finalidade de se verificar a ocorrência e a disseminação do vírus da mancha anular do cafeeiro (*Coffee ringspot virus* – CoRSV) em algumas lavouras de café (*Coffea arabica* L.), situadas em Minas Gerais, na região Sul e no Alto Paranaíba. Nessa ocasião foram coletados isolados desse vírus para o estudo do seu ciclo de hospedeiras, transmissibilidade pelo vetor *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae), observação da ultraestrutura de tecidos infectados, ao microscópio eletrônico, e estudo do seu genoma, através da amplificação dos fragmentos de DNA viral utilizando primers ao acaso, e hibridização com cDNA. O CoRSV foi encontrado em todas as lavouras visitadas no Alto Paranaíba, com maior severidade na região de Coromandel. No Sul de Minas Gerais foi detectado nas lavouras visitadas em Varginha, Alfenas, Lavras e Ijaci. No Alto do Paranaíba predominaram as lavouras com sintomas nas folhas e nos frutos, com incidências que chegaram a até 100%, e no Sul de Minas Gerais predominaram as lavouras com sintomas nos frutos, apresentando menor incidência e menor severidade nas folhas infectadas. Das diversas espécies de plantas cultivadas e selvagens, inoculadas mecanicamente, somente *Chenopodium quinoa* e *Althernantera tenella* se tomaram infectadas, apresentando sintomas que foram repetitivos em todos os experimentos realizados. Plantas de *C. amaranticolor* apresentaram sintomas de infecção que nem sempre foram repetitivos. Um isolado do CoRSV coletado em Alfenas causou sintomas sistêmicos em plantas de *C. quinoa*. Nos testes de transmissibilidade com o vetor houve transmissão do CoRSV de café para café, e de café para *C. quinoa*, somente quando as plantas foram infestada por larvas e ácaros adultos ou apenas por larvas. O ácaro foi capaz de se alimentar e colonizar o *C. quinoa*, que tem sido considerada uma planta com propriedades acaricidas. Na observação de cortes ultrafinos de tecidos infectados, provenientes de folhas e de frutos de cafeeiro, foi encontrada uma grande quantidade de partículas baciliformes típicas de *Rhabdovirus*, às vezes formando agregados organizados, na região do núcleo das células do mesófilo. Esse tipo de localização e organização das partículas virais são observadas nos *Nucleorhabdovirus*. Nos estudos moleculares, os clones 4 e 14 foram utilizados como sonda em testes de hibridização com cDNA. O clone 14 foi sequenciado e com base nessa sequência foram desenhados “primers” que foram utilizados para detecção do vírus em folhas infectadas por meio da técnica RT-PCR. Os

primers amplificaram o fragmento de DNA esperado quando se empregou o RNA extraído de plantas infectadas. As sondas produzidas reagiram apenas com vírus minipurificado a partir de plantas infectadas. Considera-se, porém, que um maior número de testes deve ser realizado antes que esses resultados obtidos com o sequenciamento possam ser considerados conclusivos.

Comitê Orientador: Antônia dos Reis Figueira – UFLA (Orientadora) e Paulo Rebelles Reis – EPAMIG – CTSM.

ABSTRACT

CARVALHO, Claudine Márcia. **Biological, molecular and electron microscopy of *Coffee ringspot virus***. Lavras: UFLA, 1999. 58p. (Dissertation – Master Program in Phytopathology)*

Field inspections were carried out in several coffee plantations, located in the regions Alto do Paranaíba and South of the State of Minas Gerais, in order to detect the occurrence and severity of *Coffee ringspot virus* (CoRSV). Samples collected from infected plants, growing in those visited plantations, were inoculated in several plant species to find out new susceptible hosts which could be alternative for the CoRSV at field conditions. Transmissibility of CoRSV through its vector, the mite *Brevipalpus phoenicis*, was performed using different plants species. Other studies were also carried out as observations of infected tissues using transmission electron microscopy, partial genome characterization through RT-PCR with random primers and tentative detection of CoRSV in infected tissues by PCR and cDNA. CoRSV was found in every coffee field visited in Alto do Paranaíba, with the greatest severity in the region of Coromandel. In the region South it was detected in the municipalities of Varginha, Alfenas, Lavras and Ijaci. In Alto do Paranaíba predominated crops with symptoms on leaves and fruits, showing incidence levels as high as 100% and in the South region predominated the crops with symptoms on fruits, showing lower severity and incidence on infected leaves. From the several species of cultivated and wild plants mechanically inoculated, only *Chenopodium quinoa* and *Althernantera tenella* became infected, presenting symptoms which were the same in all the experiments performed. Plants of *C. amaranticolor* presented CoRSV symptoms, which not always were repetitive. A CoRSV isolate collected in the municipality of Alfenas caused systemic symptoms in plants of *C. quinoa*. In transmissibility tests with the vector, there was CoRSV transmission from coffee to coffee, and from coffee to *C. quinoa*, which has been regarded as a plant with mite-killing properties. In ultra-thin sections of infected tissues from leaves and fruits of coffee tree, a great number of bacillus-shaped particles, typical of *Rhabdovirus*, sometimes building organized clusters, were observed in the nucleus region of mesophyl cells. That kind of localization and organization of viral particles are observed in *Nucleorhabdovirus*. In the molecular studies, the clones 4 and 14 were utilized as probes in hybridization tests with cDNA. The clone 14 was sequenced and based on its sequencing, some primers were drawn and utilized for virus detection on infected leaves by PCR technique. The primers amplified the expected DNA fragment when RNA extracted from infected plants was

employed. The probes tested reacted only the minipurified virus from infected leaves. It is considered that a great number of sequencing tests must be conducted before obtained definitive results.

Guidance Committee – Antonia dos Reis Figueira - UFLA (Advisor) e Paulo Rebelles Reis – EPAMIG – CTSM.

1. INTRODUÇÃO

O cafeeiro *Coffea arabica* L. é uma das principais plantas cultivadas no Brasil, tanto sob o ponto de vista econômico, gerando divisas pela exportação, quanto pelo aspecto social, demandando grande contingente de mão-de-obra para o seu cultivo. A produtividade média do Brasil é de dez sacas beneficiadas por hectare, podendo ser influenciada pelas condições climáticas adversas, variedades, práticas de pré e pós colheita e pela ocorrência de pragas e doenças (Anuário Estatístico do Brasil, 1996).

Até muito recentemente, as doenças do cafeeiro, de importância econômica, eram exclusivamente causadas por fungos, bactérias e nematóides. Entretanto, no início de 1996, começaram a aparecer altas incidências do vírus da mancha anular do cafeeiro (*Coffee ringspot virus* - CoRSV) em várias lavouras comerciais situadas na região do Alto do Paranaíba, em Minas Gerais (Figueira *et al.*, 1996; Figueira, Passeto e Carvalho, 1998). Esse fato gerou uma preocupação compreensível, porque os fitovírus compõem um grupo especial de patógenos que, devido à sua íntima associação com o hospedeiro, dificulta ou mesmo impossibilita o seu controle após o seu estabelecimento na planta. Qualquer interferência na multiplicação do vírus, nos tecidos infectados, resulta numa alteração indesejável do metabolismo normal da célula hospedeira (Matthews, 1991).

Por causa dessas características específicas dos fitovírus, o seu controle deve ser de caráter preventivo, através de um conjunto de medidas que só podem ser tomadas quando se detém um conhecimento adequado sobre o vírus que se quer controlar, bem como sobre a sua interação com o hospedeiro e o vetor. Todos esses fatores podem ainda sofrer uma influência direta do meio ambiente, tornando necessário o estudo do comportamento da doença em diferentes regiões.

Considerando-se a importância atual que vem adquirindo o vírus da mancha anular do cafeeiro e a ausência de informações a respeito desse vírus, realizou-se o presente trabalho com o objetivo de se caracterizar o CoRSV biológica, molecularmente e através da microscopia eletrônica. Foram coletados isolados do vírus, em diferentes regiões produtoras de café do estado de Minas Gerais, para investigar algumas propriedades como variabilidade, ciclo de hospedeiras experimentais e hospedeiras alternativas em condições de campo e transmissibilidade pelo vetor *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenipalpidae). Foram feitas também algumas tentativas de caracterização do RNA viral, empregando-se a técnica RT-PCR com “primers” ao acaso e posterior clonagem dos fragmentos obtidos. Dentre esses fragmentos, dois foram utilizados como sonda em testes de hibridização com o RNA viral, e um foi sequenciado para permitir o desenho de “primers” que foram testados na detecção do vírus em tecidos infectados através da técnica de RT-PCR. Os resultados obtidos são aqui apresentados e discutidos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

O cafeeiro, pertencente à família Rubiaceae, é uma das espécies mais cultivadas no Brasil. É uma planta tropical de altitude, adaptada a clima úmido e temperaturas amenas (Matiello, Abreu e Andrade, 1974).

O Brasil destaca-se como o maior produtor mundial de café e, junto com a Colômbia, detém mais de 40% da produção mundial (FAO, 1996). O consumo nacional anual é de cerca de 12 milhões de sacas de café, o que torna o Brasil o maior consumidor mundial de café. No Brasil, o café tem sido um dos principais produtos de exportação (5,86%) em 1997, contribuindo não apenas para obter recursos, mas também para gerar empregos e renda nacional (Ribeiro *et al.*, 1998). Estima-se que existam cerca de 320.000 propriedades onde o café é a principal fonte de renda e que aproximadamente 4 milhões de pessoas dependam diretamente da cafeicultura (Matiello, 1991). Entre 1994 e 1998 foram plantadas mais de 4 milhões de covas (70 a 100 mil hectares). De 1997 para 1998 a produção brasileira teve um crescimento de 63%, ou seja, aumentos de 19 para 30 milhões de sacas de café (Agriannual, 1999).

Em termos de geração de recursos é o responsável pela entrada de 2,5 bilhões de dólares anualmente no país (Zambolim *et al.*, 1997).

O Centro-sul é a principal região cafeeira do Brasil sendo que os estados de Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo e Paraná são responsáveis por mais de 90% da produção nacional de café. Minas Gerais destaca-se no cenário da cafeicultura nacional pela amplitude de suas regiões produtoras e condições climáticas favoráveis ao cultivo do cafeeiro, com consequente produção de café de boa qualidade, contribuindo com 50% da produção nacional (FAO, 1996; Anuário Estatístico do Brasil, 1996; Ribeiro *et al.*, 1998). A principal região cafeeira do estado é o Sul de Minas Gerais, com aproximadamente 50% da produção estadual e 34% da produção nacional. As

regiões do Jequitinhonha, Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba e Zona da Mata são responsáveis pela produção de 3,1, 2,8 e 0,22 milhões de sacas, respectivamente (Mendes e Guimarães, 1997a e 1997b; Ribeiro *et al.*, 1998).

Vários fatores contribuem para a composição dos padrões de qualidade do café, dentre eles destacam-se os ligados à espécie botânica, à variedade e à origem geográfica, bem como os fatores de pré e pós-colheita (Feria-Morales, 1990; Leite, 1991; Organización Internacional del Café, 1991; Camargo; Santinato e Corteza 1992). Além desses fatores, a ocorrência de pragas e doenças pode afetar as condições fisiológicas das plantas, interferindo na qualidade e quantidade de frutos produzidos (Matiello *et al.* 1994).

Diversas doenças causadas por diferentes patógenos podem afetar o cafeeiro no Brasil e no mundo. Dentre elas destacam-se a ferrugem (*Hemileia vastatrix*), a cercosporiose (*Cercospora coffeicola*), a mancha de *Phoma* (*Phoma* sp.), a mancha-aureolada do cafeeiro (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*), as meloidoginoses (*Meloidogyne coffeicola*, *M. incognita* e *M. javanica*) (Zambolim *et al.*, 1997 e Godoy, Bergamin Filho e Salgado, 1997). Os vírus nunca foram considerados potencialmente importantes para a cafeicultura, até que no início de 1995, começaram a aparecer altas incidências de plantas infectadas pelo CoRSV em várias lavouras de importância econômica em Minas Gerais, provocando uma mudança nesse quadro (Figueira *et al.*, 1996; Figueira, Passeto e Carvalho; 1998).

O CoRSV foi descrito pela primeira vez por Bittancourt (1938) que o detectou em cafezais localizados na região de Caçapava, estado de São Paulo. Nessa época, Bittancourt observou que os sintomas provocados por esse vírus, eram muito semelhantes aos causados por alguns fitovírus, como por exemplo o do vírus do vira-cabeça do tomateiro, sorose B e clorose-zonada em plantas cítricas. Isso fez com que esse autor suspeitasse que essa doença poderia ser também de etiologia viral.

Esta doença afeta os cafeeiros em qualquer idade do seu desenvolvimento. Bittancourt (1938), Silberschmidt (1941) e Chagas (1973 e 1978) observaram que os sintomas provocados por esse vírus se caracterizavam por manchas cloróticas ou necróticas nas folhas, geralmente em forma de anéis concêntricos e que nos frutos as manchas tinham forma de anéis ou irregulares, sendo geralmente deprimidas. Às vezes, o CoRSV pode também provocar queda severa de folhas e frutos nas plantas infectadas (Figueira *et al.*, 1996; Figueira, Passeto e Carvalho, 1998).

Silberschmidt (1941), transmitiu o vírus da mancha-anular do cafeeiro através da enxertia de plantas de café infectadas sobre plantas sadias. Esse autor também fez referências às semelhanças dos sintomas apresentados pelo cafeeiro infectado com os da leprose das plantas cítricas, os da mancha-anular do fumo e os da clorose-infecciosa das malváceas. Nessa ocasião, o autor tentou, sem êxito, a transmissão do CoRSV para plantas de poaia branca (*Richardsonia brasiliensis* Gomez) e para poaia-do-arador (*Borreria poaya* D. C.) e também verificou que o vírus não era transmitido via sementes de café provenientes de plantas infectadas.

Chagas (1978), testou vários hospedeiros, através da inoculação mecânica, utilizando tecidos provenientes de folhas e frutos de cafeeiros infectados, mas conseguiu a transmissão do vírus apenas para plantas de *Chenopodium quinoa* e *C. amaranticolor*, nas quais causou lesões locais cloróticas arredondadas com o centro necrótico, quase sempre escassas. O autor também determinou a estabilidade *in vitro* do CoRSV, e relatou que o ponto de inativação térmica do vírus era de 70°C, o ponto final de diluição de 10⁻⁴ e que o vírus começava a inativar-se a partir do 19º dia após a preparação do suco. Ainda nesse trabalho, evidenciou a não-transmissão do CoRSV por sementes como havia sido observado por Silberschmidt (1941).

Apesar de doença semelhante já ter sido descrita nas Filipinas (Reyes, 1959 e 1961; Valdez, 1966) as viroses nunca foram consideradas potencialmente importantes para a cafeicultura em todo o mundo. Chagas (1978) quando trabalhou com esse vírus, considerou o seu estudo importante porque, com a crescente expansão da cultura do café em áreas de cerrado, as novas técnicas de manejo adotadas poderiam contribuir para um desequilíbrio ecológico, favorecendo o desaparecimento do inimigo natural do ácaro vetor, o seu aumento populacional nos campos produtores de café e conseqüentemente a disseminação do CoRSV.

Os *Rhabdovirus* são constituídos por um nucleocapsídeo envolto por uma membrana lipoprotéica (Jackson, Francki e Zuidema, 1987). Eles podem infectar animais vertebrados, invertebrados e várias espécies de plantas (Wagner e Rose, 1996) e são divididos em cinco gêneros, sendo que três infectam animais (*Vesiculovirus*, *Lyssavirus* e *Ephemerovirus*) e dois infectam plantas (*Cytorhabdovirus* e *Nucleorhabdovirus*) (Wunner *et al.*, 1994).

Os dois gêneros que infectam vegetais se distinguem de acordo com o lugar de maturação dos vírus nas células infectadas (Wunner *et al.*, 1994). Os *Nucleorhabdovirus*, por exemplo, *Sonchus yellow net virus* (SYNV), o *Potato yellow dwarf virus* (PYDV), *Datura yellow vein virus* (DYVV), *Eggplant mottled dwarf virus* (EMDV) e *Maize mosaic virus* (MMV) adquirem o envelope no núcleo das células infectadas (Murphy *et al.*, 1995). *Lettuce necrotic yellow virus* (LNYV), *Broccoli necrotic yellows virus* (BNYV), *Barley yellow striate mosaic virus* (BYSMV), *Festuca leaf streak virus* (FLSV), *Northen cereal mosaic virus* (NCMV), *Sonchus virus* (SonV), *Strawberry crinkle virus* (SCV) e *Wheat American striate mosaic virus* (WASMV) membros do gênero *Cytorhabdovirus* adquirem o envelope no citoplasma das células infectadas (Francki, Randles e Dietzgen, 1989 e Murphy

et al., 1995). O CoRSV ainda não foi classificado mas provavelmente é um *Nucleorhabdovirus* (Kitajima e Costa, 1972).

Os *Rhabdovirus* são facilmente identificados através do microscópio eletrônico, pois são baciliformes, com um comprimento de 100 a 430 nm por 45 a 100 nm de diâmetro (Jackson, Franchi e Zuidema, 1987). São transmitidos por cigarrinhas, afideos, cigarras, cochonilhas e ácaros. O *Rice transitory yellowing virus* (RTYV) é transmitido para o arroz de maneira circulativa por espécies de cigarrinha do gênero *Nephotettix* (Chiu *et al.*, 1968 e Chen e Shikata, 1972). Randles (1983), relatou que o *Lettuce necrotic yellow virus* (LNYV) é transmitido de maneira circulativa por duas espécies de afídios, mas apenas o *Hyperomyzus lactucae* é considerado importante. Boakye e Randles (1974) constataram que o LNYV pode ocasionalmente ser transmitido transovarianamente pelo afídio *Hyperomyzus lactucae*. *Strawberry crinkle plant rhabdovirus* (SCR) é transmitido transovarianamente pelos afídios *Chaetosiphon fragaefolii* e *C. jacobi* (Sylvester e Richardson, 1990). O *Sorghum stunt mosaic rhabdovirus* é transmitido pela cigarrinha *Graminella sonora* depois de um período de incubação de nove dias a 30°C (Creamer e He, 1997).

Chagas (1973 e 1978) observou que o vírus da mancha anular do cafeeiro era transmitido por fêmeas do ácaro *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae) que é cosmopolita (Haramoto, 1975; Gonzáles, 1975). No Brasil, este ácaro também está associado à leprose do citros causada pelo vírus da leprose (*Citrus leprosis rhabdovirus*-CitLV) (Musumeci e Rossetti, 1963), a mancha verde do maracujá causada por *Rhabdovirus* (Kitajima *et al.*, 1997) e a mancha-anular do ligustre causada pelo *Ligustrum ringspot virus* (Rodrigues e Nogueira, 1996). Rodrigues *et al.* (1997), estudando a associação das partículas virais da leprose dos citros com o *B. phoenicis* sugeriram que este vírus se multiplica dentro do vetor, devido a observação de grande quantidade

de partículas virais. Os autores também relataram que o vírus da leprose do citros não é transovariano. De acordo com Chiavegato e Salibe (1984), a leprose do citros é transmitida por larvas de *B. phoenicis* depois de 24 horas de aquisição, mas os adultos e ninfas são pouco eficientes na transmissão. Nesses aspectos, nenhum estudo foi realizado com relação ao CoRSV e *B. phoenicis*.

Kitajima e Costa (1972) constataram, por meio de exames ao microscópio eletrônico, a presença de partículas baciliformes medindo de 35 a 40 nm de diâmetro por 100 a 110 nm de comprimento, nas células dos tecidos foliares infectados de cafeeiro. Essas partículas foram localizadas principalmente no núcleo e raramente no citoplasma das células infectadas e, estavam ausentes nas células da região vascular. Os autores além de se referirem à similaridade entre os sintomas da mancha anular do cafeeiro e a leprose dos citros observaram a semelhança entre as partículas desses dois vírus.

Posteriormente, Chagas (1978 e 1980) relatou a presença de partículas baciliformes semelhantes às formas maduras dos *Rhabdovirus*, com diâmetro que variava entre 59 a 76 nm por 178 a 224 nm de comprimento, presentes nas cisternas do retículo endoplasmático e no espaço perinuclear. Também verificou partículas tubulares com comprimento de 80 a 151 nm por 38 a 42 nm, similares às formas imaturas dos *Rhabdovirus*, localizadas no núcleo de células mesocárpicas infectadas. Desde então, considera-se que o CoRSV seja um *Rhabdovirus*, possivelmente do gênero *Nucleorhabdovirus*.

Mais de trinta espécies de *Rhabdovirus* causam doenças em plantas cultivadas, mas poucos foram caracterizados com relação à sua organização e expressão genômica até o presente momento como *Sonchus yellow net virus* (SYNV), *Lettuce necrotic yellows virus* (LNYV), *Rice yellow stunt virus* (RYSV) e *Orchid fleck virus* (OFV) (Luo e Fang, 1998; Heaton *et al.*, 1989;

Wetzel, Dietzgen e Dale, 1994 e Kondo *et al.*¹, não publicado).

O genoma dos *Rhabdovirus* é constituído por um RNA de fita simples, negativa, com um comprimento que varia de 11.000 a 13.000 nucleotídeos e possui seis “open reading frames” (ORF) (Wagner, 1991). Uma exceção é feita ao *Orchid fleck virus* cujo genoma consiste de duas moléculas de RNA de fita simples negativa (Kondo *et al.*¹, não publicado). O RNA1 tem 6.413 nucleotídeos e inclui cinco ORFs e o RNA 2 tem 6.001 nucleotídeos e contém uma ORF (Kondo *et al.*¹, não publicado). O RNA genômico dos *Rhabdovirus* serve como molde para a replicação e transcrição (Jackson, Francki e Zuidema, 1987). A organização do genoma do SYNV (Figura 1) segue o seguinte esquema 3'-N-M1-sc4-M2-G-L-5' (Heaton *et al.*, 1989). A proteína N forma o nucleocapsídeo e é responsável pela mudança da fase de transcrição para replicação (Goldberg *et al.*, 1991). A proteína M1 é uma fosfoproteína, e também interage com a proteína N. A proteína M2 forma a matriz protéica dos vírions (Goldberg *et al.*, 1991). A proteína G é a glicoproteína do envelope viral, provavelmente associada à especificidade vírus/vetor (Jackson, Francki e Zuidema, 1987). A proteína L é a replicase e a sc-4 provavelmente é uma proteína estrutural (Goldberg *et al.*, 1991). O genoma do LNYV possui seis ORFs, assim como o SYNV. O mapa físico proposto para o LNYV é 3'-N-4a-4b-M-G-L-5', onde N é o gene do nucleocapsídeo, 4a codifica a fosfoproteína P e o 4b uma proteína de função desconhecida, M é o gene da matriz protéica, G é uma glicoproteína e L é o gene da transcriptase (Wetzel, Dietzgen e Dale, 1994).

A homologia de sequência de aminoácidos entre os *Rhabdovirus* é muito baixa. Heaton, Zuidema e Jackson (1987), analisaram a sequência de Aminoácidos da proteína M2 do SYNV, e verificaram que existe pouca

¹Kondo, H.; Maeda, T.; Tamada, T.; Shirako, Y. Research Institute for Bioresources, Okayama University, Kurashiki 710-0046, Japan.

similaridade com a sequência das proteínas N dos serotipos do *Vesicular stomatitis virus* (VSV) e M1 do *Rabies virus* (RV). Essa sequência conservada mostra que existe 20% de homologia entre os aminoácidos 198 e 250 da proteína M2 do SYNIV e os aminoácidos 121 e 173 da proteína N do VSV (Heaton, Zuidema e Jackson 1987). Um similar alinhamento da proteína N do VSV e da proteína M1 do RV mostra que existe uma homologia de 24%. Também Hillman *et al.* (1990) comparando a sequência da proteína M1 do SYNIV com as sequências já relatadas dos outros *Rhabdovirus* do gênero *Paramyxovirus* não observaram nenhuma similaridade significativa.

Choi *et al.* (1992) estudaram a homologia da proteína L do SYNIV, do RV e de dois serotipos do VSV (VSV_{NJ} e VSV_{Ind}) e observaram uma similaridade de 24,5% entre VSV_{Ind} e SYNIV, 24,4% entre VSV_{NJ} e SYNIV e 23,3% entre o RV e o SYNIV.

Zuidema, Heaton e Jackson (1987), não observaram nenhuma homologia significante entre a sequência dos aminoácidos da proteína N do SYNIV, e dois serotipos do VSV.

Uma pequena região conservada entre os aminoácidos da proteína N do LNYV e do SYNIV foi encontrada. Essa sequência similar de 24 aminoácidos corresponde a uma região de alta homologia entre os isolados do VSV e do RV (Wetzel; Dietzgen e Dale, 1994).

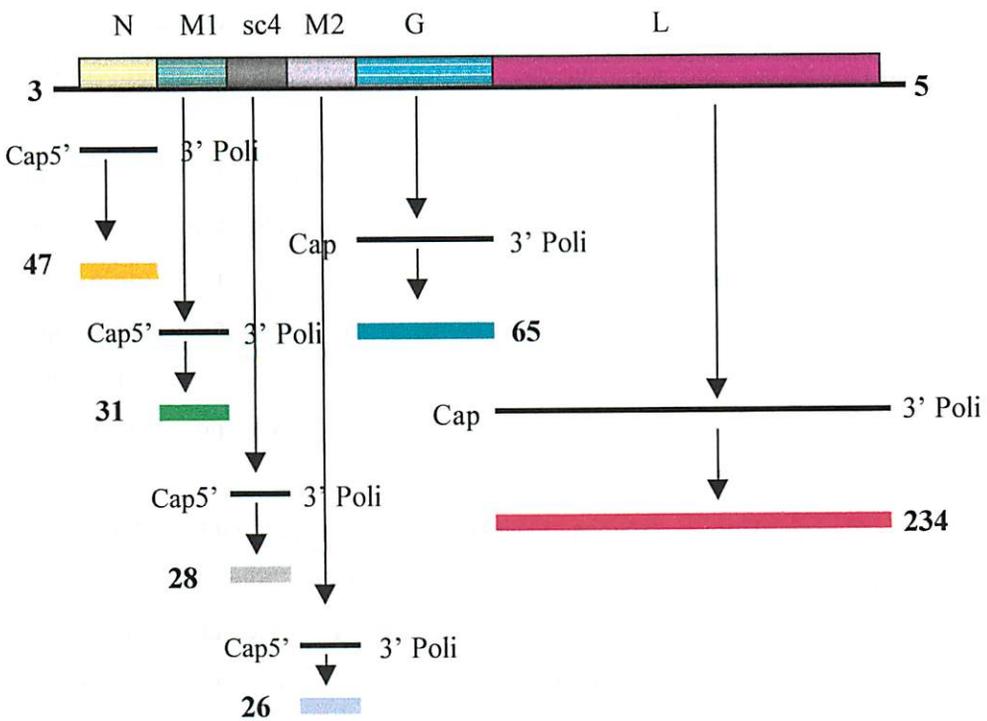


Figura 1. Representação esquemática do genoma do *Sonchus yellow net virus*. A barra grande de cima representa o genoma viral; as barras pretas representam os RNAs; as pequenas barras coloridas representam as proteínas traduzidas. Esquema adaptado de Heaton *et al.*, 1989.

Kondo *et al.*¹, (não publicado) para determinarem a sequência dos aminoácidos do *Orquid fleck virus*, utilizaram “primers” ao acaso para a síntese do cDNA a partir do RNA viral que foi clonado e sequenciado.

Segundo Batista (1993) confiar apenas nos sintomas não é recomendável para identificar um vírus, pois a expressão dos sintomas podem variar. Técnicas biológicas utilizadas no diagnóstico de vírus são bastante lentas e, portanto, inadequadas para aplicação em larga escala. Atualmente com os avanços na biologia molecular estão sendo aplicados testes rápidos, sensíveis e específicos no diagnóstico dos vírus, como a RT-PCR e hibridização com cDNA. Os métodos de hibridização com cDNA, utilizando-se sondas radioativas ou não-radioativas são consideradas altamente confiáveis na diagnose dos fitovírus (Batista, 1993; Figueira; Domier e D’Arcy, 1997).

Stenger *et al.*, (1988) utilizaram clones do *Sowthistle yellow vein virus* (SYVV) para produção de sondas para detectar o RNA viral extraído de plantas e de afideos infectados. Os autores observaram que as sondas de plasmídeos recombinantes hibridizaram com um fragmento de 13.000 nucleotídeos que corresponde ao tamanho do RNA viral presente nos tecidos infectados. Eles também verificaram que a sonda era específica para SYVV, pois não ocorreu hibridização quando foi utilizado RNA do SYNIV.

Wagner, Choi e Jackson, (1996), detectaram facilmente o SYNIV no núcleo de tecidos foliares infectados através da técnica de “Slot blot”.

No caso da hibridização com sonda radioativa a principal desvantagem é o uso de isótopos radioativos para marcação, embora seja mais sensível que a não-radioativa. Métodos que utilizam sondas não-radioativas já estão disponíveis e têm sido considerados bastante vantajosos porque não oferecem os riscos da radioatividade e não exigem cuidados e laboratórios especiais, podendo ser realizados em locais que não dispõem desse tipo de tecnologia (Figueira; Domier e D’Arcy, 1997).

Além do uso de sondas moleculares, a amplificação de fragmentos do vírus por RT-PCR, também tem sido utilizada com sucesso para detecção de vários patógenos (Figueira, Domier e D'Arcy, 1997; Eiras, Rezende e Ávila, 1998).

Brioso *et al.*, (1996) utilizaram a técnica de PCR e “dot-blot” para detecção do *Andean potato mottle virus* (APMV) em plantas de batatas infectadas e em afídeos virulíferos. RT-PCR é mais sensível que o teste ELISA e o de hibridização com cDNA (Figueira, Domier e D'Arcy, 1997) e não emprega os produtos tóxicos ou isótopos radioativos utilizados nos testes de hibridização moleculares (Boari, 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta do vetor e do vírus em campos produtores

Foram visitadas lavouras de café localizadas no Sul de Minas Gerais (Alfenas, Varginha, Ijací e Lavras) e no Alto Paranaíba (Coromandel, Patrocínio e Paracatu) para a coleta do ácaro vetor *B. phoenicis* e de folhas e frutos com sintomas da mancha-anular do cafeeiro utilizados nos estudos.

3.2. Obtenção de hospedeiras e inoculação mecânica

A obtenção das plantas de café foi feita a partir da germinação de sementes na câmara de germinação do Laboratório de Sementes – UFLA e transplântio das dessas para vasos com capacidade de 2 kg, contendo como substrato uma mistura de terra, areia e esterco, na proporção 1:1:1. As plantas de *C. quinoa* e as demais plantas empregadas nesse trabalho foram obtidas a partir de semeadura em bandejas de plástico, e posterior transplântio das mudas para vasos com capacidade de 2 kg, utilizando o mesmo substrato descrito acima. Essas plantas foram inoculadas mecanicamente no estágio de três a quatro folhas. A inoculação mecânica foi feita com o extrato de tecidos de plantas infectadas com o CoRSV (cafeeiro, *C. quinoa*, *C. amaranticolor* e *A. tenella*), obtido por trituração desses em almofariz contendo nitrogênio líquido e posterior adição da solução estabilizadora de Cech, Podzna e Blatný, (1957) modificada por Chagas (1978) (Na_2HPO_4 0,1M) ao qual foi adicionado 2% de nicotina, 10% de sacarose, 0,03% de carvão ativado e 0,1M de ácido ascórbico na proporção de 1:10 (peso/vol.). Foi testada também essa solução com a substituição do carvão ativado por mercaptoetanol e a solução PBS-T (solução salina tamponada contendo 2% de PVP (polivinilpirrolidona), 0,02% de soroalbumina de ovo e 2% de Tween 20) O extrato foi friccionado com a ponta dos dedos, na parte superior das folhas, previamente polvilhadas com o abrasivo

carborundum (400 mesh) e a seguir as folhas foram lavadas com água e as plantas mantidas em casa-de-vegetação para observação dos sintomas, durante 60 dias. As plantas utilizadas como controle foram inoculadas com o extrato das folhas das respectivas plantas sadias.

3.3. Testes de transmissão através do ácaro vetor

Larvas e adultos de *B. phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) não virulentos, foram criados em frutos sadios de laranja e em folhas sadias de cafeeiro, no Laboratório de Acarologia da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG. Na ocasião dos testes estes foram transferidos para folhas de cafeeiro e *C. quinoa* infectadas com o CoRSV, colocadas sobre esponjas de 1 cm de espessura, umedecidas com água destilada, acondicionadas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro por 2 cm de profundidade. Para manter a turgescência da folha e formar uma barreira para impedir a migração do ácaro, foi colocada uma fina camada de algodão em seu bordo formando uma espécie de arena (Figura 2). Sobre as folhas foram colocadas algumas gotas de gesso para estimular a ovoposição dos ácaros (Figura 2). A transferência dos ácaros foi efetuada com o auxílio de um pincel, sob um microscópio estereoscópico da Micronal, ajustado para aumentos entre 10 e 40 vezes. Os ácaros e as larvas permaneceram nas folhas infectadas por 24, 48 e 72 horas, para aquisição do vírus. Após esse período, 5 larvas e 5 adultos ou somente 10 adultos ou ainda somente 10 larvas de *B. phoenicis* foram colocados em plantas sadias de cafeeiro e de *C. quinoa* onde permaneceram também por 24, 48 e 72 horas, para a transmissão do vírus. Simultaneamente, como controle, algumas plantas sadias de cafeeiro e de *C. quinoa* foram infestadas com ácaros não virulíferos pelo mesmo período. As plantas foram

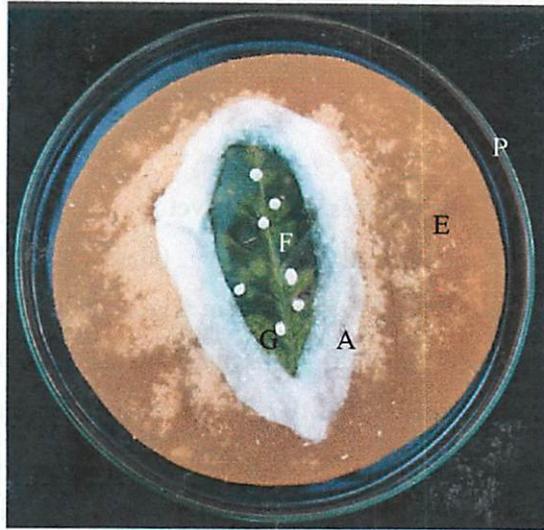


Figura 2. Folha de cafeeiro acondicionada em placa de Petri para criação do *Brevipalpus phoenicis*. F: folha de cafeeiro com sintoma da mancha-anular, G: gesso, A: camada de algodão, E: espuma, P: placa de Petri.

3.4. Testes de gama de hospedeiras

Foram inoculadas mecanicamente 22 espécies de plantas pertencentes a 8 famílias (Tabela 1), sendo que algumas delas são cultivadas, outras são plantas indicadoras, já descritas na literatura para outros vírus, e plantas daninhas encontradas nos arredores das lavouras de café (Tabela 1). Os métodos de obtenção dessas plantas e inoculação mecânica foram os mesmos já descritos anteriormente.

Tabela 1. Plantas testadas nos ensaios de inoculação mecânica.

Família	Nome Científico	Nome comum	Nº de Plantas testadas	Controle
Amaranthaceae	<i>Alihernantera tenella</i>	Apaga-fogo	410	32
	<i>Amaranthus deflexus</i> L.	Caruru	7	2
	<i>Gomphrena globosa</i> L.	Perpétua	12	4
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	Quenopódio	2043	198
	<i>C. amaranticolor</i>	Quenopódio	328	28
Compositae	<i>Bidens pilosa</i> L.	Picão-preto	20	8
	<i>Emilia sonchifolia</i> DC.	Falsa-serralha	7	2
	<i>Galinsoga ciliata</i> (Raf.) Blake	Picão-branco	7	2
	<i>Sonchus oleraceus</i> L.	Serralha	12	4
Cruciferae	<i>Raphanus raphanistrum</i> L.	Nabo	5	2
	<i>Chamaesyce hirta</i> (L.) Millsp.	Erva-de-Santa-Luzia	7	2
Euphorbiaceae	<i>Phyllanthus tenellus</i> Roxb.	Quebra-pedra	5	2
Malvaceae	<i>Sida rhombifolia</i> L.	Vassourinha	12	4
Rubiaceae	<i>Richardia brasiliensis</i> Gomez	Poaia-branca	15	5
	<i>Coffea arabica</i> L. (Catuaí Vermelho)	Café	58	12
Solanaceae	<i>Solanum americanum</i> Mill.	Maria-pretinha	7	2
	<i>Datura stramonium</i> L.	Figueira-do-inferno	20	8
	<i>Nicandra physaloides</i> L.	Nicandra	20	8
	<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	Glutinosa	20	8
	<i>N. tabacum</i> "TNN"	Fumo	20	8
	<i>N. bentamiana</i>	Bentamiana	20	8
	<i>Physalis floridana</i> Rybd.	Fisalis	52	12

3.5. Microscopia eletrônica

Foi feita observação ao microscópio eletrônico, de cortes ultrafinos de tecidos infectados com o CoRSV. Para obter esses cortes, pequenos pedaços de folhas e de frutos provenientes de plantas de café, *C. quinoa* e *A. tenella* sadias e com sintomas característicos do CoRSV foram fixados com o fixador Karnovsky modificado (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 4%, cloreto de cálcio 5 mM, tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2). Em seguida foram lavados durante dez minutos, por três vezes, em tampão cacodilato 0,1 M e os espécimes foram pós-fixados em tetróxido de ósmio (2%) diluído em tampão cacodilato 0,2 M, pH 7,2, durante uma hora, à temperatura ambiente. Após a fixação eles foram contrastados em bloco por uma noite, a - 4° C, em acetato de uranila (2%) e lavador durante cinco minutos, por três vezes, em solução salina (0,9%). Foi então realizada a desidratação com séries crescentes de acetona em água a 25%, 50% e 70%, por cinco minutos, seguidas por dois tratamentos de dez minutos cada um, com acetona 90% e três tratamentos de vinte minutos com acetona pura. Posteriormente, foi realizada a infiltração dos espécimes em Spurr (5g de “vinilyclohexene dioxide”, 3g de “diglycidyl ether of propyleneglycol”, 13g de “nonenyl succine anhidride” e 0,2g de “dimethyl amino ethanol”) dissolvido em acetona da seguinte maneira:

- Spurr + acetona (1:1) - três horas a temperatura ambiente
- Spurr + acetona (2:1) - três horas a temperatura ambiente
- Spurr - “overnight” a 4° C

Os espécimes foram transferidos para moldes de borracha e em seguida preenchidos com Spurr e levados à estufa à 80° C por doze horas para polimerização da resina formando o bloco.

Os cortes ultra-finos foram feitos no ultramicrotomo REICHERT-JUNG. Esses cortes foram colocados sobre grades de cobre de 400 mesh previamente cobertas com colódio e metalizadas com carbono.

Os cortes foram contrastados com acetato de uranila a 3%, por vinte minutos, lavados com água bidestilada, novamente contrastados com citrato de chumbo durante 10 minutos e lavados com água bidestilada. Esses cortes foram examinados ao microscópio eletrônico de transmissão EM-109 Zeiss e fotografados.

3.6. Purificação parcial do CoRSV

Foi utilizado o protocolo de purificação parcial de vírus, descrito por Lane (1992), com modificações. Inicialmente 2 g de folhas de café com sintomas do CoRSV foram trituradas em almofariz com o auxílio de Nitrogênio líquido. Em seguida, foi adicionado tampão citrato de amônia (0,1 M), pH6,5 acrescidos de 150 µl iodoacetamida (0,25 M), 150 µl Na-DIECA (0,15 M), 150 µl de β-mercaptoetanol e 2% de PVP. O extrato foliar foi filtrado e centrifugado a 8.000 rpm por 10 minutos no rotor SA600 da Sorval. O sobrenadante foi cuidadosamente removido para tubos de policarbonato contendo 0,5 ml de triton X-100 e agitado até a dissolução completa. Em seguida, foi realizada a ultracentrifugação, por 150 minutos a 29.000 rpm (rotor A-641 da Sorval), em almofada de sacarose (20%). O sobrenadante foi descartado e as paredes do tubo foram cuidadosamente lavadas com água destilada. O vírus foi ressuspenso em 0,5 ml de tampão fosfato 0,02 M pH 7,2 e deixado "overnight" a 4° C. A seguir, essa solução foi centrifugada em microcentrifuga por 5 min a 14.000 rpm, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e armazenado a 4° C.

3.7. Extração do RNA viral

Inicialmente a mistura constituída de 200 µl da solução de vírus parcialmente purificado, 50 µl do tampão de extração (tris-glicina 0,2M, NaCl 0,2M e EDTA 20 mM pH 9,5), 20 µl de SDS (dodecil sulfato de sódio) (20%),

2,7 µl de proteinase K (20ng/ml) foi incubada por uma hora a 37°C. Em seguida, foram feitas duas centrifugações a 14.000 rpm, de 15 minutos cada, com fenol/clorofórmio (1 vol.), e foi recolhida a fase aquosa. Adicionou-se 1/20 vol. de acetato de sódio 3M, pH 5,5 e 2,5 vols. de etanol absoluto e posteriormente incubou-se por uma hora a -20°C. Em seguida, o RNA do vírus foi precipitado por centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos. Os “pellets” foram lavados com etanol (70%), secados e ressuspensos em 20 µl de água ultra-pura (Labconco) autoclavada. O RNA foi analisado em gel de agarose (0,8%).

3.8. Amplificação dos fragmentos de DNA através de “primers” ao acaso

Para transcrever o cDNA a partir do RNA viral foi utilizado o “kit da Gibco Super Script™ Preamplification System”. Cinco microlitros de RNA viral, 5 µl do “primer” ao acaso e 2 µl água ultra-pura (Labconco) foram misturados e incubados por 10 minutos, a 70°C e posteriormente por 1 minuto no gelo. Em seguida, adicionou-se 2 µl do tampão da reação, 2 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl da mistura de deoxinucleotídeos (dNTP), 2 µl de ditiotreitól (0,1 M) e 1 µl da enzima transcriptase reversa. A solução foi incubada a 42°C por 50 minutos e em seguida, a 70°C por 15 minutos.

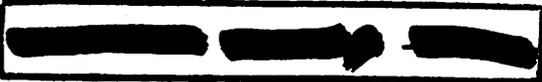
Foram testados “primers” universais da Operon para a amplificação dos fragmentos a partir do cDNA. Foram adicionados, em um tubo de microcentrífuga de 0,5 ml, 2,92 µl de água ultra-pura (Labconco), 1,30 µl do tampão de reação, 1 µl de MgCl₂ (25 mM), 1,04 µl da mistura de deoxinucleotídeos (2,5 mM), 1,04 µl de soro albumina bovina (BSA) (10 mg/ml), 2,5 µl do primer universal, 0,20 de *Taq* DNA Polimerase e 3 µl do cDNA. A reação de PCR constituiu de quarenta ciclos: 92°C por um minuto, 35°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e um ciclo final de extensão de 7

minutos a 72°C. Cinco microlitros dos produtos amplificados foram analisados em gel de agarose (0,9%).

Os “primers” da Operon testados foram: OPY-01: GTGGCATCTC; OPY-02: CATCGCCGCA; OPY-03: ACAGCCTGCT; OPY-04: GGCTGCAATG; OPY-05: GGCTGCGACA; OPY-06: AAGGCTCACC; OPY-07: AGAGCCGTCA; OPY-08: AGGCAGAGCA; OPY-09: AGCAGCGCAC; OPY-10: CAAACGTGGG; OPY-11: AGACGATGGG; OPY-12: AAGCCTGCGA; OPY-13: GGGTCTCGGT; OPY-14: GGTCGATCTG; OPY-15: AGTCGCCCTT; OPY-16: GGGCCAATGT; OPY-17: GACGTGGTGA; OPY-18: GTGGAGTCAG; OPY-19: TGAGGTCCC; OPY-20: AGCCGTGGAA; OPF-01: ACGGATCCTG; OPF-02: GAGGATCCCT; OPF-03: CCTGATCACC; OPO-01: GGCACGTAAG; OPO-02: ACGTAGCGTC; OPO-03: CTGTTGCTAC; OPO-04: AAGTCCGCTC; OPO-05: CCCAGTCACT; OPO-06: CCACGGGAAG; OPO-07: CAGCACTGAC; OPO-08: CCTCCAGTGT; OPO-09: TCCCACGCAA; OPO-10: TCAGAGCGCC; OPO-11: GACAGGAGGT; OPO-12: CAGTGCTGTG; OPO-13: GTCAGAGTCC; OPO-14: AGCATGGCTC; OPO-15: TGGCGTCCTT; OPO-16: TCGGCGGTTC; OPO-17: GGCTTATGCC; OPO-18: CTCGCTATCC; OPO-19: GGTGCACGTT; OPO-20: ACACACGCTG; OPT-01: GGGCCACTCA; OPT-02: GGAGAGACTC.

3.9. Clonagem dos fragmentos amplificados em *Escherichia coli*

Para a clonagem dos fragmentos obtidos anteriormente utilizou-se o “kit TOPO TA Cloning”(Invitrogen). Dois microlitros dos fragmentos amplificados no item 3.3.3., 2 µl de água ultra-pura (Labconco) autoclavada e 1µl do vetor pCR®II-TOPO foram misturados e incubados a 25°C por 5 minutos, centrifugados e incubados por 1 minuto no gelo. A seguir, foi realizada a reação de transformação onde foram adicionados a 50 µl de células competentes “One



Shot™, 0,5 µl de β-mercaptoetanol e 2 µl de células da reação TOPO-Cloning™. A mistura foi incubada a 42°C por 30 segundos em seguida por 2 minutos no gelo. Após a adição de 250 µl do meio SOS fez-se a incubação a 37°C por 30 minutos. A seguir, 100 µl da reação foi plaqueada em meio sólido de 2YT (1 litro de água ultra-pura (Labconco), 16 g de triptona, 10 g de “bacto-yeast extract” e 5 g de NaCl, pH 7,0) adicionado de ampicilina, IPTG e X-Gal para formação de colônias a 37°C por uma noite. As colônias brancas foram selecionadas e cultivadas em meio líquido 2YT (1 litro de água ultra-pura (Labconco), 16 g de triptona e 5 g de NaCl, pH 7,0) para posterior purificação do DNA plasmidial.

3.10. Purificação do plasmídeo

Os plasmídeos recombinantes foram purificados pelo método da lise alcalina (Sambrook, Fritsch e Maniats, 1989). Inicialmente 1,5 ml de cada clone, crescido em meio de cultura 2xYT acrescido de ampicilina, foram colocados em tubos de microcentrífuga e centrifugados por 60 segundos, descartando-se o sobrenadante. Foram adicionados ao “pellet” 100 µl da solução I (25 mM de Tris-HCL pH 8,0, 10 mM de EDTA e 50 mM de D-glucose). Essa mistura foi agitada por 2 minutos e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Após a adição de 200 µl da solução II (0,2 N de NaOH, 1% de SDS) a solução foi misturada cuidadosamente e incubada por cinco minutos no gelo. Em seguida adicionou-se 150 µl da solução III (3 M de KAc, 2 M de HAc pH 4,8) que foram novamente misturados e incubados no gelo por 5 minutos. A solução foi centrifugada por 5 minutos a 14.000 rpm. A seguir, o sobrenadante foi removido para um novo tubo de microcentrífuga. A esse sobrenadante adicionou-se 1 vol. de fenol/clorofórmio, agitou-se vigorosamente e centrifugou-se por 15 minutos a 14.000 rpm. A fase aquosa foi removida e em seguida adicionou-se 2,5 vol. de etanol puro para precipitação do DNA. Após

incubação por 2 minutos, à temperatura ambiente, a solução foi centrifugada por 5 minutos. Os “pellets” foram lavados com etanol (70%), secados a vácuo por cinco minutos e solubilizados em 20 µl de TE com RNase. A concentração dos plasmídios foi analisada em gel de agarose (0,9%).

3.11. Clivagem enzimática do plasmídeo

Os plasmídeos purificados foram clivados com enzimas de restrição *EcoR* I a fim de comprovar a presença do fragmento de DNA. Para reação utilizou-se 3 µl de água ultra-pura (Labconco) autoclavada, 1 µl de tampão da reação, 5 µl de clone purificado e 1 µl da enzima que foram misturados e incubados “overnight” a 37°C. Cinco microlitros da reação foram analisados em gel de agarose (0,9%).

3.12. Testes de hibridização com cDNA

Nesse teste foram empregadas sondas não radioativas e substrato quimioluminescente. As sondas foram marcadas com biotina pela técnica denominada “Random primer labeling”, como se segue: 100 ng de DNA foram dissolvidos em 10 µl de TE em um tubo de microcentrífuga. A seguir foram adicionados 20 µl de 2,5x “Random Primer Solutions” da Gibco. O DNA foi desnaturado por cinco minutos em banho-maria e em seguida resfriado imediatamente no gelo. Foram então adicionados 5 µl da mistura de deoxinucleotídeos e 44 µl de água ultra-pura (Labconco). A seguir foi adicionado 1 µl do fragmento “Klenow” à mistura, esta foi centrifugada por 15 segundos e incubada por 60 minutos a 37°C. A reação foi interrompida com a adição de 5 µl do tampão “stop” do “kit” da Gibco. Para separar os nucleotídeos, não incorporados à sonda foi feita uma precipitação com a adição 1/10 vol. de acetado de sódio (3M, pH 5,5) e 2 vol. de etanol (95%). A solução foi incubada a -80°C por 15 minutos, descartando-se, a seguir, o sobrenadante. Os “pellets”

foram secados a vácuo e ressuspensos em 50 µl de água ultra-pura (Labconco) autoclavada e precipitado novamente com etanol. A seguir, os “pellets” foram ressuspensos em 50 µl de TE e estocados a -20°C.

3.12.1. Aplicação da amostra

Foram aplicados a uma membrana de “nylon” da Amersham, positivamente carregada, pré-umidecida com 10xSSC (3 M de NaCl, 0,3 M de citrato trisódico, pH 7,0), 100 µl da suspensão do vírus minipurificado, obtido anteriormente, com o auxílio do aplicador da Bethesda Research Laboratories. A seguir a membrana de nylon foi colocada para secar na estufa por 20 minutos a 80°C e o RNA foi fixado no aparelho “Stratalinker-UV”.

3.12.2. Hibridização e lavagens

As membranas foram pré hibridizadas a 65° C durante 30 minutos na seguinte solução de hibridização: 5x SSC contendo 0,1% de N-Lauril-sarcosine, 0,02% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 0,1% de I-Block da Tropix, no forno de hibridização da Robbins Scientific-model 400. Para cada membrana, com cerca de 48 cm², foram empregados 5 ml dessa solução. Em seguida, essa solução foi descartada e a membrana foi incubada “overnight” na mesma solução de hibridização contendo a sonda marcada como descrito no item 3.4, na concentração de 4ng/ml.

Após a hibridização as membranas foram submetidas às seguintes lavagens:

a) duas vezes, à temperatura ambiente, por cinco minutos, em PBS contendo 0,5% de SDS.

b) uma vez, por 30 minutos, em PBS contendo 0,5% de SDS a 65° C, seguida por duas lavagens, em 2x PBS, à temperatura ambiente, por cinco minutos.

Após essas lavagens as membranas foram incubadas em “Blocking buffer” (0,2% de I-Block da Tropix contendo PBS e 0,5% de SDS) durante 10 minutos. A seguir, em Streptavidin-alkaline Phosphatase Conjugate (Tropix), diluída em “Blocking buffer” durante 20 minutos à temperatura ambiente. Depois, foram lavadas três vezes com “Blocking buffer” por 5 minutos cada, à temperatura ambiente e a seguir, lavadas três vezes com tampão de dietanolamina 0,1 M, pH 10 contendo 1 mM de MgCl₂ e 0,02% de azida sódica, por 2 minutos cada. Após essas lavagens a membrana foi incubada com o substrato quimioluminescente da Tropix (AMPPD (dissodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-tricyclo-[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl) phenil phosphate) por duas horas, e exposta ao filme Kodak da Sigma, por trinta minutos. Este foi finalmente revelado conforme recomendações do fabricante.

3.13. Sequenciamento

O fragmento do clone 14 foi sequenciado no sequenciador A.L.F.TM DNA da Pharmacia Biotech utilizando o “kit Auto CycleTM Sequencing” segundo as recomendações do fabricante.

3.14. Transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Para a RT-PCR foram desenhados dois “primers” com base nos nucleotídeos sequenciados: F: 5'AAGGCTGTTCAACTCGTCTC 3' e R: 5'TAGCCGTGCAGAACATTATG 3'. Para a reação foi utilizado o “kit Access RT-PCR” da Promega. Foram misturados 20 µl de água livre de nuclease, 10 µl do tampão da reação, 1 µl da mistura de dNTP (10 mM), 5 µl do “primer” F (total de 50 pmol), 5 µl do “primer” R (total de 50 pmol), 2 µl de MgSO₄ (25 mM), 1 µl da enzima transcriptase reversa, 1 µl da enzima DNA polimerase e 5 µl do RNA viral. As reações de amplificações foram conduzidas no termociclador da MJ Research, Inc modelo PTC – 100, iniciando-se com um

ciclo a 48°C por 45 minutos e um a 94°C por 2 minutos; em seguida 40 ciclos: de 92°C por 1 minuto para desnaturação, 60°C para anelamento por 1 minuto , 68°C por 2 minutos para extensão e um ciclo de extensão de 7 minutos a 68°C. Cinco microlitros do produto da reação foram analisados em gel de agarose (0,9%).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ocorrência do CoRSV em Minas Gerais

O CoRSV foi detectado em todas as lavouras visitadas situadas em Coromandel, Patrocínio, Patos de Minas, Varginha, Alfenas, Lavras e Ijaci com incidências e sintomas variáveis. Os sintomas observados nas folhas do cafeeiro infectadas com o CoRSV foram manchas alongadas, com coloração variando, com o decorrer do desenvolvimento dos sintomas, de cloróticas a amarelo dourado, com bordos verde escuros, principalmente na área das nervuras. Observou-se com frequência o aparecimento de lesões iniciando na nervura central e caminhando em direção ao pecíolo, causando a abscisão foliar (Figura 3). Nos frutos de coloração vermelha apareceram anéis, cloróticos, às vezes deprimidos, sendo que nos frutos muito afetados podem ocorrer deformações (Figura 4). Nos frutos de coloração amarela esses anéis eram geralmente verdes.

Em algumas lavouras, notadamente no município de Coromandel, foram observadas incidências bastante altas do CoRSV, chegando a 100% em mais de um caso. Lavouras jovens, de dois anos, que foram implantadas perto de lavouras com oito anos ou mais, apresentando altas incidências, mostraram até 50% de incidência de vírus.

Os sintomas observados nas plantas localizadas nas diferentes lavouras foram bastante variáveis. Em algumas delas apareceram sintomas nas folhas e nos frutos, enquanto que em outras os sintomas apareceram somente nos frutos. Cada planta infectada mostrou também bastante variabilidade no número e disposição das folhas afetadas, bem como na severidade dos sintomas. Desfolhas severas e queda de frutos foram observadas em algumas áreas, provocando até 50% de diminuição do número de frutos nas plantas enquanto que em outras havia somente queda de folhas, sem queda de frutos. Porém isso ocorreu nos casos em que o número de folhas afetadas foi pequeno. As lesões anelares



Figura 3. Folhas de cafeeiro com sintomas da mancha - anular causado pelo *Coffee ringspot virus*.



Figura 4. Frutos de café apresentando sintomas da mancha anular causada pelo *Coffee ringspot virus*.

causadas pelo vírus, nos frutos, parecem provocar nesses uma predisposição à infecção por fungos. Nos casos de queda de frutos, isso ocorreu devido à infecção por fungos diversos que, além de provocarem a sua seca, fazem com que esses se desprendam dos galhos e caiam. Essa queda acontece após a maturação do fruto, mas muito antes da época da colheita, inviabilizando o seu aproveitamento ou causando uma depreciação na sua qualidade. Plantas com sintomas apenas nos frutos aparentemente não apresentaram nenhuma perda de produção, quando comparadas com as plantas sadias. Todas as cultivares comerciais de café, situadas na região do Alto Paranaíba, até mesmo as cultivares novas que estão sendo introduzidas, como a Catucaí, são suscetíveis e apresentaram os sintomas da infecção pelo CoRSV. Não foi notada nenhuma diferença de severidade entre cultivares.

A causa de todas as variações em sintomas, poderia ser relacionada a diversos fatores, como por exemplo a diferentes isolado do vírus, à condições nutricionais e/ou ambientais etc. Entretanto as evidências não são conclusivas. Às vezes, duas lavouras, da mesma cultivar de cafeeiro, distantes a poucos quilômetros uma da outra, aparentemente com a mesma condição climática, podem mostrar diferentes severidades de sintomas. Outras vezes, algumas áreas apresentam maior severidade que as outras em regiões diferentes. Existe a necessidade da condução de experimentos de campo em anos sucessivos, em diferentes regiões, para que se possa determinar com segurança a causa dessa variabilidade.

4.2. Inoculação mecânica do CoRSV em diferentes espécies de plantas

O resultado do teste em que se fez a inoculação mecânica do CoRSV em diferentes espécies de plantas, com a finalidade de se encontrar possíveis hospedeiras alternativas, está apresentado na Tabela 2. Nesse ensaio foram testadas 23 espécies de plantas cultivadas e selvagens. Dessas, apenas

Tabela 2. Resultado da inoculação mecânica do CoRSV em diversas plantas cultivadas e selvagens.

Planta doadora do inóculo	Planta inoculada mecanicamente	Nº de plantas testadas	Nº de plantas Infectadas	Porcentagem de transmissão
Cafeeiro	<i>Althernantera tenella</i>	340	26	7,6
<i>A. tenella</i>	<i>Althernantera tenella</i>	70	0	0
Cafeeiro	<i>Amaranthus deflexus.</i>	7	0	0
Cafeeiro	<i>Gomphrena globosa.</i>	12	0	0
Cafeeiro	<i>Chenopodium quinoa</i>	1450	134	9,24
<i>C. quinoa</i>	<i>Chenopodium quinoa</i>	390	80	20,5
<i>A. tenella</i>	<i>Chenopodium quinoa</i>	203	20	14,7
Cafeeiro	<i>C. amaranticolor</i>	328	8	2,4
Cafeeiro	<i>Bidens pilosa</i> L.	20	0	0
Cafeeiro	<i>Emilia sonchifolia</i> DC.	7	0	0
Cafeeiro	<i>Galinsoga ciliata</i>	7	0	0
Cafeeiro	<i>Sonchus oleraceus</i> L.	12	0	0
Cafeeiro	<i>Raphanus raphanistrum.</i>	5	0	0
Cafeeiro	<i>Chamaesyce hirta</i> (L.).	7	0	0
Cafeeiro	<i>Phyllanthus tenellus</i>	5	0	0
Cafeeiro	<i>Sida rhombifolia</i> L.	12	0	0
Cafeeiro	<i>Richardia brasiliensis</i>	15	0	0
Cafeeiro	<i>Coffea arabica</i> “Catuaí Vermelho”	58	0	0
Cafeeiro	<i>Solanum americanum</i>	7	0	0
Cafeeiro	<i>Datura stramonium.</i>	20	0	0
Cafeeiro	<i>Nicandra physaloides</i>	20	0	0
Cafeeiro	<i>Nicotiana glutinosa</i>	20	0	0
Cafeeiro	<i>N. tabacum</i> “TNN”	20	0	0
Cafeeiro	<i>N. bentamiana</i>	20	0	0
Cafeeiro	<i>Physalis floridana</i>	52	0	0

Chenopodium quinoa, *C. amaranticolor* e *Alternanthera tenella* apresentaram sintomas quando inoculadas com o CoRSV. Das 1450 plantas de *C. quinoa*, inoculadas mecanicamente com extrato de folhas infectadas de cafeeiro, apenas 134 (9,24%) apresentaram sintomas, que apareceram 6 a 8 dias após a inoculação, na forma de lesões cloróticas arredondadas com cerca de 1 mm (Figura 5.a). Por outro lado, quando o inóculo foi preparado a partir de lesões de *C. quinoa* e posteriormente inoculado em plantas sadias da mesma espécie, a porcentagem de transmissão foi um pouco maior ou seja das 390 plantas inoculadas, 80 se tornaram infectadas (20,5%). Os sintomas apresentados por essas plantas foram idênticos àqueles observados nas plantas de *C. quinoa* doadoras do inóculo, evidenciando que os sintomas foram, de fato, provocados pelo CoRSV.

Os isolados coletados em Alfenas (MG), além de induzirem lesões locais nas plantas de *C. quinoa*, causaram infecção sintêmica em 20 (14,7%) das 203 plantas inoculadas. Esses sintomas apareceram 30 dias após a inoculação e se caracterizaram por diminuição do limbo foliar, encarquilhamento e clorose (Figura 5.b). Isolados do CoRSV estudados por Chagas (1978) apresentavam somente lesões locais nas plantas inoculadas. Isso sugere que o vírus deve ter sofrido alguma mutação que lhe conferiu a habilidade de se movimentar de uma célula para outra nas plantas de *C. quinoa*.

Em plantas de *C. amaranticolor* os sintomas apareceram 6 a 8 dias após a inoculação em forma de lesões cloróticas com o centro necrótico. Entretanto esses sintomas não foram repetitivos, de modo que se considera mais seguro que esses sintomas sejam melhor investigados no futuro.

A planta denominada *A. tenella* foi encontrada nos arredores das lavouras cafeeiras, situadas no município de Lavras-MG, e também se tornou infectada quando inoculada mecanicamente com o CoRSV. Os sintomas

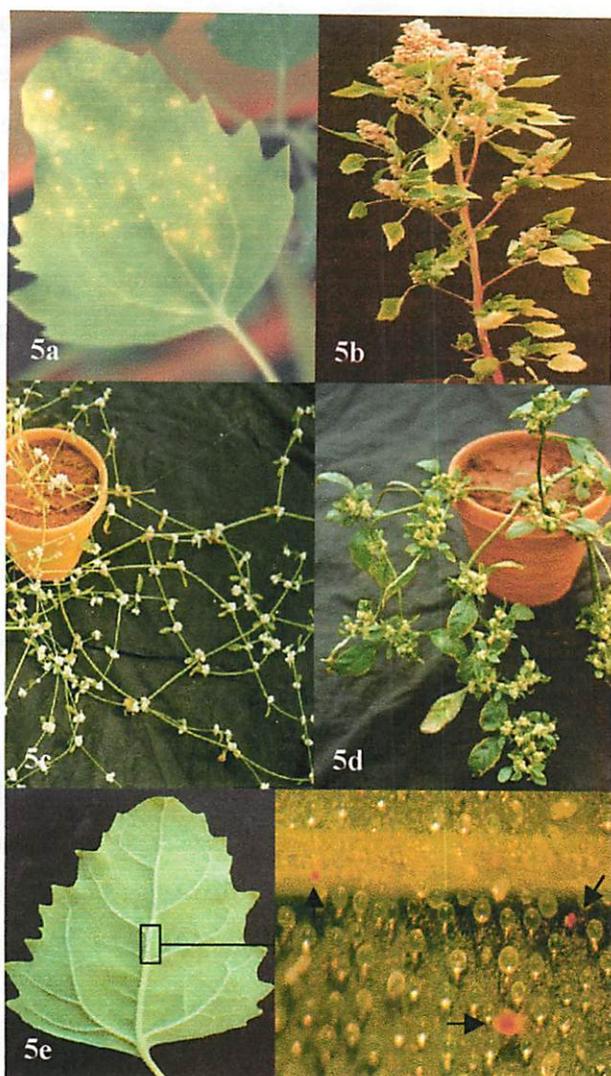


Figura 1. Folha de *Chenopodium. quinoa* mostrando lesões locais 6 dias após inoculação com *Coffee ringspot virus* (CoRSV). (5a). Planta de *C. quinoa* apresentando invasão sistêmica, 25 dias após a inoculação com CoRSV (5b). Planta sadia de *Althernantera tenella* (5c). Planta de *A.tenella* apresentando deformação do limbo foliar, ilhas verdes e superbrotamento 30 dias após inoculação com CoRSV (5d). Folha de *C. quinoa* colonizada por *Brevipalpus. phoenicis* (5e).

apresentados por essas plantas foram sistêmicos e apareceram cerca de 15 dias após a inoculação, tendo se caracterizado pelo aparecimento de ilhas verdes ao longo da nervura central, que se mostrou subdesenvolvida, enrugando e deformando o limbo foliar, e apresentou superbrotamento (Figura 5 c). Das 340 plantas inoculadas, apenas 26 (7,6%) apresentaram sintomas, mostrando o mais baixo índice de transmissibilidade. Quando o inóculo foi preparado a partir de lesões de *A. tenella* e inoculado em plantas sadias da mesma espécie e plantas de *C. quinoa* os sintomas não foram reproduzidos. Noronha *et al.* (1993) relataram que extrato de plantas de *A. tenella* possuem inibidores virais, que podem interferir na infectividade de fitovírus, tendo sido capazes de inibir o aparecimento das lesões locais provocadas pelo vírus do mosaico do fumo (*Tobacco mosaic virus* - TMV) em plantas de *Nicotiana glutinosa*.

Essa dificuldade na transmissão mecânica do CoRSV também já foi notada por outros pesquisadores. Chagas (1978), quando trabalhou com esse vírus só conseguiu a sua transmissão quando empregou a solução extratora descrita por Cech, Pozdena e Blatný (1957), com algumas modificações. Assim mesmo, comentou a dificuldade encontrada ao se transmitir mecanicamente o vírus a partir de folhas infectadas de café, sendo mais fácil quando o inóculo foi extraído de frutos com sintomas. Nesse trabalho foi tentado o uso do tampão PBS-T para a extração do inóculo, mas não se obteve sucesso na transmissão mecânica. Quando o carvão ativado foi substituído pelo mercaptoetanol na solução de Cech, Pozdena e Blatný (1957), modificada por Chagas (1978), a transmissão mecânica foi de 5%.

Isso demonstra a instabilidade desse vírus em extratos foliares, o que já foi comentado por outros autores (Francki, 1973; Chagas, 1978). De um modo geral a maioria dos *Rhabdovirus* não é transmitida mecanicamente (Peters, 1981).

O seu ciclo de hospedeiras também parece ser bem restrito, a exemplo do que acontece também com outros *Rhabdovirus* (Black, 1970; Jackson e

Christie, 1979). Silberschmidt (1941) testou a transmissão mecânica do CoRSV para duas espécies de Rubiaceae, *Richardsonia brasiliensis* e *Borreria poaya*, mas, não obteve êxito em seus experimentos. Chagas (1978) testou mecanicamente 32 plantas, procurando hospedeiras experimentais para o CoRSV, mas conseguiu a transmissão desse vírus apenas para plantas de *Chenopodium quinoa* e *C. amaranticolor*, nas quais causou lesões locais cloróticas arredondadas com o centro necrótico. Também Costa *et al.* (1960) não conseguiram transmitir mecanicamente o CoRSV para *Nicotiana tabacum* “Turkish”, *Lycopersicon esculentum* e cafeeiro ‘Mundo Novo’.

4.3. Testes de transmissão através do ácaro vetor

Os resultados obtidos quando se tentou a transmissão experimental do CoRSV de cafeeiro para cafeeiro, utilizando o ácaro vetor *B. phoenicis*, estão discriminados na Tabela 3. A transmissão ocorreu somente para 4 (13,3%) das 30 mudas infestadas com larvas e adultos de *B. phoenicis*, para 2(5%) das 40 mudas infestadas apenas com larvas de *B. phoenicis* e nenhuma transmissão foi obtida quando se utilizou apenas o ácaro adulto, significando que provavelmente o vírus deve ser adquirido pelo vetor na fase larval. O mesmo acontece com a transmissão do vírus da leprose dos citrus por esse mesmo vetor (Chiavegato e Salibe, 1984). Algumas manchas cloróticas apareceram cerca de dois meses após a inoculação, porém os sintomas característicos da doença só puderam ser observados quatro meses após a inoculação.

Chagas (1978) conseguiu a transmissão da mancha-anular do cafeeiro através de exemplares fêmeas de *B. phoenicis* para 24,24% das plantas de café infestadas. No presente trabalho, a transmissão para plantas de café foi de 13,3% quando se utilizou larvas e fêmeas adultas do ácaro vetor e de apenas 5% quando se utilizou larvas do ácaro. A baixa eficiência de transmissão observada para o CoRSV pode ser atribuída a variações relacionadas com o tempo de alimentação

e condições ambientais. Também poderia ser devida ao fato dos ácaros não terem adquirido o vírus, antes de serem transferidos para as mudas sadias, devido ao fato de os ácaros que se alimentam apenas das células da epiderme, que parece apresentar uma concentração menor de partículas virais. Existe a necessidade de se fazer um estudo mais acurado para se determinar as condições ótimas para transmissão do vírus através do ácaro vetor.

Chagas (1978) atribuiu a baixa transmissibilidade ocorrida em seus experimentos a três possíveis causas: 1) os ácaros poderiam não ter se alimentado nas áreas foliares infectadas com o vírus; 2) poderiam ter perdido a capacidade de transmitir o vírus após certo período de aquisição; 3) finalmente poderiam não ter adquirido o CoRSV em uma determinada fase do seu ciclo de vida. O fato de nesse trabalho não se ter conseguido a transmissão do vírus pelo ácaro adulto, poderia servir de reforço para essa última hipótese.

Embora *C. quinoa* seja uma planta com propriedades acaricidas, *B. phoenicis* foi capaz de se alimentar e colonizar essas plantas (Figura 5d). O índice de transmissão do CoRSV de *Chenopodium* para *Chenopodium* ocorreu apenas para 2 (2,04%) das 98 plantas inoculadas, quando se empregaram larvas e adultos na aquisição e transmissão do inóculo. A exemplo do que aconteceu com os testes com cafeeiro, não houve transmissão quando se empregou apenas o ácaro adulto.

Tabela 3. Resultado de inoculação do CoRSV através do ácaro vetor *Brevipalpus. phoenicis*.

Planta testada	Nº de plantas testadas	Estágio do ácaro	Nº de plantas infectada	Controle	Porcentagem de transmissão
<i>C. quinoa</i>	98	larva e adulto	2	8	2,04
<i>C. quinoa</i>	138	adulto	0	28	0
<i>C. arabica</i>	30	larva e adulto	4	4	13,3
<i>C. arabica</i>	40	larva	2	5	5
<i>C. arabica</i>	30	adulto	0	0	0

4.4. Microscopia eletrônica

Os exames das secções ultra-finas de folhas e frutos infectados, estão representados nas Figuras de número 6 a 11. Nas Figuras 6 e 7 pode ser visto o corte de tecido retirado das bordas das lesões observadas em folhas infectadas provenientes de Ijaci-MG. Na Figura 8, pode-se observar porções do núcleo com partículas virais. Em todas as células nota-se um grande número de partículas baciliformes, típicas de *Rhabdovirus*, na região do núcleo, dispersas ao acaso numa porção central menos densa. O tamanho médio das partículas foi $149,6 \pm 6,1$ nm de comprimento por $49,6 \pm 1,7$ nm de diâmetro. Poucas partículas similares às encontradas no núcleo foram observadas no citoplasma. Pode-se também observar no núcleo agregados organizados de partículas (Figura 6 com detalhe na Figura 7 e Figura 8). As Figuras 9 e 10 mostram porção do núcleo de células, de tecidos retirados da borda e do centro, respectivamente, da lesão típica causada pelo CoRSV em folhas de caféiro infectadas proveniente de Coromandel-MG. A figura 11 mostra corte de tecido de caféiro sadio.

As partículas virais foram observadas nas células do mesófilo e não foram visualizadas nas células paliçádicas e da epiderme.

Os resultados, no trabalho, quanto à morfologia e localização das partículas foram semelhantes aos de Kitajima e Costa (1972). Eles observaram, em tecidos

foliares com sintoma da mancha-anular do cafeeiro de diversas regiões do Espírito Santo e São Paulo, partículas medindo de 100 a 110 nm por 35 a 40 nm de diâmetro. Essas medidas foram menores que as encontradas no presente trabalho. Em seu trabalho Kitajima e Costa (1972) verificaram que as partículas encontradas lembram as formas imaturas dos *Fitorhabdovirus*, que se acumulam intranuclearmente antes de completarem seu processo de maturação por brotação, quando passam do interior nuclear à cavidade perinuclear, adquirindo simultaneamente sua membrana envoltória. Chagas (1978 e 1980) cita que encontrou partículas de 59 a 76 nm de comprimento por 178 a 224 nm de diâmetro correspondentes às formas maduras dos *Rhabdovirus*, presentes nas cisternas do retículo endoplasmático e no espaço perinuclear das células do parênquima lacunoso. O autor também cita a presença de partículas tubulares com comprimento de 80 a 151 nm por 38 a 42 nm, similares às formas imaturas dos *Rhabdovirus*, raramente encontradas no nucleoplasma. As partículas observadas no presente trabalho são de tamanho intermediário, sugerindo estar num processo mais avançado no processo de maturação. Por outro lado pode se tratar de partículas virais diferentes das observadas por Kitajima e Costa (1972) e por Chagas (1978 e 1980).

Estudos de cortes ultra-finos observados ao microscópio eletrônico de transmissão efetuados a partir de lesões foliares de *C. quinoa* e *A. tenella* não revelaram a presença de partículas baciliformes. Chagas (1978), também não detectou a presença das partículas típicas de *Rhabdovirus* nas lesões de *C. quinoa*.

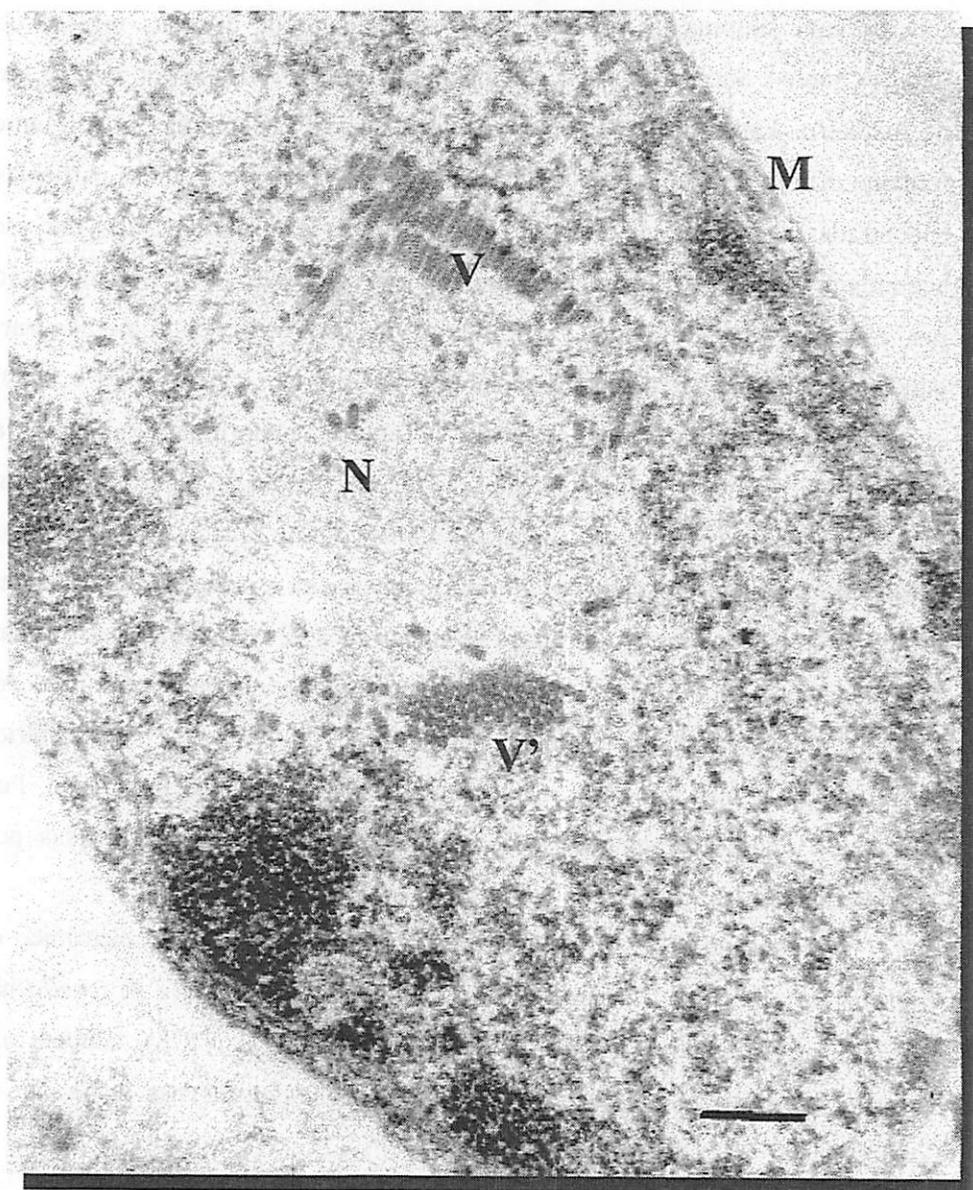


Figura 6. Núcleo de células de tecido foliar de cafeeiro, coletado em Ijaci (MG), mostrando partículas baciliformes do *Coffee ringspot* virus. Observa-se partículas virais dispersas e formando agregados organizados na região diferenciada do núcleo das células. A barra equivale a 0,4 μm . V: vírus; N: núcleo; M: membrana nuclear; V': partículas virais cortadas transversalmente

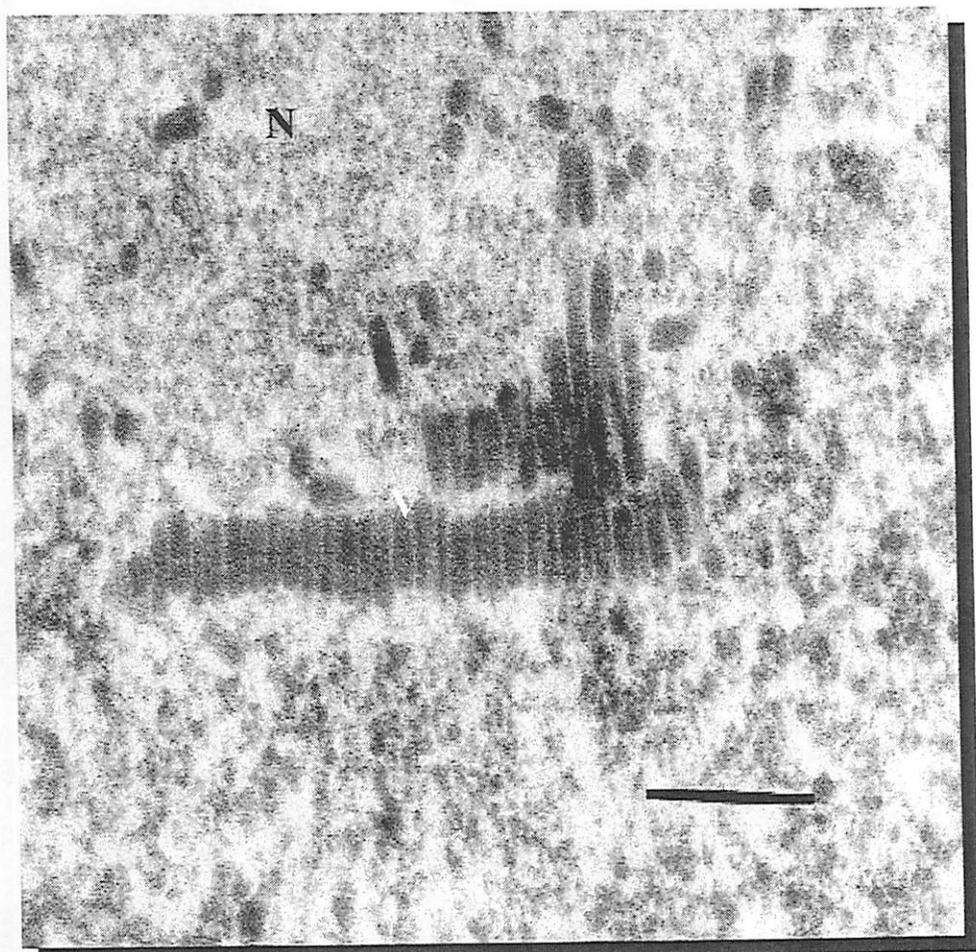
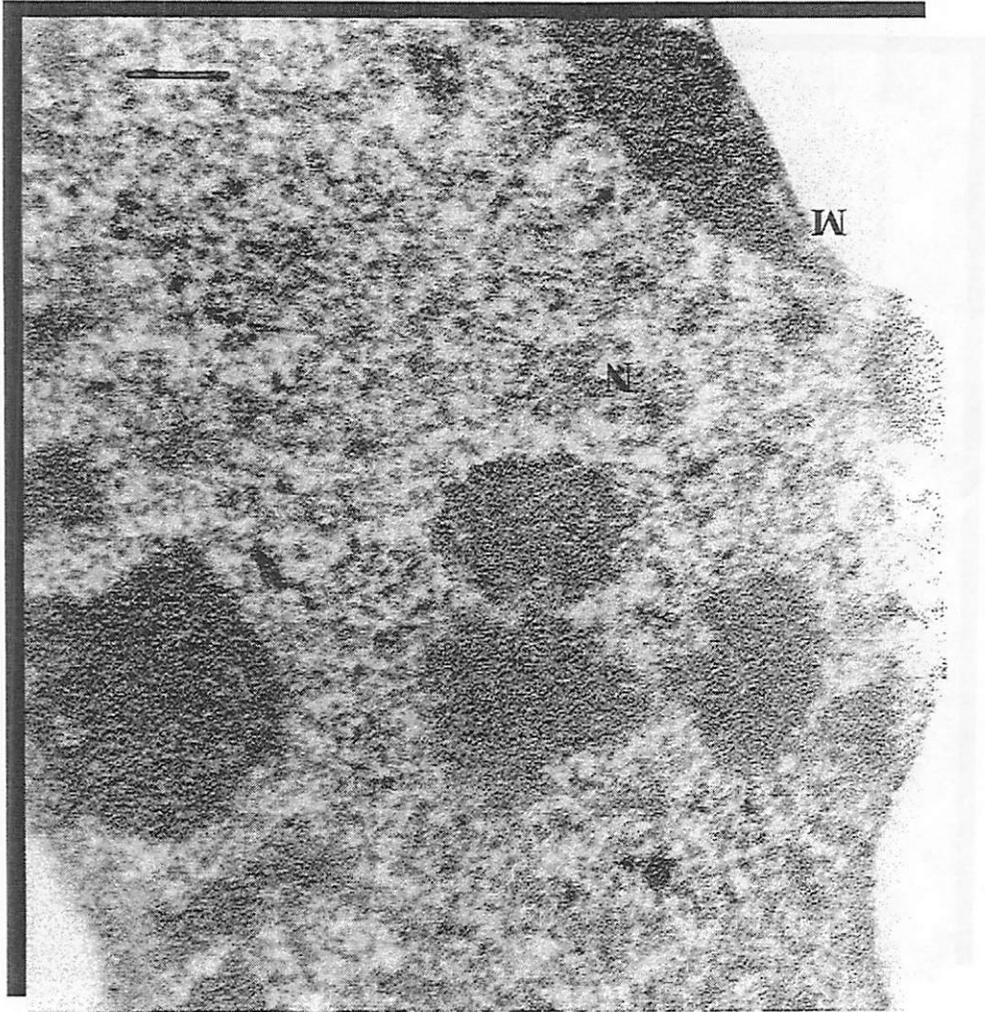


Figura 7. Partículas baciliformes do *Coffee ringspot virus* formando agregados organizados na região do núcleo das células de cafeeiro. A barra equivale a 0,4 μm . V: vírus; N; núcleo.

Figura 11. Núcleo de células de tecido foliar de caféiro sadio, mostrando ausência de partículas virais. A barra equivale a 0,4 µm. N: núcleo; M: membrana nuclear.



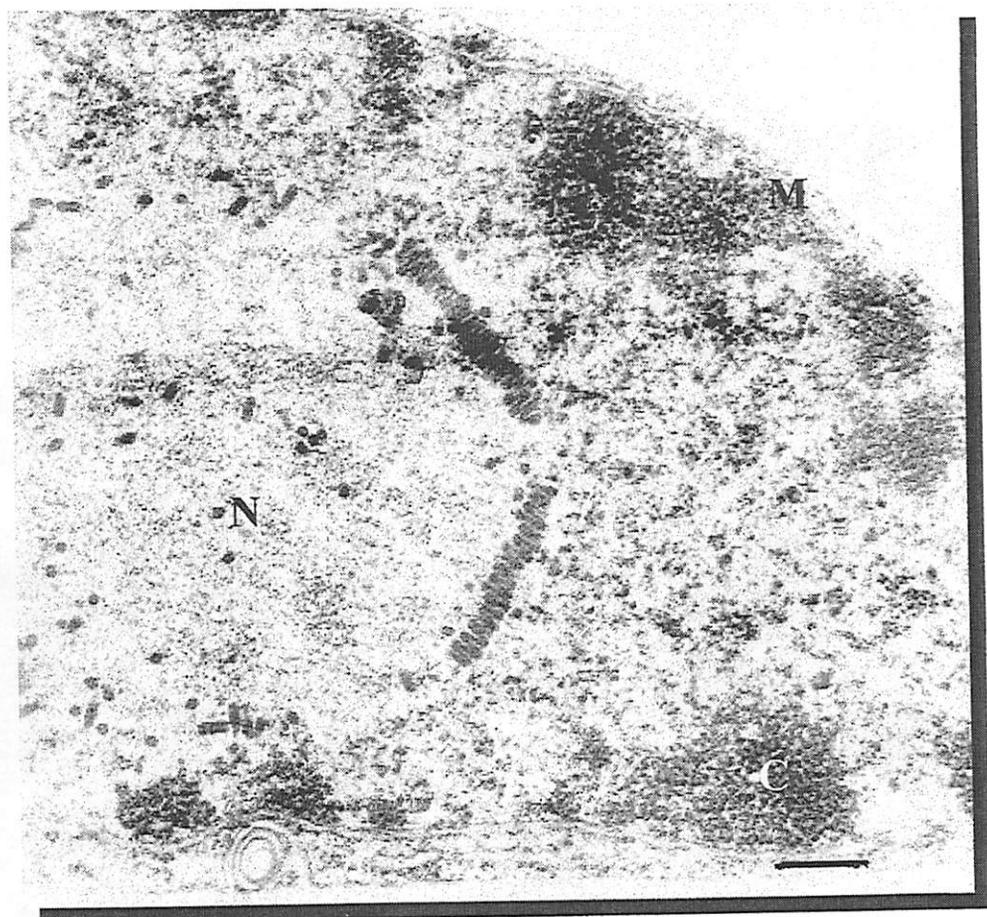


Figura 10. Núcleo de células de tecido foliar de cafeeiro, coletado em Coromandel (MG), mostrando partículas do *Coffee ringspot virus* dispersas na região diferenciada do núcleo das células e formando aglomerados organizados. A barra equivale a 0,4 μm . C: cromatina; N: núcleo; V: vírus; M: membrana nuclear.

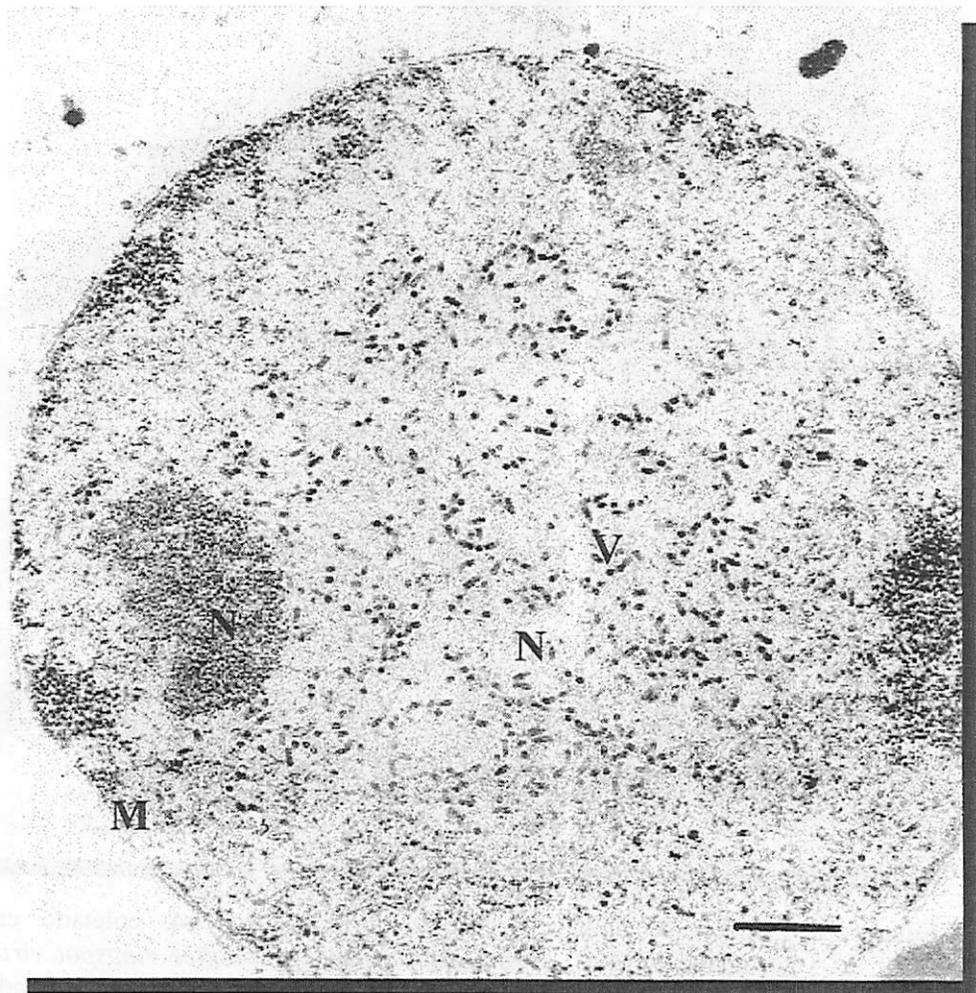


Figura 9. Núcleo de células de tecido foliar de cafeeiro, coletado em Coromandel (MG), mostrando partículas do *Coffee ringspot virus* dispersas na região diferenciada do núcleo das células. A barra equivale a 0,6 μm . NU: nucléolo, N: núcleo; V: vírus; M: membrana nuclear.

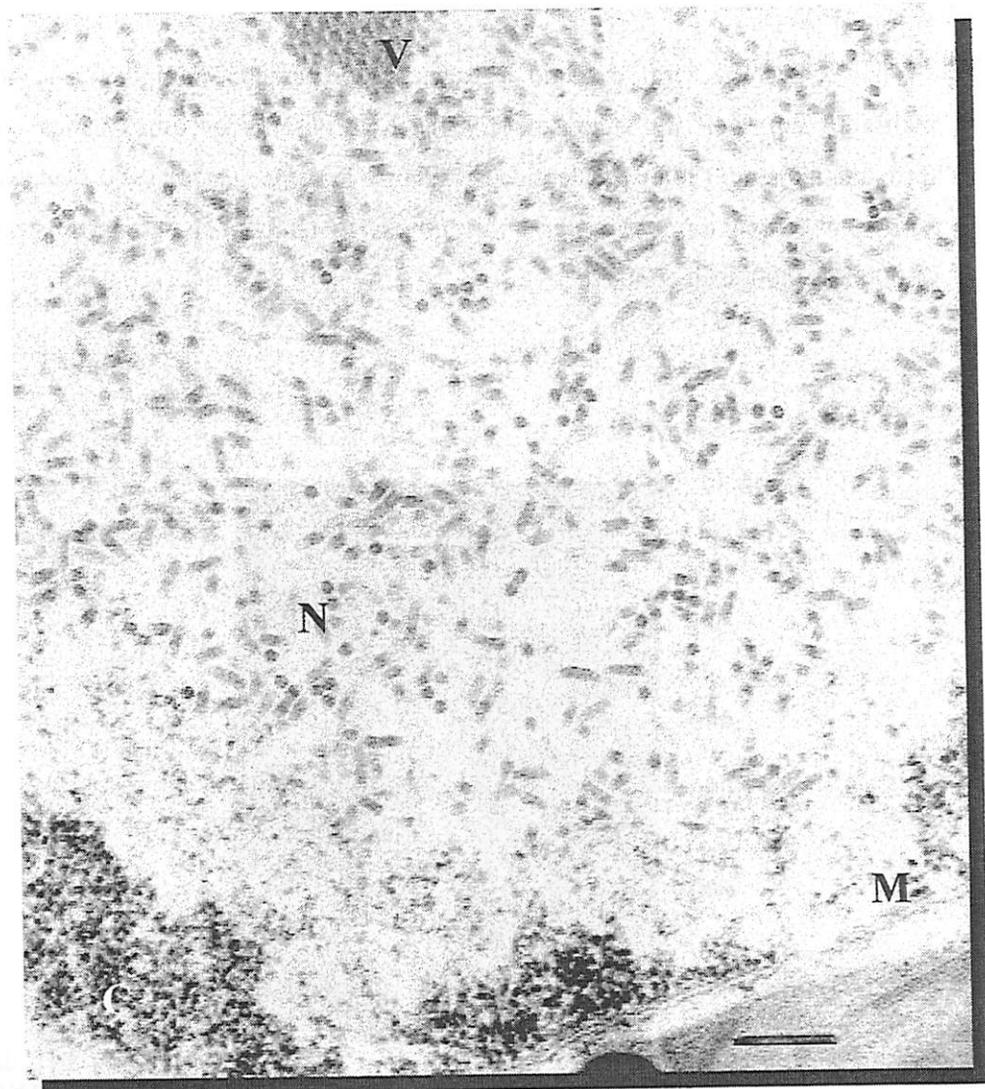


Figura 8. Núcleo de células de tecido de fruto de café, coletado em Ijaci (MG) mostrando partículas do *Coffee ringspot virus* dispersas na região diferenciada do núcleo e formando aglomerados organizados. A barra equivale a 0,4 μm . M: membrana nuclear; N: núcleo; V: vírus; C: cromatina do núcleo.

4.5. RNA viral

O genoma viral extraído a partir da preparação minipurificada foi analisado em gel de agarose (0,9%). Foi observada uma banda de aproximadamente 13.000 nucleotídeos (Figura 11). Os genomas do *Sonchus yellow net virus* e do *Lettuce necrotic yellow virus* também são compostos por 11.000 a 13.000 nucleotídeos.

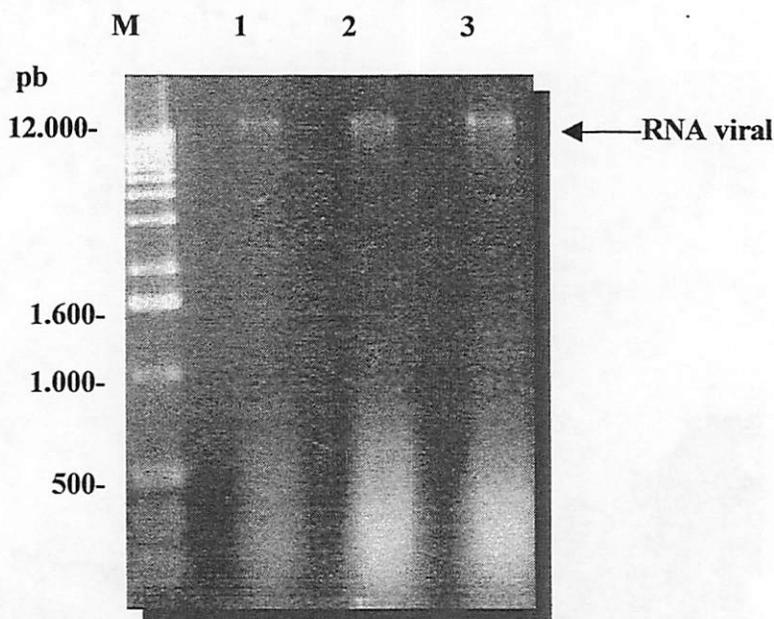


Figura 11. RNA genômico do CoRSV analisado em gel de agarose 0,9%. M: marcador molecular de DNA (1Kb "ladder"), 1-3 RNA genômico.

4.6. Amplificação dos fragmentos de DNA do vírus utilizando “primers” ao acaso

Dos “primers” testados somente o “primer” OPY-05 (GGCTGCGACA) permitiu amplificar fragmentos de DNA que estavam presentes em material proveniente de folhas infectadas e ausentes em material proveniente de folhas saudáveis, sugerindo que poderia ter sido amplificados a partir do RNA viral. (Figura 12). Esses fragmentos foram considerados como candidatos potenciais para serem utilizados em posterior clonagem e sequenciamento, visando a caracterização parcial do ácido nucleico viral.

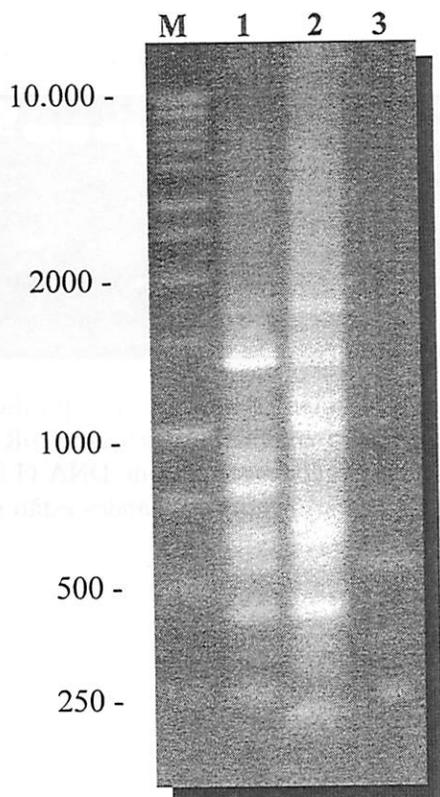


Figura 12. Fragmentos de DNA amplificados através do primer OPY-05 da Operon, em gel de agarose 0,8%. M: marcador molecular de DNA (1 Kb “ladder”); 1: isolado de Ijaci; 2: isolado de Coromandel; 3: sadia.

4.7. Clonagem dos fragmentos obtidos

Após a clonagem, quatorze colônias bacterianas brancas tiveram seus plasmídeos purificados e clivados pela enzima de restrição *EcoR* I. Foi observado que onze deles possuíam plasmídeos recombinantes, contendo fragmentos de DNA de diferentes tamanhos (Figura 13). Dois desses clones (4 e 14) foram selecionados para produção de sondas não-radioativas e sequenciamento. O clone 4 após a clivagem deram origem a dois fragmentos de DNA (490 e 190 pb), e o clone 14 a um fragmento (850 pb), aproximadamente (Figura 14).

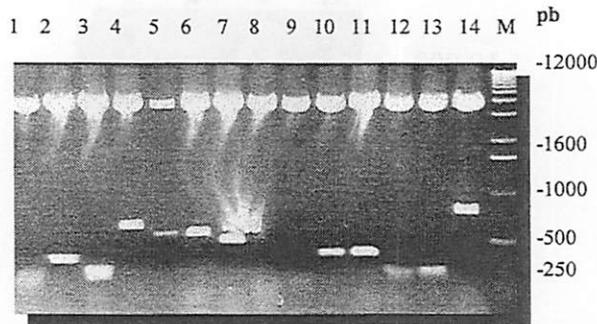


Figura 13. Análise das 14 colônias brancas após purificação do plasmídeo e clivagem com a enzima de restrição *EcoR* I, em gel de agarose 0,8%. M: marcador molecular de DNA (1 Kb "ladder"); 1 – 14: clones. Os comprimentos das bandas estão indicados à direita do gel.

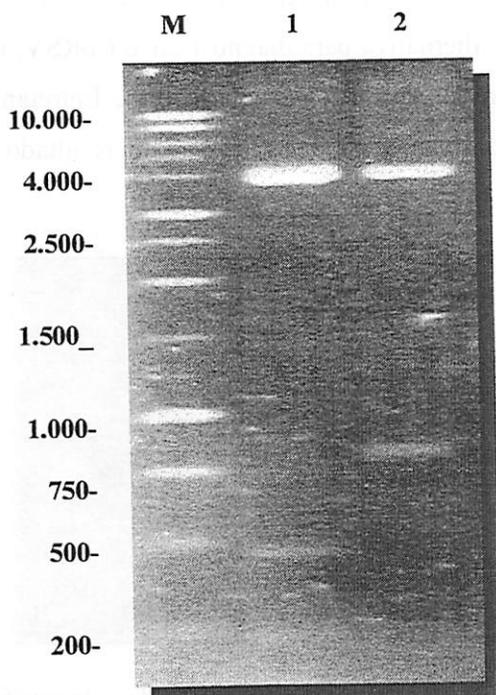


Figura 14. Análise do plasmídeo recombinante após clivagem com a enzima de restrição *EcoR* I, em gel de agarose 0,8%. M: marcador molecular de DNA (1 Kb “ladder”); 1: clone 4; 2: clone 14. Os comprimentos das bandas estão indicados ‘a esquerda do gel.

4.8. Teste de hibridização com sonda não-radioativa

Essa técnica foi realizada com o intuito de verificar se os fragmentos clonados eram realmente do vírus. Os clones 4 e 14, foram marcados com biotina e empregados como sondas na detecção do CoRSV, utilizando a técnica de hibridização com cDNA. As condições de alta especificidade utilizadas para a hibridização (temperatura de 65° C) permitiram o aparecimento de um sinal apenas entre a sonda e o RNA proveniente da purificação parcial do CoRSV oriundo de café infectado. Esse sinal não foi observado com o RNA proveniente da purificação parcial de planta sadia (Figura 15). Esses resultados sugerem que os dois clones obtidos parecem ser realmente do CoRSV. Dessa forma, essa técnica é uma boa alternativa para diagnosticar o CoRSV, não só em plantas de café como também de hospedeiras alternativas. Entretanto novos isolados e amostras devem continuar sendo testados para um resultado definitivo.

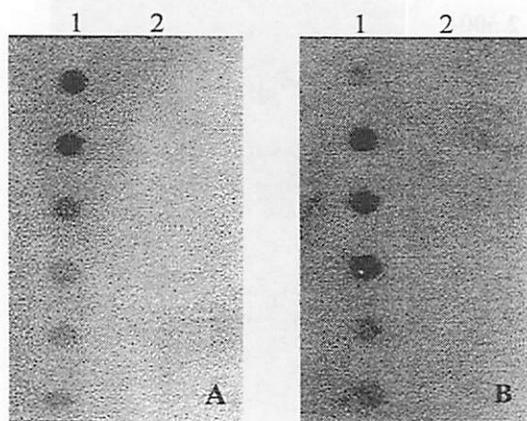


Figura 15. A: Sonda do clone 4., 1: amostra do minipurificado de planta com sintoma do CoRSV, 2: amostra do minipurificado da planta sadia. B: Sonda do clone 14. 1: amostra do minipurificado da planta com sintoma do CoRSV, 2: amostra do minipurificado da planta sadia.

4.9. Sequenciamento

A sequência de 441 nucleotídeos, obtida do clone 14 (Figura 16) foi comparada com as dos *Rhabdovirus* disponíveis no “gene bank”, utilizando o programa GCG e não foi encontrada nenhuma homologia.

Segundo vários autores nenhuma homologia significativa foi encontrada entre os *Fitorhabdovirus* já sequenciados (Heaton, Zuidema e Jackson (1987), Choi *et al.* (1992); Zuidema, Heaton e Jackson (1987); Hillman *et al.* (1990); Wetzel, Dietzgen e Dale (1994).

¹
TCTCTCATAAAGGCTGTTCAACTCGTCTCTTTGATGTTACAATACACCAGCCCGC
TGGGTCAGGATATGTGTTGCAATAAATGACATCTGCTTCTCATTAGTATACT
CATCATCCATATATCTGTCTGACAGTTCCTCAGTCATGGCATTCAITTCACAA
ACACCATCAAGTCCCTTGTGAGAGTCATTGTAGATTCTGACCACTCTCTTCCC
ATACATCTTCCTCCATATCATTAGGCTGACCGCATCTGTAGACACCAGTATA
GTACCTCTTGTCTCATGTANTATGTCCAGTATTGATGAAACACCTGATGCCCC
TAATGGGATTGATCTGGTTATGGGCCCATCTTTCGGGAATGGAACATACTCA
GTACTGTCNGCTATCACATTGTA⁴⁴¹AACTTGTACAGGTGATGACTCCCATTCATA
ATGTTCTGCACGGCTATA

Figura 16. Sequência parcial do fragmento clonado (clone 14) no vetor pCR II. Sequência sublinhada corresponde aos primers desenhados para o RT-PCR.

4.10. RT-PCR

Com base no fragmento sequenciado a partir do clone 14 foram desenhados dois primers com a seguinte sequência: F: 5'AAGGCTGTTCAACTCGTCTC 3' e R: 5'TAGCCGTGCAGAACATTATG 3'.

O resultado da amplificação do ácido nucleico viral com esses “primers” pode ser visualizado na Figura 17 . Houve a amplificação de uma banda com tamanho aproximado de 400 pares de base, que poderiam pertencer ao vírus.

Entretanto, um número mais significativo de amostras devem ser testadas antes de se chegar a um resultado conclusivo, pois poderia também pertencer à planta. O fato de não ter amplificado o ácido nucleico em amostras de RNA extraído de plantas saudias só pode ser considerado definitivo após terem sido testadas um maior número de amostras.

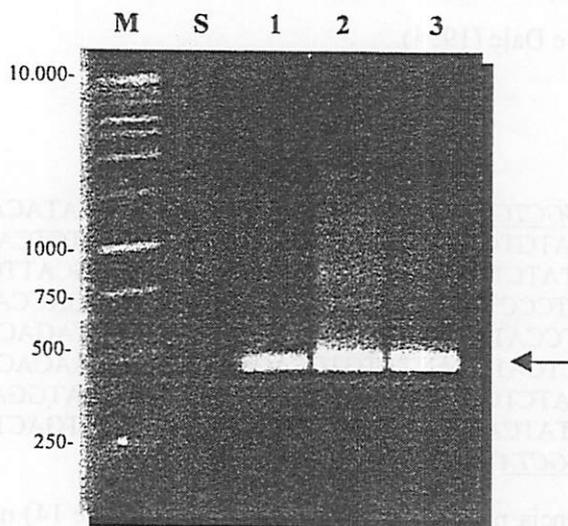


Figura 17. Padrão eletroforético dos fragmentos de DNA amplificados por RT-PCR utilizando os primers desenhados a partir da sequência do clone 14. M: marcador, S: sadia, ! - 3: A seta indica os fragmentos de DNA amplificados de aproximadamente 400 pb.

5. CONCLUSÕES

- 1 - O CoRSV apresenta uma baixa taxa de transmissão mecânica, tendo sido capaz de infectar plantas de *C. quinoa*, *C. amaranticolor* e *A. tenella*.
- 2- O isolado de Alfenas (MG) invadiu sistemicamente plantas de *C. quinoa*.
- 3 - O CoRSV é transmitido de folhas de cafeeiro, infectadas com o CoRSV, para plantas de cafeeiro e de *C. quinoa*, quando se emprega ácaros adultos e larvas ou somente larvas de *Brevipalpus phoenicis*. Parece ser necessário que o ácaro adquira o vírus na fase de larva para que este possa transmiti-lo.
- 4 - Em cortes ultrafinos de células provenientes de folha e frutos de cafeeiro com sintomas típicos do CoRSV, foi observado, ao microscópio eletrônico, um grande número partículas baciliformes, medindo $149,6 \pm 6,1$ nm de comprimento por $49,6 \pm 1,7$ nm no núcleo das células do mesófilo.
- 5 - As técnicas RT-PCR e cDNA são bastante promissoras no estudo do genoma viral, podendo contribuir futuramente para o seu melhor conhecimento e caracterização definitiva.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL, **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 521p. 1999.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. Rio de Janeiro, v. 56, 1996.
- BATISTA, M.F. Métodos moleculares para identificação de patógenos de plantas. In: **Revisão anual de patologia de plantas**. Brasília, v. 1, p. 165-189, 1993.
- BITTANCOURT, A.A.. A mancha anular, uma nova doença do cafeeiro. **O Biológico**, v.4, n.1, p.404-405, 1938.
- BLACK, L.M. Potato yellow dwarf virus. In: Gibbs, A. J.; Harrison B.D.; Murrant, A. F. **Descriptions of plant viroses**, CAB, v.2, n.35, 1970.
- BOAKYE, D.B.; RANGLES, J.W. Epidemiology of lettuce necrotic yellows virus in South Australia. III. Virus transmission promoters and vector feeding behaviors on host and non-host plants. **Aust. J. Agric. Res.**, v.25, n.1, p.791-802, 1974.
- BOARI, A.J. **Caracterização biológica e molecular de isolados do vírus do mosaico do pepino (CMV) e de RNAs satélites associados**, Viçosa, MG: UFV, 1998. 82p. Tese (Doutorado em fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- BRIOSO, P.S.T.; SOUZA DIAS, J.A.C.; COSTA, A.S.; OLIVEIRA, D.E. Detecção de vírus da batata em plantas infectadas e em afídeos virulíferos através de "polymerase chain reaction" e de "dot-blot". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 328-335, 1996.
- CAMARGO, A.P.; SANTINATO, R.; CORTEZA, J.G. Aptidão climática para qualidade da bebida nas principais regiões cafeeiras de arábica no Brasil. In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 18, Araxá, 1992. **Resumos...** Rio de Janeiro:MIC/IBC, p.70-74, 1992.
- CECH, M.; POZDENA, I. & BLATTNÝ. C. Mechanical transmission of infection sterility of hop. **Folia Biologica (Praha)** Tom. III, v.5, p. 314-316, 1957.

- CHAGAS, C.M. Associação do ácaro *Brevipalpus phoenicis* Geijskes à mancha anular do cafeeiro. **O Biólogo**, v. 39, p.229-232, 1973.
- CHAGAS, C.M. Evidências da etiologia viral da mancha anular do cafeeiro. **Fitopatologia brasileira**. Brasília, v.6, p.218-219, 1980.
- CHAGAS, C.M. Mancha anular do cafeeiro: transmissibilidade, identificação do vetor e aspectos anátomo-patológicos da espécie *Coffea arabica*. **São Paulo - Instituto de Biociência da USP**. 1978. 132p. (Tese Doutorado), 1978.
- CHEN, M. J.; SHIKATA, E. Electron microscopy and recovery of rice transitory yellowing virus from its leafhopper vector, *Nephotettix cincticeps*. **Virology**, Orlando, v. 47, p. 483-486, 1972.
- CHIAVEGATO, L.G.; SALIBE, A.A. Transmissibility of leprosis symptoms by *Brevipalpus phoenicis* to young citrus plants under laboratory conditions. In: Garnsey, S.M.; Dodds, A. **Compendium of citrus diseases. Proc. Conf. Int. Organ. Citrus Virol.** 9th. IOCV, Riverside, Califórnia, p.218-221, 1984.
- CHIU, R. J.; JEAN, J. H., CHEN, M. H.; LO, T. C. Transmission of transitory yellowing virus of rice by two leafhoppers. **Phytopathology**, St. Paul, v. 58, p. 740-747, 1968.
- CHOI, T.J.; KUWATA, S.; KOONIN, E.V.; HEATON, L.A.; JACKSON, A.O. Structure of the L (Polymerase) protein gene of sonchus yellow net virus. **Virology**. Orlando, v.189, p.31-39, 1992.
- COSTA, A.S.; SILVA, D.M.; CARVALHO, A.M.B. Infecção de cafeeiros com o vírus de vira-cabeça. **Bragantia**, São Paulo, v.19, 1960.
- CREAMER, R.; HE, X. Transmission of Sorghum stunt mosaic rhabdovirus by the leafhopper vector, *Graminella sonora* (Homoptera: Cicadellidae). **Plant Disease**, St. Paul, v.81, p. 63-65, 1997.
- EIRAS, M.; RESENDE, R. O.; ÁVILA, A.C. Detecção de vírus de plantas através de reação em cadeia da polimerase. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v.23, n.1, p.5-17, 1998.
- FAO - **Yearbook production**. Roma, v. 50, 1996, 172p.

- FERIA-MORALES, A.M. Changes in cup quality when using innovative field practices. **International Coffee Organization**. Londres, 1990. p.2-8. (Sensory-Report), 1990.
- FIGUEIRA, A.R.; DOMIER, L.L.; D'ARCY, C.J. Comparison of techniques for detection of barley yellow dwarf virus-PAV-IL. **Plant Disease**. St. Paul, v.81, n.11, p. 1236-1240, 1997.
- FIGUEIRA, A.R.; PASSETO, L. A. & CARVALHO, C.M., A disseminação do vírus da mancha anular do cafeeiro em Minas Gerais tem aumentado acima das expectativas. **Abstracts do XXXI Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, Fortaleza, p.317, 1998.
- FIGUEIRA, A.R.; REIS, P.R.; CARVALHO, V.L. & PINTO, A.C.S. Coffee ringspot virus is becoming a real problem to brazilian coffee growers. **Abstracts of Xth International Congress of Virology**, Jerusalem - Israel, p.203, 1996.
- FRANCKI, R. I. B.; RANGLES, J. W.; DIETZGEN, R. G. Lettuce necrotic yellows virus. In: **AAB Descriptions of plant viruses**, n. 343, 1989.
- FRANCKI, R.I.B. Plant Rhabdoviruses. **Adv. Virus Res**, v. 18, p. 257-345, 1973.
- GODOY, C. V., BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C. L. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: KIMATI, H. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas e seu controle**. 3 ed, São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, p. 184-200, 1997.
- GOLDBERG, K.B.; MODRELL, B.; HILLMAN, B.I.; HEATON, L.A.; CHOI, T.J.; JACKSON, A.O. Structure of the glycoprotein gene of sonchus yellow net virus, a plant rhabdovirus. **Virology**. Orlando, v.185, n.1, p.32-38, 1991.
- GONZÁLES, R.H. Revision of the *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acarina: Tenuipalpidae). Hawaii Agr. Exp. Sta., Univ. Hawaii, **Tech. Bull**, n.68, 63p, 1969.
- HAMAROTO, F.H. Revision of the *Brevipalpus phoenicis* 'complex' with descriptions of a new species from Chile and Thailand (Acarina, Tenuipalpidae). **Acarologia**, v. 27, n. 1, p. 81-91, 1975.

- HEATON, L. A.; HILLMAN, B. I.; HUNTER, B. G., ZUIDEMA, D.; JACKSON, A. O. Physical map of the genome of sonchus yellow net virus, a plant rhabdovirus with six genes and conserved gene junction sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci.** Washington, v.86, p. 8665-8668, 1989.
- HEATON, L.A.; ZUIDEMA, D.; JACKSON, A.O. Structure of the M2 protein gene of sonchus yellow net virus. **Virology.** Orlando, v.161, p.234-241, 1987.
- HILLMAN, B.I.; HEATON, L.A.; HUNTER, B.G.; MODRELL, B.; JACKSON, A.O. Structure of the gene encoding the M1 protein of sonchus yellow net virus. **Virology.** Orlando, v.179, p.201-207, 1990.
- JACKSON, A. O.; FRANCKI, R. I. B.; ZUIDEMA, D. Biology, structure and replication of plant rhabdovirus. In: Wagner, R. R. (Ed.) **The rhabdovirus.** Plenum Press, New York, p. 427-508, 1987.
- JACKSON, A.O. Partial characterization of the structural of sonchus yellow net virus. **Virology.** Orlando, v.87, p.172-181, 1978.
- JACKSON, A.O.; CHRISTIE, S.R. Sonchus yellow net virus. In: **Descriptions of Plant Viruses.** Wales, v. 12, n. 205, 1979.
- KITAJIMA, E.E.; COSTA, A.S. Partículas baciliformes associadas à mancha anular do cafeeiro. **Ciência e Cultura,** v. 24, n.1, 542-545, 1972.
- KITAJIMA, E. W.; REZENDE, J.A.M.; RODRIGUES, J.C.V.; CHIAVEGATO, L.G.; PIZA JUNIOR, C.T.; MOROZINI, W. Green spot of passion fruit, a possible viral disease associated with infestation by the mite *Brevipalpus phoenicis*. **Fitopatologia Brasileira.** Brasília, v. 22, n. 4, p.555-559, 1997.
- LANE, L. A general method for detecting plant viruses. In: MARAMOROSCH, K. **Plant diseases of viral, viroid, mycoplasma and uncertain origem.** New Delhi: Oxford & IBH Publishing, p.1-15, 1992.
- LEITE, I.P. **Influência de cultivo e do tipo de colheita nas características físicas, composição química do grão e qualidade do café (*Coffea arabica* L.).** Lavras, UFLA. 135p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos), 1991.

- LUO, Z. L.; FANG, R. X. Structure analysis of the rice yellow stunt rhabdovirus glycoprotein gene and its mRNA. *Archives of Virology*, Viena, v.143, n. 12, p. 2453-2459, 1998.
- MATIELLO, J. B.; ABREU, R. G.; ANDRADE, I. P. R. **A cultura do café no Brasil**. Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1974, 262p.
- MATIELLO, J.B.; SANTINATO, R.; MIGUEL, A.E.; PAULINO, A.J.; PAULINI, A.E.; STEVANATO, S.G.; BRAGANÇA, J.B. 1994. **A Moderna Cafeicultura de Montanha**. PROCAFE-DFARA/RJ, Rio de Janeiro/RJ. 22p.1994.
- MATIELLO, J. B. **O café do cultivo ao consumo**. São Paulo: Globo, 1991, 320p.
- MATTHEWS, R.E.F. **Plant virology**. 3. Ed. San Diego, Academic, 1991. 556p.
- MENDES, A. N. G.; GUIMARÃES, R. J. **Economia cafeeira: O Agribusiness**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997a, 42p.
- MENDES, A.N.G.; GUIMARÃES, R.J. **Plantio e formação da lavoura cafeeira**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997b, 42p.
- MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A; SUMMERS, M.D. **Virus Taxonomy – Classification and nomenclature of viruses – Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses**. Springer, Verlag Wien New York, 1995.
- MUSUMECI, M.R.; ROSSETTI, V. Transmissão dos sintomas da leprose dos citros pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*. *Ciência e cultura*, v.15, n.1, p. 228, 1963.
- NORONHA, A.B.; AMELIA, M.; ALEXANDRE, V.; GAETANO, R.; VICENTE, M. Protection against tobacco mosaic virus induced by some Caryophyllales plant extracts. *Microbios*. V.73, n.294, p.75-80, 1993.
- ORGANIZACION INTERNACIONAL DEL CAFE. **Estudios de investigacion de evaluacion sensorial sobre la calidad del café cultivado en la region de Patrocinio en el Estado de Minas Gerais en Brasil**. 28p. (**Reporte de Evaluación Sensorial**), 1991.

- PETERS, D. Plant Rhabdovirus Group. In: Harrison, B.D.; Murant, A. F. Descriptions of Plant Viruses, v.14, n.244, 1981.
- RANGLES, J.W. Transmission and epidemiology of lettuce necrotic yellows virus. In: Current Topics in Vector Research. New York. (K.F. Harris, ed.). Praeger Publishers. v.1, Pp.169-187, 1983.
- REYES, T.T. Ringspot of coffee in the Philippines. **FAO Plant Protection Bulletin**, v. 8, p.11-12, 1959.
- REYES, T.T. Seed transmission of coffee ring spot by Excelsa coffee (*Coffea excelsa*). **Plant Disease Reporter**, v. 45, p.185, 1961.
- RIBEIRO, M. T. F.; MAZZOMO, C. P. L.; DUARTE, L. H.; FENELON, A. N. Tradição e moderno se combinam na definição de uma nova trajetória em busca da competitividade: o caso da cadeia agroalimentar do café do Sul de Minas Gerais. **Desafios e potencialidades da agricultura no sul de Minas. Diagnósticos para discussão**. Lavras: UFLA, p.1-17, 1998.
- RODRIGUES, J.C.V.; NOGUEIRA, N.L.; FREITAS, D.S.; PRATES, H.S. Virus-like particles associated with *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae), vector of Citrus leprosis virus. **An. Soc. Entomol. Brasil**, v.26, n.2, p.391-395, 1997.
- RODRIGUES, J.C.V.; NOGUEIRA, N.L. Ocorrência de *Brevipalpus phoenicis* G. (Acari: Tenuipalpidae) em *Ligustrum lucidum* (Oleaceae) associado à mancha anelar do ligustre. **An. Soc. Entomol. Brasil**, v.25, n.2, p. 343-344, 1996.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. **Molecular cloning – a laboratory manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SILBERSCHMIDT, K. A transmissão experimental da mancha anelar do cafeeiro. **O Biológico**, v. 7, p.93-99. 1941.
- STENGER, D.C.; RICHARDSON, J.; SYLVESTER, E.S.; JACKSON, A.O.; MORRIS, T.J. Analysis of sowthistle yellow vein virus-specific RNAs in infected hosts. **Phytopathology**. St. Paul, v.78, n.11, p.1473-1477, 1998.

- SYLVESTER, E.S.; RICHARDSON, J. Comparison of vector-virus relationships of strawberry crinkle plant rhabdovirus in two aphids (*Chaetosiphon fragaefolii* and *Chaetosiphon jacobi*) infected by injection. *Hilgardia*, v.58, n. 3, p. 1-23, 1990.
- VALDEZ, R.B. The current status of the ring spot disease of coffee in the Phillipines. *The Phillipines Agric.*, v. 50, p.267-275. 1966.
- WAGNER, J.D. Sonchus yellow net nucleorhabdovirus. In: Brunt, A.A., Cbrabtree, K.; Dalwitz, M.J.; Gibbs, A.J. & Watson, L. eds. *Viruses of Plants*. CAB International. Wallingford, U.K. p.1143-1145. 1991.
- WAGNER, J.D.O.; CHOI, T.; JACKSON, A.O. Extraction of nuclei from sonchus yellow net rhabdovirus-infected plants yields a polymérase that synthesizes viral mRNA and polyadenylated plus-strand leader RNA. *Jornal of Virology*, Reading, v.70, n.1, p.468-477, 1996.
- WAGNER, R.; ROSE, J. K. Rhabdoviridae: The viruses and their replication. In: Fields, B.N., Knipe, D.M. e Howley, P.M. (Eds.) *Fields Virology*, 3rd ed. Lipincott-Raven, Philadelphia. Pp. 1121-1135, 1996.
- WETZEL, T.; DIETZGEN, R. G.; DALE, J. L. Genomic organization of lettuce necrotic yellows rhabdovirus. *Virology*, Orlando, v. 200, p. 401-412, 1994.
- WETZEL, T.; DIETZGEN, R. G.; GEERING, A. D. W.; DALE, J. L. Analysis of the nucleocapsid gene of lettuce necrotic yellows rhabdovirus. *Virology*, Orlando, v. 202, p. 1054-1057, 1994.
- WUNNER, W. H.; CALISHER, C. H.; DIETZGEN, R. G.; JACKSON, A.O.; KITAJIMA, E. W.; LAFON, M.; LEONG, J. C.; NICHOL, S. T.; PETERS, D.; SMITH, J. S.; WALKER, P. J. Rhabdoviridae. In: *Classification and nomenclature of viroses*. Springer-verlag, New York in press, 1994.
- ZAMBOLIM, L.; RIBEIRO DO VALE, F. X.; PEREIRA, A. A.; CHAVES, G. M. Café (*Coffea arabica* L.), controle de doenças. In: RIBEIRO DO VALE, F. X.; ZAMBOLIM, L. *Controle de doenças de plantas: grandes culturas*. Viçosa: Departamento de Fitopatologia; Brasília: Ministério da Agricultura e Abastecimento, v. 2, p. 83-179, 1997.
- ZUIDEMA, D.; HEATON, L.A.; JACKSON, A.O. Structure of the nucleocapsid protein gene of sonchus yellow net virus. *Virology*. Orlando, v.159, p.373-380, 1987.