

T/UNICAMP

V521m

13681

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

UNICAMP

INSTITUTO DE BIOLOGIA

MECANISMO DE RESISTÊNCIA AO
VÍRUS DO MOSAICO DA SOJA
DA VARIEDADE IAC-2

JORGE VEGA

Orientador: Dr. Alvaro S. Costa

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Esta-
dual de Campinas para obtenção
do título de Doutor em Biologia
Vegetal.

CAMPINAS

Estado de São Paulo - Brasil

Janeiro - 1991

*Este exemplar corresponde à reedição
imel de tese defendida pelo candidato
para obtenção do título de doutor em ciências
e aprovada pela comissão julgadora.
Campinas, 26 de março de 1991*

BC/9103815

V521m
13681/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A Irene e nossos filhos
Diego, Lucas e Tomás.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. ALVARO SANTOS COSTA, por tudo o que com ele aprendi e continuo a apreender, por sua orientação no sentido mais amplo do termo. Não só pela orientação desta tese, mas pelo profundo ensinamento do cotidiano destes últimos 14 anos colocando ao nosso alcance, além de seu enorme conhecimento e aguda inteligência, um exemplo de vitalidade e entusiasmo pela pesquisa com lucidez e sabedoria.

Ao Dr. AVELINO RODRIGUES DE OLIVEIRA pelo seu constante estímulo, sua preocupação de compartilhar com nós seu entusiasmo pela pesquisa em virologia vegetal, e pelas correções e sugestões feitas ao presente trabalho.

Aos Drs. JUAREZ A. BETTI, GERD W. MULLER, HUGO KUNIYUKI, VALDIR YUKI, JOSÉ ALBERTO CARAM DE SOUZA DIAS e NIVALDO GIRADO, colegas da Seção de Virologia do IAC, pelo apoio e compreensão durante a preparação desta tese.

Aos Drs. MARY ANNE HEIDI DOLDER e ANTÔNIO C. N. MAGALHÃES pelas correções e sugestões apresentadas ao presente trabalho.

Aos Drs. H. J. VETTEN (Institut für Viruskrankheiten der pflanzen, Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft, Braunschweig, Alemanha) e ERNEST HIEBERT (University of Florida, Gainesville, U.S.A.) pelo fornecimento de antissoros que possibilitaram testes fundamentais para esta tese.

Ao INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS, pelo apoio recebido para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

Ao CONSELHO NACIONAL de DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO e TECNOLÓGICO (CNPq), pelo apoio recebido para a realização de pesquisas incluídas nesta tese, na forma de bolsas e auxílios de pesquisa.

As Biologistas CÉLIA R. BAPTISTA e SANDRA M. M. SCAGLIUSI, estagiárias de pós-graduação da Seção de Virologia do IAC, pela amizade, e o apoio e colaboração na execução desta tese.

A ELIZABETH A. BAPTISTA DE NARDO e JOSÉ OSMAR GASPAR pelas sugestões, apoio e o estímulo da sua amizade.

Aos Funcionários da Seção de Virologia do IAC, pela colaboração recebida, em particular a MARIA TEREZA DOS ANJOS PADOVANI e EDSON MOACIR ISQUIO.

A IRENE, DIEGO, LUCAS e TOMAS por sua compreensão, paciência e colaboração para tornar possível esta tese, e principalmente por preencher outra parte da vida que não se resume em teses acadêmicas.

CONTEUDO

1. RESUMO	1
2. ABSTRACT	4
3. INTRODUÇÃO	7
4. REVISÃO DE LITERATURA	9
4.1. Importância dos potyvirus	9
4.2. Propriedades dos potyvirus	12
4.3. Composição química e replicação dos potyvirus .	13
4.4. Tipos de resposta à infecção por potyvirus	14
4.4.1. IMUNIDADE	19
4.4.2. HIPERSENSIBILIDADE	21
4.4.3. RESISTÊNCIA	26
4.4.4. SUSCETIBILIDADE	30
5. MATERIAIS E MÉTODOS	32
5.1. Plantas hospedeiras e vírus	32
5.2. Avaliação da concentração de vírus	34
5.3. Estudos citopatológicos	35
5.4. Métodos de imuno-citoquímica	35
5.4.1. Processamento das amostras para exame	35
5.4.2. Preparação da sonda de Pro. A-ouro coloidal .	36
5.4.3. Antissoros utilizados em "immunogold"	36
5.4.4. Procedimento para imunocitoquímica	36

5.5. Citoquímica enzimática	37
5.6. Dosagem da atividade da catalase	37
5.7. Determinação da peroxidase	38
6. RESULTADOS	39
6.1. Sintomatologia: influência da temperatura	39
6.2. Concentração do vírus em relação à temperatura e às áreas do mosaico	41
6.3. Citopatologia	45
6.3.1. Inclusões citoplasmáticas lamelares e membranosas	45
6.3.2. Imuno-citoquímica	47
6.3.3. Efeito do tratamento térmico na citopatologia	51
6.3.4. Citopatologia nas áreas do mosaico	53
6.4. Alterações das atividades enzimáticas associadas com a infecção viral	55
6.4.1. Aumento de atividade da catalase no modelo de suscetibilidade e efeito da temperatura .	55
6.4.2. Aumento de atividade catalásica no modelo de resistência: efeito da temperatura e variação nas áreas diferenciadas do mosaico .	56
6.4.3. Correlação entre atividade da catalase e concentração do vírus e efeito da temperatura	58
6.4.4. Incremento na atividade da peroxidase em relação à temperatura e variação nas áreas diferenciadas do mosaico	62
6.4.5. Relação entre peroxidase e concentração do vírus	63

7. DISCUSSÃO	64
7.1. Proposta de um esquema geral para a interpretação dos resultados	70
7.2. As espécies ativas de oxigênio e a defesa contra patógenos	73
7.3. Fotorrespiração e resistência à vírus	76
7.4. Provável papel da catalase peroxisomal no mecanismo de resistência	79
8. CONCLUSÕES	82
9. LITERATURA CITADA	84

1 . RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi contribuir ao conhecimento do mecanismo de resistência que a soja IAC-2 apresenta ao vírus do mosaico da soja (VMS). Este tipo de resistência, embora não impeça a infecção pelo vírus, se caracteriza pela gradual remissão dos sintomas, por apresentar índices muito baixos de transmissão do vírus pela semente e também pelos baixos índices de manchamento da semente (mancha-café) causado pelo vírus.

A resistência da soja IAC-2 difere da normalmente utilizada no melhoramento desta espécie, associada a genes que conferem hipersensibilidade ao VMS.

A soja IAC-2 foi estudada comparativamente utilizando como referencial a variedade Santa Rosa, que apresenta características típicas de suscetibilidade ao VMS. A influência da temperatura sobre a resistência foi especialmente considerada, comparando-se tratamentos de alta (30-34°C) e baixa (20-24°C) temperatura. Foram analisados os seguintes parâmetros: a. evolução dos sintomas foliares em diferentes temperaturas; b. concentração de vírus avaliada através de MEIAD (microscopia eletrônica de imuno-adsorção); c. citopatologia ao nível de microscopia eletrônica; d. localização intracelular de proteínas virais através de imuno-citoquímica ("immunogold"); e. localização da catalase

peroxisomal por citoquímica enzimática; f. atividade da catalase (EC 1.11.1.6) determinada por espectrofotometria e g. atividade da peroxidase (EC 1.11.1.7) determinada pelo teste do guayacol.

Na variedade resistente IAC-2 foi verificado que em alta temperatura as áreas verde-escuras do mosaico foliar aumentaram sua superfície, acelerando a regressão dos sintomas. Isto não aconteceu na variedade suscetível Santa Rosa. A concentração de vírus foi menor nas plantas mantida em alta temperatura, mas esta diferença só ocorreu na variedade resistente IAC-2. A concentração viral nas áreas verde-escuras foi menor do que nas verde-claras.

A associação entre peroxisomas e inclusões citoplasmáticas virais parece ser mais freqüente na variedade resistente IAC-2, especialmente na junção entre as áreas verde-claras e escuras do mosaico.

A atividade da catalase aumentou significativamente por efeito da infecção na variedade resistente. Na soja suscetível Santa Rosa a infecção só causou aumento desta atividade enzimática em alta temperatura, e em menor proporção.

Na variedade IAC-2 em baixa temperatura, as áreas verde-claras apresentaram menor atividade catalásica que as escuras. Em alta temperatura a catalase não difere nas áreas do mosaico e foi verificada correlação inversa significativa entre atividade catalásica e concentração de vírus. Em baixa temperatura não houve correlação.

Na soja resistente a atividade da peroxidase aumentou por efeito da infecção tanto em alta com em baixa temperatura e sua distribuição seguiu um padrão inverso ao da catalase: foi mais ativa nas áreas verde-claras, que contêm mais vírus. Não foi detectada correlação entre a atividade desta enzima e a concentração viral.

Para a interpretação dos resultados é proposto um esquema geral que é consistente com os resultados obtidos. O peróxido de hidrogênio (uma das espécies ativas de oxigênio, EAO) é produzido dentro do peroxisoma como um subproduto da fotorrespiração. O aumento no nível de catalase, verificado experimentalmente, seria causado pela infecção viral como parte de um mecanismo defensivo que usaria as EAOs para obstruir a replicação do vírus. A alta temperatura causa aumento da fotorrespiração, incrementando a produção de peróxido de hidrogênio, e provavelmente outras EAOs, no peroxisoma. A maior disponibilidade de EAOs resultaria numa mais eficiente oxidação das inclusões virais, que presume-se são estruturas replicativas do vírus. Isto resultaria numa queda mais rápida da concentração viral e na aceleração da remissão dos sintomas.

Os danos por oxidação nas inclusões poderiam ocorrer através de uma reação peroxidásica do complexo H_2O_2 -catalase (complexo I). Outra possibilidade seria que o complexo I liberasse outras EAOs, como o radical hidroxila, de maior reatividade. Desta hipótese surge a possibilidade de que o excesso de catalase nos peroxisomas tenha como função a de ser um reservatório de EAOs, que poderiam assim ser utilizadas em diversos processos, entre eles a defesa contra a infecção viral.

A ação de EAOs sobre as inclusões, com funções na replicação viral, seria a causa da queda de concentração de vírus verificada na variedade resistente. O menor nível de vírus resultaria na remissão dos sintomas foliares. Presumivelmente, a menor concentração de vírus dificultaria a invasão dos primórdios florais, o que explicaria a menor frequência de sementes com mancha-café e menor transmissão pela semente.

2 . ABSTRACT

MECHANISM OF RESISTANCE TO SOYBEAN MOSAIC VIRUS OF SOYBEAN CULTIVAR IAC-2

The soybean cultivar IAC-2 has a type of resistance to soybean mosaic virus (SMV, potyvirus) that, though it does not avoid the infection, induces a gradual remission of symptoms. Moreover, this cultivar exhibits very low values of virus seed transmission and also low indexes of seed coat mottling. This type of resistance differs from the normally used in soybean breeding, based on few genes that confer hypersensitivity to SMV.

The IAC-2 soybean was comparatively studied, using the cultivar "Santa Rosa" as the susceptibility reference. The influence of temperature was assessed by comparing treatments at high and low temperatures (respectively 30-34°C and 20-24°C). The parameters examined were: a. evolution of foliar symptoms; b. virus concentration determined by ISEM (immuno sorbent electron microscopy); c. cytopathology at the electron microscope level; d. intracellular localization of viral proteins through

immunogold methods; e. peroxisomal catalase localization by enzyme cytochemistry; f. catalase (EC 1.11.1.6) activity, determined by spectrophotometry, and g. peroxidase (EC 1.11.1.7) activity determined by the guayacol test.

The resistant cultivar IAC-2 at high temperature showed an increase in size of the dark green areas, which accelerated the remission of symptoms. This did not occur in the susceptible cultivar Santa Rosa. The plants submitted to high temperature had lower virus concentration, but this difference was significant only in the resistant cultivar IAC-2. The dark green areas contained lesser virus than the light green areas.

The association of peroxisomes and virus induced cytoplasmic inclusions appeared more frequently in the resistant cultivar. This association was especially abundant in the limits between the dark and light green areas.

The level of catalasic activity was significantly increased as a result of SMV infection in the resistant IAC-2 soybean. The susceptible cultivar Santa Rosa showed a smaller increase in catalase activity and only at high temperature.

The light green areas of the IAC-2 cultivar showed lower catalasic activity at low temperature. At high temperature the two mosaic areas did not differ in this enzymatic activity, but it was significantly correlated (inversely) to virus concentration.

Activity of peroxidase increased at low and high temperature and its distribution followed an inverse pattern to catalase: peroxidase was more active in light green areas, which contain more virus. However, no significant correlation was detected between peroxidase activity and virus concentration.

A general scheme is proposed for the interpretation of

the results. Hydrogen peroxide (one of the active oxygen species, AOS) is produced within the peroxisomes as a normal by-product of photorespiration. The augment of catalase activity, here demonstrated, would be elicited by the virus infection as part of a mechanism which uses the AOS to obstruct the virus replication. The high temperature increases photorespiration, resulting in a greater production of hydrogen peroxide and probably other AOS, within peroxisomes. The greater availability of AOS would result in a more efficient oxidation of the virus inclusions, which are putative replicative structures. This would result in a faster reduction of virus concentration, followed by the remission of symptoms.

The oxidative damages in the virus replicative structures may happen through a peroxidative reaction of H_2O_2 -catalase (complex I). Another possibility would be the generation of more reactive AOS, as the hydroxyl radical, from the complex I. From this interpretation raises the hypothesis that the large excess of catalase present in the peroxisomes may function as a AOS reservoir, that would be used in different processes, among them the defense against virus infection.

The virus concentration would drop as a consequence of oxidative lesions of the inclusions, and this would cause the remission of foliar symptoms. Presumably the lower virus concentration would be a factor for the poor invasion of floral primordia, explaining the low frequency of seed coat mottling and low seed transmission of the virus.

3. INTRODUÇÃO

O presente estudo analisa a relação virus-hospedeira (vírus do mosaico-soja) num modelo que apresenta um tipo de resistência diferente dos normalmente utilizados para melhoramento nesta espécie. O modelo é especialmente interessante, pois além de oferecer possibilidades experimentais, é também de importância econômica e social. A soja é um produto agrícola com significativa participação nas exportações brasileiras e constitui uma importante fonte de proteínas para alimentação humana, seja de forma direta ou indireta, como forragens. Outro sub-produto desta leguminosa é também o óleo alimentício, importante por ser o mais consumido no Brasil, principalmente em função do seu menor custo.

O patógeno estudado, o vírus do mosaico da soja, é causador de perdas significativas em todas as regiões produtoras de soja do mundo, incluindo logicamente o Brasil que é atualmente o segundo produtor mundial deste grão. Além dos danos que causa à cultura de soja, este vírus é também uma ameaça potencial para a cultura do feijoeiro. O vírus do mosaico da soja (VMS) é membro dos potyvirus, hoje considerado o maior grupo de vírus fitopatogênicos.

O fato deste vírus ter-se espalhado pelo mundo todo é devido à capacidade de transmissão pela semente, uma propriedade infrequente entre os vírus vegetais. O modelo estudado foi escolhido, precisamente, pela propriedade da soja IAC-2 de, embora suscetível à infecção, apresentar índices muito baixos de transmissão pela semente. Também tem sido assinalada a menor proporção de grãos defeituosos (com mancha-café) produzidos por esta variedade, em comparação com outras suscetíveis (COSTA et al.1981).

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Importância dos potyvirus.

Os potyvirus constituem o grupo de vírus fitopatógenicos mais importante, tanto pelo número de vírus que compreende como pela importância econômica das doenças a eles associadas. Como grupo foi proposto em 1959 por BRANDES e WETTER na descrição de doze grupos de vírus alongados. Neste trabalho inicial os atuais potyvirus formavam os grupos 10 e 11, caracterizados por partículas flexuosas de 730 e 750 nm (respectivamente os grupos 10 e 11) de comprimento ("normal length"). O nome do grupo, potyvirus, foi dado em 1971 pelo sub-comité de vírus de plantas do ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) formando uma sigla derivada do nome em inglês do vírus tipo: "potato Y virus (HARRISON et al., 1971).

O número de vírus atualmente classificados neste grupo varia muito, não tanto pela descoberta de novos potyvirus, mas principalmente por não existirem critérios conclusivos para considerar um potyvirus "vírus" distinto de estirpe ou patotipo. Assim, segundo HOLLINGS e BRUNT (1981) a lista é

de 85 membros efetivos e 102 possíveis membros, entanto que MATTHEWS (1982) conta 48 membros definitivos e 67 possíveis. FRANCKI et al (1985) inclui 37 definitivos e 105 possíveis membros deste grupo e por sua vez MILNE (1988) considera 79 membros definitivos e 105 possíveis membros. Estes dados numéricos dão uma clara idéia da magnitude do grupo e das dificuldades que sua classificação apresenta. Quanto à importância econômica é suficiente examinar os três exemplos citados em seguida que demonstram o problema que os potyvirus constituem para a agricultura, no passado e na atualidade.

O vírus do mosaico da cana de açúcar ("sugarcane mosaic virus ") tornou-se nas primeiras décadas deste século uma causa importante de perdas na produção de cana, em praticamente todos os países produtores de América. Este potyvirus pode causar perdas de produção de até 70% nas variedades mais sensíveis. A produtividade foi recuperada pelo uso de híbridos tolerantes ao vírus, mas o patógeno continua sendo endêmico nas regiões produtoras do centro-sul do Brasil. Esta situação obriga à manutenção programas de produção de material propagativo sadio, e à permanente atenção ao nível de tolerância nas variedades novas (MATSUOKA, 1982).

O vírus do mosaico do mamoeiro ("papaya ringspot virus isolate P") é outro potyvirus cuja importância econômica tem crescido desde a década dos sessenta, ao ponto de impossibilitar a cultura comercial do mamoeiro na região sul do Brasil, onde é endêmico (COSTA e MULLER, 1982). Este vírus causa manchas anelares nos frutos, mosaico foliar e poste-

riormente torna as plantas improdutivas. As áreas produtoras continuam ameaçadas, a pesar de terem-se deslocado para os estados do norte (Bahia, Espírito Santo) para evitar o vírus. Não existe, até o presente, um meio eficiente de controle para este vírus. Os relatos de WANG et al. (1987) e YEH et al. (1988) mostram que a premunização é uma solução viável para este vírus em Taiwan. Os ensaios de premunização realizados no Brasil não tem dado os resultados esperados, principalmente por falta de estabilidade dos isolados fracos, utilizados como protetores (REZENDE e COSTA, 1987).

Outro potyvirus de importância econômica é o vírus do mosaico comum da soja (VMS, "soybean mosaic virus"), objeto do presente estudo, que por ser transmitido através da semente encontra-se espalhado em todas as regiões produtoras do mundo. Este vírus, além de provocar perdas significativas, que dependem da variedade e da época de infecção, deprecia o produto final por causar a "mancha café" na semente. O controle baseia-se no uso de variedades com certo grau de tolerância ou com hipersensibilidade (COSTA, 1977). O VMS constitui também uma ameaça potencial para algumas variedades de feijoeiro, dos grupos preto e rosinha que são suscetíveis. As variedades de feijoeiro hipersensíveis ao vírus do mosaico comum do feijoeiro, outro potyvirus, reagem também com hipersensibilidade à infecção pelo VMS. Este vírus pode causar lesões locais necróticas e necrose sistêmica, sintomas semelhantes aos da "necrose do topo", moléstia causada pelo vírus do mosaico comum do feijoeiro nestas variedades (COSTA 1987).

4.2. Propriedades dos potyvirus.

Todos os membros do grupo potyvirus compartilham numerosas características, algumas das quais são exclusivas do grupo. A forma e tamanho da partícula viral, base da proposta original do grupo (BRANDES and WETTER, 1959), é sem dúvida uma das características mais importantes de todos os potyvirus. A partícula é alongada e flexuosa com 12-15 nm de diâmetro e comprimento modal de 750 nm. Embora exista certa variabilidade no comprimento dos diferentes virus do grupo, MILNE (1988) considera que um comprimento modal significativamente diferente desse valor pode permitir a identificação ao nível de vírus ou estirpe (isolado).

Na citopatologia induzida pelos potyvirus há outra propriedade comum a todos os membros do grupo. Esta se caracteriza pela formação de inclusões citoplasmáticas típicas. As inclusões são basicamente formadas por uma lamela de natureza protéica, que forma três tipos de estruturas: a. Os cataventos ("pinwheels") que são visíveis em cortes transversais de inclusões formadas por várias lamelas, geralmente curvas, dispostas em forma de raios em volta de uma área central. b. Os rolos, de forma cilíndrica, onde a lamela aparece enrolada como um pergamino. c. Inclusões laminadas, de aspecto rígido, formadas pela sobreposição de várias camadas da lamela básica. A predominância dos diferentes tipos de inclusões tem sido usada como base para sub-dividir os potyvirus (EDWARDSON, 1974).

A grande maioria dos potyvirus são transmitidos por afídeos, sendo raridades os potyvirus com outro tipo de vetor: são conhecidos somente cinco transmitidos por ácaros, um pela mosca branca Bemisia tabaci e quatro por fungos (MILNE, 1988). A inclusão destes vírus com vetores não afídeos entre os potyvirus é legitimizada, principalmente,

pela formação dos característicos cataventos no citoplasma das células infetadas.

4.3. Composição química e replicação dos potyvirus.

As partículas dos potyvirus contêm aproximadamente 5% de RNA e 95% de proteína. O ácido nucléico purificado por eletroforese apresenta um peso molecular relativo (p.m.r.) entre $3,0$ e $3,5 \times 10^6$. A proteína capsidial é formada por subunidades constituídas por um único polipeptídeo de p.m.r. $32-34 \times 10^3$. Cada partícula contém uma única molécula de RNA de aproximadamente 10.000 nucleotídeos, protegida pelo capsídeo formado por cerca de 2.000 subunidades protéicas. Estudos de tradução in vitro demonstram que o RNA genômico é (+), ou seja que é funcional como RNA mensageiro, sendo possível sua tradução em diversos sistemas in vitro (DOUGHERTY and HIEBERT, 1980 a,b,c).

A partir dos estudos de tradução do RNA viral in vitro tem sido proposta uma estratégia de expressão do genoma que seria similar à que ocorre na planta hospedeira. Segundo estes trabalhos o RNA dos potyvirus seria traduzido como se fosse um único gene, produzindo uma poli-proteína que é rapidamente fragmentada, através de um processo proteolítico de clivagem, originando as proteínas virais "maduras" (DOUGHERTY and CARRINGTON, 1988). A função de algumas destas proteínas é conhecida, como no caso da proteína capsidial. Mas a função de várias das proteínas produzidas pelo vírus é só presumida ou desconhecida.

Uma das vantagens dos potyvirus para este tipo de estudos é que, além da proteína da capa viral, também as proteínas das inclusões podem ser purificadas e portanto identificadas através de anticorpos específicos como produtos do genoma

viral (DOUGHERTY and HIEBERT, 1980b). Trabalhos mais recentes têm demonstrado que a atividade proteásica que divide a poliproteína está localizada numa fração ("domain") desta: a que é liberada com um p.m.r. de 49 K e forma parte da inclusão nuclear de alguns potyvirus como o TEV ("tobacco etch virus") (CARRINGTON and DOUGHERTY, 1987).

A utilização de técnicas de engenharia genética para produzir poliproteínas com seqüências modificadas nos pontos de clivagem, e utilizadas como substrato para a proteinase 49 K, tem permitido identificar a seqüência de 7 aminoácidos que é reconhecida pela enzima, e determina o ponto de fragmentação da poliproteína (DOUGHERTY and CARRINGTON, 1988).

4.4. Tipos de resposta à infecção por potyvirus.

A interação entre planta e vírus pode resultar numa diversidade de respostas, cujos nomes variam muito entre diferentes autores. Na tabela 1 são apresentadas algumas das denominações dadas a fenômenos similares em cinco revisões recentes.

Curiosamente é na denominação de hipersensibilidade, uma resposta que não corresponde a nenhum dos extremos da escala, onde mais concordam estes autores. Embora KASSANIS (1981), outro autor de relevância, considere o termo enganoso ("misleading") porque implicaria que a localização do vírus é consequência da necrose, é seguramente o termo mais aceito na literatura.

Em alguns casos a diversidade de conceitos não é refletida pelos nomes dados a cada tipo de resposta, mas pelo processo ao qual o autor atribui essa resposta. Assim por exemplo ATABEKOV e DOROKHOV (1984) atribuem especial importância aos processos que dificultam a distribuição do vírus na planta, ao passo que PONZ e BRUENING (1986) dão

Tabela 1. Terminologia usada por cinco autores para denominar fenômenos semelhantes na relação vírus-hospedeira

Fenômeno	Denominação	AUTORES				
		A	B	C	D	E
I	Insuscetibilidade	⊗				
	Resistência extrema		⊗			
	Resistência celular			⊗		
	Imunidade				⊗	
	Imunidade total					⊗
II	Resistência facultativa		⊗			
	Infecção altamente localizada			⊗		
	Infecção subliminal					⊗
III	Hipersensibilidade	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
IV	Insensibilidade	⊗				
	Tolerância				⊗	
V	Baixa suscetibilidade				⊗	
VI	Suscetibilidade	⊗	⊗		⊗	
	Suscetibilidade total					⊗
	Infecção sistêmica			⊗		

A: VAN LOON, 1983.

B: ATABEKOV and DOROKHOV, 1984.

C: PONZ and BRUENING, 1986.

D: GOODMAN *et al.*, 1986.

E: ZAITLIN and HULL, 1987.

maior ênfase à limitação da replicação viral. GOODMAN et al. (1986) baseia a descrição de cada categoria na capacidade de multiplicação do vírus e na intensidade dos sintomas (Tabela 2).

Na concepção destes autores uma planta é 'suscetível' a um vírus quando este induz sintomas claramente reconhecíveis e se multiplica ativamente. No caso da resistência as respostas são mais diversas: a. Se o vírus se multiplica ativamente mas induz sintomas fracos, seria um caso de 'tolerância'. b. Quando o vírus tem sua distribuição dificultada, ficando restrito numa área que pode formar uma lesão necrótica, é uma resposta de 'hipersensibilidade'. c. Pode também ocorrer invasão sistêmica da planta, mas com manifestação de sintomas fracos e uma concentração relativamente baixa do vírus, é o caso de 'baixa suscetibilidade' que levado a um grau extremo constituiria 'imunidade'.

Tabela 2. Caracterização das respostas à infecção viral segundo GOODMAN et al. (1986)

RESPOSTA	SEVERIDADE DOS SINTOMAS	MULTIPLICAÇÃO DO VÍRUS
Resistência:		
Imunidade	-	-
Hipersensibilidade	+++*	++*
Baixa suscetibilidade	+ -	+ -
Tolerância	+ -	++
Suscetibilidade	+++	+++

* Se refere à área da lesão.

É evidente que todas as classificações propostas dependem de parâmetros relativos, pelo qual nem sempre é possível colocar uma resposta à infecção viral dentro de uma determinada categoria. Por exemplo a conceituação de variedade resistente a um determinado vírus dependerá, não só de suas próprias características, mas também das propriedades das outras variedades disponíveis. Assim por exemplo, no caso de que a moléstia tenha baixa incidência nas variedades normalmente cultivadas, uma nova variedade que apresentasse 30% de incidência seria considerada suscetível (não resistente). Mas se a doença tiver alta incidência, próxima a 100%, uma variedade com 30 % de incidência seria considerada resistente.

Uma proposta bastante interessante é a de COOPER e JONES (1983) para uso de termos relativos a diferentes tipos de respostas de plantas à infecção por vírus. O diagrama que estes autores propoem é bastante adequado para definir cada termo (figura 1, abaixo). A proposta de COOPER e JONES visa evitar a ambigüidade do termo "suscetível", que tem sido utilizado em sentidos bastante diversos: como contrário de imune, como qualificativo da facilidade de infecção de uma planta, como descrição da prevalência de uma doença numa população e também como indicador da severidade de uma doença numa planta. Para isto propoem a substituição do termo por "infectável" que, como antónimo de imune, só tem um significado possível: que a planta pode ser infetada pelo vírus. As propostas destes autores foram questionadas (TAVANTZIS, 1984) e ao menos quanto ao uso do novo termo, não tem sido observado na literatura de língua inglesa.

No diagrama da figura 1 são separados dois aspectos: a) comportamento do vírus (na interação com a hospedeira) e b) resposta da planta quanto a manifestação da doença. O

primeiro aspecto é descrito pela escala de suscetibilidade-resistência, ao passo que o segundo pela de sensibilidade-tolerância. Neste esquema a resposta hipersensível seria um dos tipos de resistência onde é limitada a movimentação do vírus, numa planta ou numa população. O modelo da soja IAC-2/VMS seria um caso também de um tipo de resistência observado numa planta "infectável", mas que restringe alguma das funções do vírus.

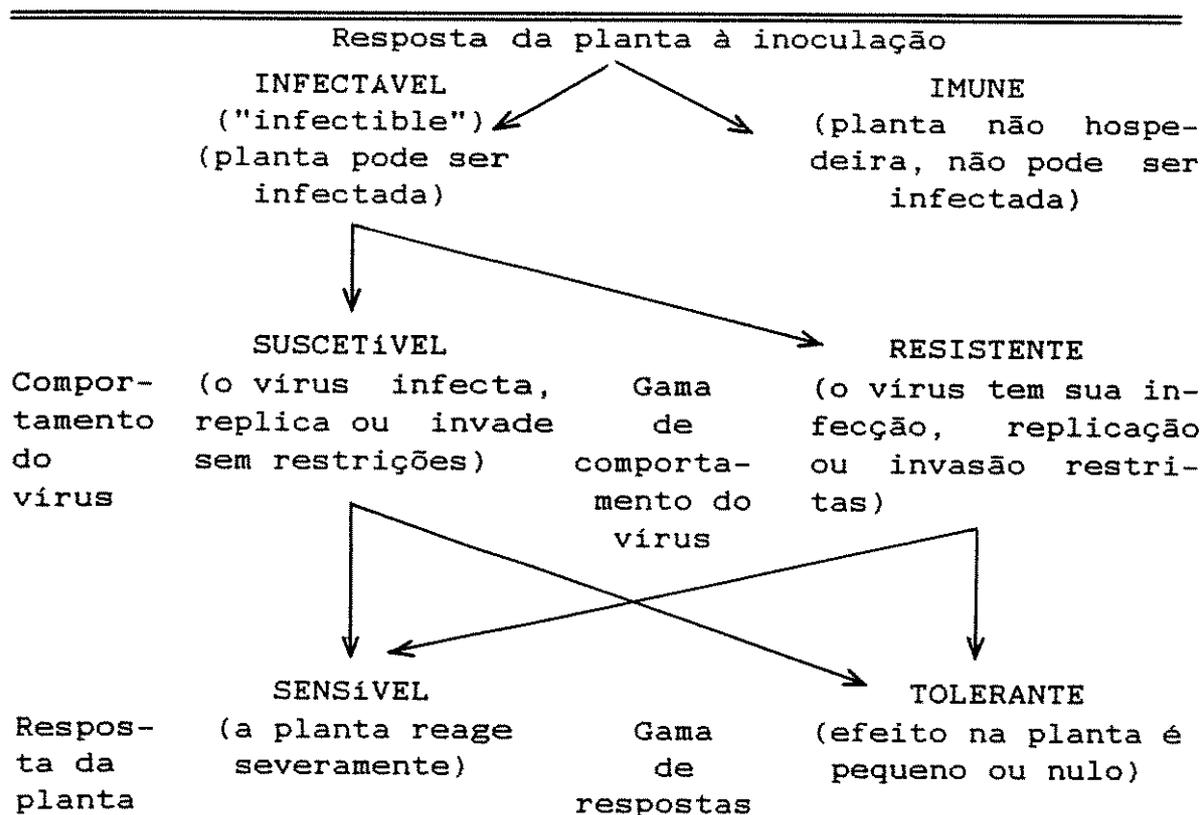


Figura 1. Diagrama proposto por COOPER e JONES (1983) para diferenciar os termos usados para designar respostas de plantas à infecção viral.

A falta de unanimidade quanto à terminologia não parece ter solução através da criação de novos termos. Uma alternativa é utilizar qualificativos para os termos já aceitos, a fim de eliminar possíveis erros de compreensão.

4.4.1. IMUNIDADE

O termo imunidade é utilizado em geral em fitopatologia com o significado de resistência extrema e não no sentido de resistência induzida por infecção prévia ou outros tratamentos na planta. Conceitualmente uma planta é imune a um vírus quando ela não é hospedeira, ou seja não permite a replicação do vírus. Esta definição, aparentemente simples, implica que existem mecanismos de reconhecimento que determinam se um organismo é hospedeiro ou não de um determinado vírus. Isto ocorre com os vírus animais e bacteriófagos, através de receptores específicos (LURIA et al. 1978). A maioria das plantas não são hospedeiras para a maioria dos vírus, e por sua vez a maior parte dos vírus vegetais estão limitados a poucas espécies de plantas hospedeiras. A resposta de imunidade seria a mais comum, se tomarmos ao acaso combinações vírus-hospedeira.

Hoje é praticamente aceito que a infecção de uma planta por um vírus não é determinada por receptores específicos, ou seja que as primeiras fases da infecção (adsorção e penetração) não parecem ser de importância determinante no processo (SHAW, 1985, ATABEKOV and DOROKHOV, 1984). Duas linhas de pesquisas evidenciam que a infecção é detida numa fase posterior, envolvendo um mecanismo mais complexo: a) os trabalhos visando detectar as formas iniciais de replicação viral em folhas inoculadas mecanicamente, e b) os estudos sobre replicação de vírus em células isoladas.

KIHO et al. (1972, in SHAW, 1985) inocularam mecanicamente TMV, cujo RNA genômico foi marcado com ^{32}P , em plantas nas quais não é detectável a multiplicação deste vírus. As análises demonstraram que o RNA parental marcado aparece associado a ribosomas, pouco tempo após a inoculação, da mesma maneira que ocorre em fumo suscetível ao TMV. SHAW (1985) interpreta estes resultados como evidência de que o processo de expressão dos genes virais se inicia praticamente em qualquer célula vegetal.

O uso de protoplastos, ou seja células isoladas e desprovidas de parede celular, tem levado a conclusões que confirmam as observações de KIHO: em geral células vegetais individuais são capazes de replicar praticamente qualquer vírus (VAN LOON, 1983). Um dos trabalhos que dão suporte a esta afirmação é o de BEIER et al. (1979) demonstrando que mais de 50 linhagens de caupi (Vigna unguiculata) consideradas 'imunes' ao vírus do mosaico do caupi (VMC, "Cowpea mosaic virus", comovirus), fornecem protoplastos que multiplicam o VMC, na mesma medida que os protoplastos de caupi suscetível. HUBER et al. (1977) comprovaram que protoplastos de fumo, planta imune ao VMC por inoculação mecânica, podem ser infectados pelo VMC e a quantidade de vírus produzido é similar à obtida em protoplastos de caupi suscetível.

Estes resultados levam a afirmar que suscetibilidade é a regra em células isoladas, mais do que imunidade ou resistência (VAN LOON, 1983). Por outro lado as evidências experimentais quase tornam o conceito de imunidade uma abstração, uma vez que na verdade até a planta imune inicia o processo de replicação viral, embora a invasão seja evitada por mecanismos provavelmente similares aos de outras formas de resistência.

A expressão da imunidade ao nível de célula isolada ou ao nível de folha inoculada mecanicamente é o critério usado para diferenciar dois tipos de resposta, cujos nomes variam de acordo com o autor: resistência extrema/ resistência facultativa (ATABEKOV and DOROKHOV, 1984); resistência celular/ resistência operacional ou infecção altamente localizada para PONZ e BRUENING (1986), ao passo que ZAITLIN e HULL (1987) chamam imunidade total e infecção subliminal.

Um exemplo bem estudado que se aproxima muito ao conceito inicial de imunidade é o fenômeno descrito por BEIER et al. (1979) na variedade Arlington de caupi, que possui resistência operacional ao vírus do mosaico do caupi. Os protoplastos desta variedade não multiplicam o vírus do mosaico do caupi, apresentando portanto também resistência celular, além da operacional. São poucos os exemplos citados na literatura que demonstram a ocorrência de imunidade ao nível celular, o que leva à conclusão de que embora ao nível da planta inteira a imunidade seja a situação mais comum, ao nível de células isoladas, ou protoplastos, é uma raridade.

4.4.2. HIPERSENSIBILIDADE

A hipersensibilidade consiste na localização da infecção viral na área próxima ao ponto de entrada do vírus. Difere do conceito de imunidade no fato de permitir a replicação do vírus e a invasão das células vizinhas, mas impedindo a sistematização do vírus. A invasão localizada pode ser acompanhada por necrose dos tecidos, formando lesões locais. É importante destacar que a necrose, embora seja uma característica típica da hipersensibilidade, não é condição indispensável para que o vírus fique restrito à área da lesão. Alguns autores consideram que o sintoma de

necrose e a resistência devida á localização estão tão intimamente associados que devem ser considerados praticamente um único processo (PONZ and BRUENING, 1986). Mas em geral na literatura são analisados como fenômenos independentes (KASSANIS, 1981, VAN LOON, 1983), inclusive porque existem exemplos onde a localização ocorre mesmo com lesões cloróticas, ou sem que seja visível qualquer tipo de lesão. Outro fato que comprova a independência dos dois processos é a observação de partículas virais fora da região necrótica.

Uma propriedade bastante útil na experimentação, manifestada em vários sistemas hipersensíveis é a sensibilidade á temperatura. Como regra geral as altas temperaturas tornam menos eficientes os mecanismos de localização do vírus, mas o efeito sobre o processo de necrose não é igual para todos os sistemas vírus/ hospedeira. No caso de fumo (Nicotiana tabacum L.) portador do gene N, que confere hipersensibilidade ao TMV, tanto a reação de localização como a de necrose que se manifestam a 22°C desaparecem a 32°C (VAN LOON, 1983). Ou seja que fumo hipersensível é invadido sistemicamente por TMV se mantido a temperatura de mais de 28°C. Retornando a planta a 22°C, é restabelecida a resposta de hipersensibilidade, que em caso de invasão sistêmica intensa desencadeará a necrose massiva da planta.

Em fumo com o gene N tem sido demonstrado que além da reação localizada é também induzido um fenômeno conhecido como resistência sistêmica adquirida, que também pode ser desencadeada pela infecção prévia de outro tipo de patógeno, como bactérias ou fungos. Este tipo de resistência implica na existência de algum tipo de "sinal" que se movimentaria na planta e dispararia a indução da resistência nas partes não inoculadas. A natureza desse sinal não é conhecida, mas provavelmente as citocininas estejam envolvidas (GOODMAN et al. 1986).

Em diversas espécies a infecção por vírus é acompanhada da síntese de várias proteínas, conhecidas como PR ("pathogenesis related"), codificadas pela planta hospedeira. A indução das PR, ou seja a estimulação de sua síntese, não é vírus-específica podendo ser causada por extratos de fungos ou bactérias e uma diversidade de compostos químicos, como ácido poliacrílico ou aspirina (VAN LOON, 1983). Embora KASSANIS (1981) chame estas proteínas de "resistance-associated proteins", o envolvimento das PRs na resistência sistêmica adquirida não é um ponto aceito por todos os autores (ZAITLIN and HULL, 1987).

Outro modelo de hipersensibilidade bastante estudado é feijoeiro/TMV, que reage de maneira diferente do fumo à variação de temperatura. Tratamentos de alta temperatura tornam visíveis as lesões locais, cujo diâmetro aumenta proporcionalmente à duração do tratamento (GOODMAN et al. 1986).

A hipersensibilidade do feijoeiro ao vírus do mosaico comum (VMCF, "bean common mosaic virus", potyvirus) é conferida pelo gene dominante I (também denominado gene de resistência tipo "Corbett Refugee") (ALI, 1950). Neste modelo a temperatura alta favorece a aparição de necrose e facilita a invasão sistêmica da planta, diferentemente do sistema fumo/TMV. A temperaturas amenas (20-25 °C) não há sintomas locais nem invasão sistêmica. Ou seja que nestas condições a restrição da infecção viral chega a ser tão rápida e eficiente que não há sintomas perceptíveis de necrose. Este caso seria um exemplo do que ZAITLIN e HULL (1987) chamam de infecção subliminal. O que diferencia esta resposta da imunidade é a aparição de lesões com tratamento de alta temperatura após a inoculação. Dependendo do isolado do vírus, da temperatura e da duração do tratamento pode ocorrer invasão sistêmica, que provoca a "necrose do topo"

(necrose da ponta de crescimento e morte da planta). Alguns isolados do vírus do mosaico da soja (VMS) induzem a reação hipersensível, até de maneira mais consistente que o VMCF, (BIANCHINI e COSTA, 1981).

As fontes de resistência ao VMS mais usadas em soja são do tipo hipersensibilidade. Estas fontes, embora apresentam bastante variação quanto à resposta a diferentes isolados de VMS, seriam condicionadas por alelos de dois únicos genes dominantes e um recessivo (MAURY, 1985). Algumas destas fontes, principalmente a derivada da variedade Ogden, tem sido usadas no melhoramento da soja no Brasil. Este é o caso das variedades IAC-9 e IAC-11, hipersensíveis ao VMS, desenvolvidas pelo Instituto Agrônomo de Campinas (COSTA e MIRANDA, 1987).

Em geral a resistência por hipersensibilidade é tida como menos sujeita à aparição de novas estirpes do vírus, capazes de quebrar este tipo de resistência. Mas no caso da soja tem sido relatado um caso de severos danos numa variedade considerada resistente (hipersensível), atribuídos ao uma estirpe necrótica do VMS isolada na Coréia (CHO and GOODMAN, 1979). É possível que nos países orientais, além da maior variabilidade do vírus, ocorra também maior quantidade de hospedeiras alternativas, aumentando assim a pressão de inóculo.

A hipersensibilidade não se manifesta em células isoladas, da mesma maneira que a imunidade, sendo possível multiplicar vírus em protoplastos de planta hipersensíveis embora em quantidades limitadas (PONZ and BRUENING, 1986). Em calos de fumo N infectados com TMV ocorre formação de lesões necróticas (BEACHI and MURAKISHI, 1971).

O fato de a imunidade e a hipersensibilidade só se manifestarem em tecidos, e não em células isoladas, reforça a idéia de que estas formas de resistência baseiam-se essencial-

mente na restrição da passagem do vírus de célula para célula.

Na movimentação do vírus na planta, deve se diferenciar dois processos distintos. Um é o movimento de célula para célula, através dos plasmodesmas, que compreende os casos de traslocação em curtas distâncias. O outro é o transporte do vírus através do sistema vascular da planta, junto com diversas substâncias que são translocadas pelo floema, geralmente por distâncias longas.

Nos últimos anos tem-se acumulado evidências que indicam que a movimentação do vírus, de célula para célula, é controlada por uma proteína codificada pelo seu próprio genoma. Esta proteína de movimentação ("movement protein") tem sido identificada em vários vírus, como o TMV, mosaico da alfafa e mosaico da couve flor (caulimovirus). Para muitos outros vírus tem sido proposto, embora com menos evidências que para os citados acima, o possível envolvimento de alguma das proteínas virais na movimentação de célula para célula (HULL, 1989). Além da proteína de movimentação, codificada pelo próprio vírus, também fatores da planta hospedeira afetam a invasão sistêmica. Um aspecto interessante deste processo é que a passagem de célula a célula não ocorreria na forma de vírion. O movimento através dos plasmodesmas seria na forma de uma ribonucleoproteína específica para esse fim (ATABEKOV and DOROKHOV, 1984). Em alguns grupos a movimentação seria na forma de partículas virais completas, como no caso dos caulimovirus e comovirus. A passagem de caulimovirus através dos plasmodesmas foi claramente demonstrada por KITAJIMA e LAURITIS (1969). Nos comovirus é comum a observação de estruturas tubulares contendo partículas virais que se comunicam com os plasmodesmas (FRANCKI et al. 1985). A proteína da capa viral teria também algum papel na invasão do vírus, principalmente em

longas distâncias (via floema), mas não necessariamente formando parte da partícula viral (HULL, 1989).

A maneira pela qual estes fenômenos se relacionam com os mecanismos de resistência é ainda um assunto não esclarecido porém, em estudo em vários laboratórios no mundo.

4.4.3. RESISTÊNCIA

Sob a denominação genérica de resistência são incluídos fenômenos bastante diversos, que têm em comum a redução dos efeitos negativos da infecção viral. Assim se diz correntemente que uma variedade é resistente a um determinado vírus se a mesma não manifesta sintomas, ou se a pesar de manifestar alguns sintomas sua produção é praticamente normal. A procura de novas variedades mais resistentes a vírus tem sido em geral orientada prioritariamente para as formas de resistência que impedem o estabelecimento do vírus, ou seja imunidade e hipersensibilidade. Como segunda opção têm sido usados genes que conferem "resistência" lato sensu, ou seja que dificultam ou impedem o desenvolvimento da doença.

Considerando tolerância como uma resposta da planta, não relativa ao comportamento do vírus (COOPER and JONES, 1983), pode existir uma gama de variação entre a resposta severa (sensibilidade) e a de tolerância, onde o efeito na planta é pouco aparente.

Dentro do fenômeno de tolerância existe considerável variabilidade quanto à concentração e distribuição do vírus. Levando em conta a concentração do vírus e a intensidade dos sintomas, GOODMAN et al. (1986) chamam os casos de sintomas fracos de baixa suscetibilidade, quando é baixo o conteúdo de vírus, de tolerância quando o vírus atinge a mesma concentração que nas plantas suscetíveis (tabela 2). Um

aspecto importante da tolerância é que a planta infecatada deve também crescer e produzir em níveis similares aos da planta sadia. VAN LOON (1983) utiliza o termo "insensibilidade" como sinónimo de tolerância, mas este último é o termo mais usado na literatura em geral.

Na pesquisa básica sobre formas de resistência também tem sido dada prioridade à resposta hipersensível e imune, a julgar pelo número de trabalhos publicados. Pouca atenção tem merecido a tolerância embora na prática do melhoramento vegetal tenha sido, e ainda é, largamente utilizada para contornar as perdas causadas por diversos vírus.

A diferença essencial entre a resposta tolerante e a imune ou hipersensível é que na primeira não há limitação da infecção viral à célula ou área inoculada, permitindo a invasão sistêmica da planta. Ou seja que no caso da tolerância a infecção não é bloqueada nas fases iniciais do processo patogênico (penetração e início da replicação), e aparentemente não há restrições à movimentação do vírus nos tecidos inicialmente infectados.

A planta tolerante, embora invadida sistemicamente, continua com suas funções biológicas normais mesmo contendo níveis de vírus às vezes iguais aos da planta suscetível. Contudo, deve considerar-se que invasão sistêmica da planta não significa que o vírus esteja presente em todas suas células nem que a distribuição do vírus seja homogênea em todos seus órgãos e tecidos.

Algumas desvantagens têm sido assinaladas para as formas de tolerância que permitem alta concentração de vírus, dentre elas a mais importante é, sem dúvida, a de constituir um reservatório de vírus, o que representa uma ameaça para outras espécies suscetíveis. Isto pode ser ou não um fator importante dependendo da existência de outras fontes de inóculo mais eficientes, mas em geral é desejável a incorporação de genes que restringem a replicação do vírus.

Em alguns casos a resistência do tipo tolerância com limitação da replicação viral, se manifesta inclusive em células isoladas, ou seja protoplastos cultivados in vitro. Um exemplo disto é o gene que confere "resistência" ao vírus do mosaico do pepino (VMP, "cucumber mosaic virus", cucumovirus) na variedade Kyoto 3'. Os protoplastos obtidos de plantas com este gene, quando infectados in vitro com o VMP contêm menos vírus por célula que os de uma variedade suscetível, e o número de células infectadas é também menor (GOODMAN et al. 1986).

Em tomateiro umas das formas de controle do TMV é o gene Tm-1, que em materiais homozigotos inibe em 90-95% a acumulação do vírus. Em plantas heterozigotas a inibição é de 65-75%, mas em nenhum dos casos há manifestação de sintomas. Os protoplastos de plantas homozigotas para Tm-1 não são infectados por TMV, ao passo que os de heterozigotas são infectadas em 1% e os de plantas suscetíveis em 61%. Isto indica que o gene confere aos protoplastos propriedades que restringem a replicação viral, embora sem chegar a impedi-la (GOODMAN et al. 1986)

Outra forma de resistência que não envolve a localização do vírus no ponto de entrada na planta é a que VAN LOON (1983) denomina de "exclusão do vírus". Este fenômeno é observado em alguns mosaicos, onde parte do tecido foliar parece conservar suas características normais. Estas partes formam as chamadas ilhas verde-escuras que ficam rodeadas por tecidos verde claro ou amarelo. O tecido verde escuro parece crescer normalmente, enquanto o verde claro cresce menos, formando-se uma "bolha" ou ilha de tecido foliar verde-escuro. Nestas ilhas verde-escuro tem sido demonstrado que a concentração de vírus é muito baixa, em alguns casos quase inexistente, em contraste com o alto conteúdo de vírus na área verde clara.

Existem diferentes interpretações deste fenômeno, mas a possibilidade de que seja devido à mutação de células foliares, que por segregação formariam ilhas resistentes, tem sido excluída pelos testes de regeneração de plantas dos tecidos da ilha verde-escuro. Cerca de 50% das plantas regeneradas das ilhas verde-escuras, de plantas de fumo infectadas com o vírus do mosaico (TMV), estavam livres de vírus. Estas plantas são suscetíveis a nova inoculação, embora apresentem certa resistência transitória (MURAKISHI and CARLSON, 1976).

MATTEWS (1981) considera que o mosaico é determinado no meristema apical, de onde já seriam diferenciadas as áreas verde-claras e escuras. Mas a distribuição final do vírus nas áreas seria também influenciada por um fator difusível, que produzido nas áreas verde-claras chegaria nas ilhas (ou "bolhas") verdes onde tornaria os tecidos resistentes à invasão do vírus (MURAKISHI and CARLSON, 1976).

Outra possibilidade é que nas ilhas ocorra a replicação preferencial de uma estirpe fraca do vírus, que protegeria contra a forma forte das partes verde claro. Utilizando este raciocínio REZENDE et al. (1982) conseguiram isolar estirpes fracas de um potyvirus, o vírus do mosaico do mamoeiro. É possível que a formação das ilhas verde-escuro possa ocorrer por mais de um mecanismo, em diferentes modelos.

O modelo escolhido para o presente estudo se encontra dentro da categoria de resistente: a soja IAC-2 é suscetível, no sentido que ela é infectada pelo VMS, mas apresenta características de redução de sintomas, como a mancha-café, e índices de transmissibilidade pela semente extremamente baixos. (COSTA, et al. 1981). Isto torna este material de interesse para o melhoramento, pois poderia servir de base para a obter combinações de outras formas de resistência com a baixa transmissão pela semente.

4.4.4. SUSCETIBILIDADE

Como representado na tabela 2, na relação de suscetibilidade ocorre clara manifestação de sintomas e o vírus se multiplica ativamente. Uma característica essencial da suscetibilidade na classificação da tabela 2 é a invasão sistêmica da planta hospedeira, com manifestação de sintomas inclusive nas partes mais novas que vão desenvolvendo-se.

No caso do uso deste termo como proposto por COOPER e JONES (figura 1), a característica principal da suscetibilidade seria a de que o vírus infecta e invade a planta sem maiores restrições, independentemente dos sintomas que a planta apresentar. Se estes forem severos seria o caso de uma planta sensível, e se não houver quase manifestação de sintomas seria tolerante.

O fenômeno que ZAITLIN e HULL (1987) chamam de suscetibilidade total, onde a maior parte das células da hospedeira são infectadas, é um fenômeno raro já que a maior parte das plantas apresenta alguma forma de resistência à infecção. Plantas suscetíveis apresentam fenômenos como recuperação, formação das ilhas verde-escuro citadas acima, e casos de vírus (notadamente os luteovirus e geminivirus) que estão restritos aos tecidos floemáticos.

Como apontado por PONZ and BRUENING (1986) a invasão sistêmica característica da suscetibilidade é importante como ponto de referência, já que a maioria dos termos empregados (resistência, restrição, etc.) são inerentemente comparativos.

Alguns potyvirus têm a intensidade dos sintomas afetada pela temperatura: eles se tornam mais severos em condições de baixas temperaturas (20 °C). Em condições mais quentes (acima de 25 °C) a infecção ocorre com menor severi-

dade, podendo chegar a tornar-se assintomática a temperaturas mais altas. Este fenômeno tem sido reportado em sorgo infectado com o "maize dwarf mosaic virus", em soja com o vírus do mosaico comum da soja (HOLLINGS and BRUNT, 1981) e também em mamoeiro infectado com o vírus do mosaico ("papaya ringspot virus") (REZENDE e COSTA, 1987). Como esta resposta é também influenciada pelo genoma da hospedeira, pode ser considerada uma forma de resistência.

O modelo da soja IAC-2, estudado comparativamente no presente trabalho, apresenta características de baixa transmissão do VMS pela semente, escassa formação de sementes com mancha-café e os sintomas de mosaico são em geral menos intensos principalmente em condições de alta temperatura. Neste modelo é estudada a resposta à infecção pelo VMS em diferentes temperaturas, ao nível de citopatologia, alterações da concentração de vírus e de atividade de enzimas ligadas à desativação de formas tóxicas de oxigênio. O objetivo geral deste estudo é contribuir para a compreensão do mecanismo de resistência que difere claramente dos tipos de resistência de hipersensibilidade, utilizados até hoje para o melhoramento genético desta espécie. Tem sido defendida a importância de incorporar resistência à transmissão pela semente a variedades resistentes por hipersensibilidade (COSTA et al. 1981), mas isto é limitado pelas dificuldades técnicas para testagem. Um dos possíveis resultados do melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos na resistência à transmissão pela semente seria um método para avaliar esta forma de resistência em plantas sadias, portadoras de hipersensibilidade ao VMS.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Plantas hospedeiras e vírus.

O modelo para estudo comparativo das respostas à infecção por VMS foi composto por uma variedade com características de resistência, a variedade IAC-2, e por outra altamente suscetível, a soja Santa Rosa. As duas variedades de soja foram obtidas no Instituto Agrônomo de Campinas. A soja Santa Rosa, designada por L-326 antes do seu lançamento, foi obtida por S. Miyasaka e L.F. Willians em 1958 e distribuída aos produtores em 1963 (MIRANDA et al. 1982). Esta variedade apresenta resistência às bactérias Xanthomonas phaseoli, causadora da pústula bacteriana, e Pseudomonas tabaci agente da doença conhecida como "fogo selvagem". É resistente também ao nematóide de galhas (Meloidogyne javanica). A variedade Santa Rosa foi muito cultivada em todo Brasil mas atualmente tem sido substituída por variedades menos exigentes quanto a fotoperíodo (MIRANDA, M.A.C., comunicação pessoal). Com relação ao vírus do mosaico da soja, esta variedade é muito suscetível, sendo afetada na sua produtividade e desenvolvendo a mancha-café nas sementes. Por estas características a

soja Santa Rosa tem sido usada como ponto de referência de suscetibilidade, na comparação de variedades quanto a sua resposta ao mosaico da soja (COSTA et al, 1981). Esta variedade vem sendo utilizada há muito tempo para a manutenção in vivo da coleção de isolados de vírus do mosaico da soja na Seção de Virologia do IAC, por ser facilmente infectada na inoculação experimental e por ser uma boa fonte de inóculo, mesmo em plantas em fase de senescência.

A soja IAC-2 foi obtida por S. Miyasaka em 1952 mas distribuída só a partir de 1967. Entre suas características inicialmente descritas é mencionada sua boa resistência ao nematoide de galhas (MIRANDA et al, 1982). Trabalhos posteriores mostraram que esta variedade apresenta níveis muito baixos de transmissão pela semente do vírus do mosaico da soja, e praticamente não desenvolve a mancha-café na semente (COSTA et al. 1981).

O vírus utilizado foi o isolado SMV-10 da coleção do vírus do mosaico da soja (VMS), que é mantida in vivo na Seção de Virologia do IAC. Este isolado de VMS possui a característica de causar sintomas severos. As plantas foram inoculadas mecanicamente na fase de duas folhas primárias e mantidas em condições de casa de vegetação durante todo o período do experimento, excepto no caso dos tratamentos de alta e baixa temperatura.

Os experimentos com temperatura controlada foram realizados em câmaras climatizadas que permitem manter temperaturas constantes, com iluminação artificial regulada para fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 no escuro.

5.2. Avaliação da concentração de vírus.

A concentração viral foi avaliada através de testes de microscopia eletrônica de imuno-adsorção (MEIAD "immuno-sorbent electron microscopy") realizado segundo o método de DERRICK e BRLANSKY (1976), mas utilizando contrastação negativa em vez de positiva como proposto por estes autores. Resumidamente o método consiste em tratar o filme suporte de Parlodium, montado em retículos porta espécimen (telinhas) e reforçado com carbono, com antissoro específico para o vírus a ser analisado. Este tratamento forma uma camada de anticorpos adsorbidos ao filme suporte. No presente caso foi utilizada uma diluição de 1:1000 de antissoro de coelho, preparado contra o vírus do mosaico da soja, fornecido gentilmente pelo Dr. H.J. Vetten, (Biologisches Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft, Braunschweig, Alemanha). A seguir o filme assim "sensibilizado" é colocado em contato com o extrato da amostra a ser testada. Nesta fase é importante a padronização dos extratos e do tempo de incubação: a extração foi feita em tampão fosfato 0.06 M, pH 7,4, na proporção 1:10 (peso da amostra/volume de tampão), e incubação durante duas horas à temperatura ambiente (20-26°C). As partículas virais em suspensão reagem com os anticorpos, ficando retidas no filme, e podem ser examinadas ao microscópio eletrônico após contrastação negativa com acetato de uranila.

Para a avaliação quantitativa foi utilizado uma adaptação do método proposto por ROBERTS (1979). A contagem de partículas foi feita diretamente no écran do microscópio eletrônico, com aumentos de 5.000 ou 10.000 segundo a densidade de partículas. Foi determinado o número de partículas na área visível na lupa binocular, que corresponde a uma elipse de 8,88 μm^2 com aumento de 5.000, e 2,22 μm^2 para 10.000. Em

cada preparação foram contadas as partículas em 10 áreas contíguas, em quatro furos diferentes do retículo porta-espécimen, e o valor médio expresso finalmente em partículas por $1000 \mu\text{m}^2$.

5.3. Estudos citopatológicos.

Para o estudo morfológico ao nível de microscopia eletrônica as amostras foram processadas segundo um esquema padrão utilizado no nosso laboratório (VEGA *et al.* 1981). Este processo consiste numa fixação em glutaraldeído (2,5%) mais formaldeído (4%) (KARNOVSKY, 1965), pos-fixação em OsO_4 , contrastação in bloco com acetato de uranila, desidratação e inclusão numa mistura de Araldite e Epon (MOLLENHAUER, 1964). Os cortes ultrafinos foram montados em retículos (telinhas) de cobre malha 100, com filme de Parlodium/carbono e contrastados com citrato de chumbo segundo VENABLE e COGGESHALL (1965).

5.4. Métodos de imuno-citoquímica.

5.4.1. Processamento das amostras para exame.

Para a localização in situ de antígenos virais as amostras foram fixadas somente na mistura de glutaraldeído-formaldeído, desidratadas em gradiente de acetona sem posfixação em OsO_4 e incluídas em Araldite-Epon, como descrito acima. Posteriormente foram obtidos cortes ultrafinos e montados em telinhas de níquel com filme de Parlodium-carbono.

5.4.2. Preparação da sonda de Proteína A-ouro coloidal.

A sonda de proteína A-ouro coloidal foi preparada segundo o método de SLOT e GEUZE (1981) com as modificações propostas por DEMEY (1984). Basicamente o método consiste na obtenção de ouro coloidal do tamanho desejado (10-15 nm) por redução de uma solução de Cl_4Au com ácido cítrico. Posteriormente o ouro é estabilizado com proteína A (Sigma) e utilizado para a localização de anticorpos em cortes, ajustando previamente sua diluição.

5.4.3. Antissoros utilizados em "immunogold".

Para a localização do vírus foi utilizado o mesmo antissoro usado em testes de MEIAD (AS-VMS), fornecido pelo Dr. H.J. Vetten de Braunschweig, Alemanha. Os antissoros para a proteína da capa viral e para a proteína das inclusões citoplasmáticas lamelares foram gentilmente cedidos pelo Dr. E. Hiebert (Florida State University, Gainesville, Florida, U.S.A.). Todos os antissoros utilizados foram obtidos em coelho, o que permite o uso da sonda de proteína A-ouro coloidal.

5.4.4. Procedimento para imunocitoquímica.

Os cortes montados em telinha de níquel com filme de Parlodium/carbono foram tratados com albúmina de soro bovino 1% durante 15 minutos. A seguir foram tratados durante 2-4 h com antissoro na diluição de 1:1000 para o AS-VMS, e de 1:200 no caso dos antissoros para a proteína da capa viral e das inclusões citoplasmáticas. Depois de várias lavagens com tampão fosfato contendo 0.4% Tween 20 (TFT), foi aplicada a sonda de proteína A-ouro durante 1 h, e novas lavagens com

TFT seguidas de água destilada. Finalmente os cortes foram contrastados com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo segundo VENABLE e COGGESHALL (1965).

A especificidade da marcação pelo método de "immunogold" foi aferida usando um antissoro para vírus heterólogo (como o antissoro para o mosaico rugoso do feijoeiro), ou omitindo o tratamento com antissoro.

A avaliação quantitativa da marcação foi feita contando o número de partículas de ouro depositadas em áreas delimitadas sobre cada uma das estruturas examinadas.

5.5. Citoquímica enzimática.

Métodos de citoquímica enzimática foram utilizados para demonstrar a localização intracelular da catalase. Foi utilizado o método de NOVIKOFF e GOLDFISHER (1969), que consiste em submeter o material pre-fixado em glutaraldeído, à incubação num meio alcalino (pH 9-10) contendo 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e H_2O_2 . A atividade da catalase produz a oxidação da DAB, que reage com o OsO_4 na posfixação, formando um precipitado denso aos eletrons. O local de formação deste precipitado, que corresponde à localização da catalase, é facilmente visualizado no microscópio eletrônico.

5.6. Dosagem da atividade da catalase.

A atividade da catalase (EC 1.11.1.6.) foi avaliada pelo método espectrofotométrico (LUCK, 1965), acompanhando a queda de densidade óptica a 240 nm, que corresponde ao desaparecimento da água oxigenada. Para o cálculo da atividade catalásica foi determinado o coeficiente angular (k) pela análise de regressão entre tempo versus logaritmo natural da densidade óptica. O valor k de atividade enzimática foi transformado em unidades de catalase, pois a reação da cata-

lase deve ser considerada de primeira ordem. A unidade de catalase é definida como a quantidade de enzima que decompõe a metade do H_2O_2 de uma solução, em 100 segundos a $25^\circ C$ (LUCK, 1965). O valor final obtido é expresso em unidades de catalase por grama de peso fresco de tecido amostrado.

5.7. Determinação da peroxidase.

A dosagem da atividade da peroxidase (EC 1.11.1.7) foi feita pelo método de FARKAS e STAHMANN (1966), monitorando a oxidação de guaiacol através da densidade óptica (DO) a 470 nm. A atividade enzimática é representada pelo coeficiente angular da reta obtida pela análise de regressão entre os valores da densidade óptica versus tempo. Finalmente a atividade da peroxidase é expressa em variação da DO por grama de peso fresco da amostra e por minuto.

6. RESULTADOS

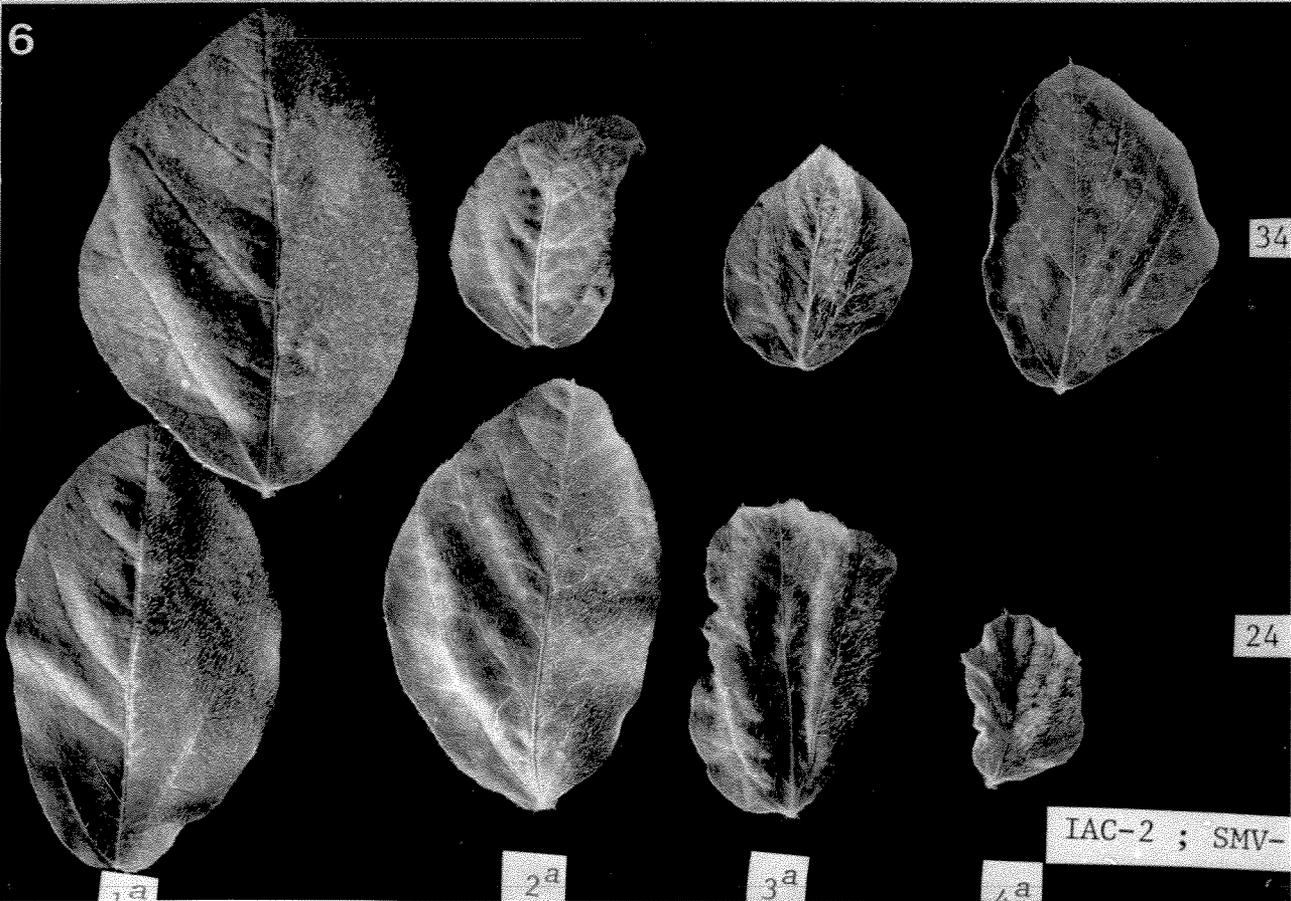
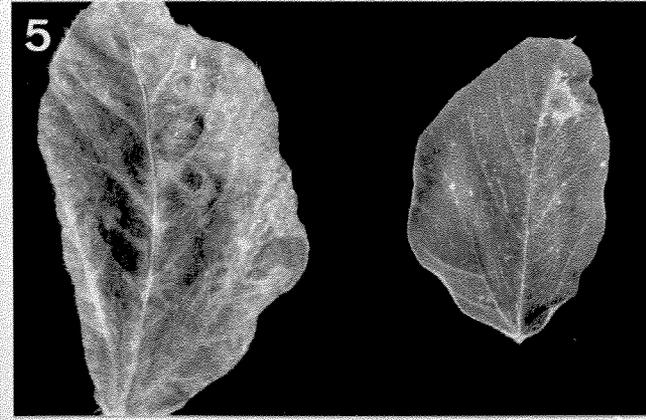
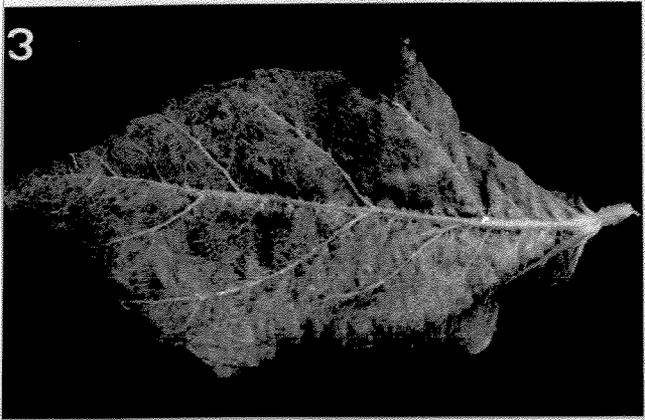
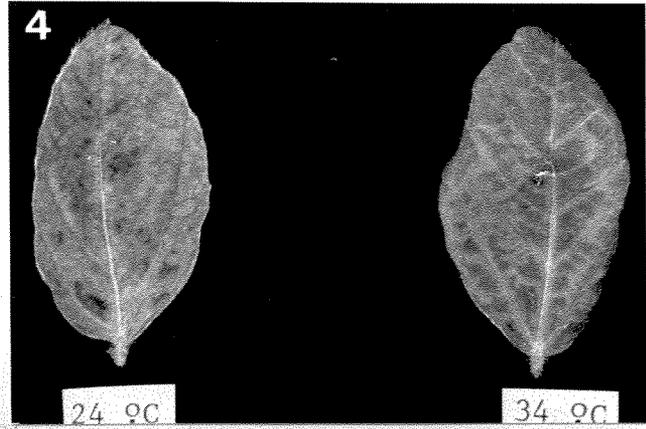
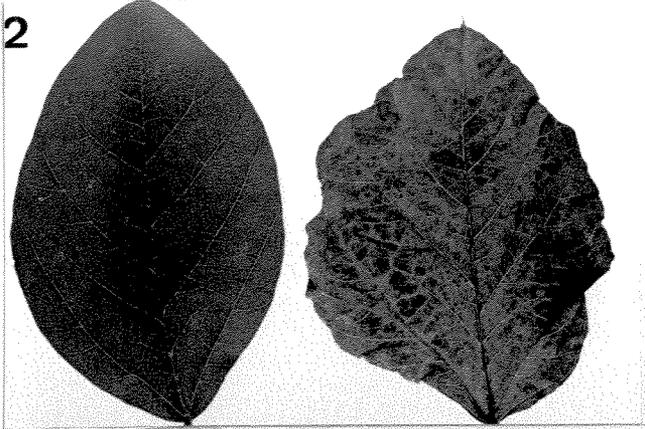
Para o estudo da resistência na soja IAC-2 foi tomado como referência de suscetibilidade a variedade Santa Rosa. As diferenças entre as duas variedades, quanto à resistência ao VMS, são quantitativas já que mesmo as plantas mais suscetíveis apresentam em geral alguma forma de resistência. Sempre que possível são apresentados os resultados obtidos nas duas variedades para facilitar o exame comparativo dos dados.

6.1. Sintomatologia: influência da temperatura.

Na variedade Santa Rosa o isolado severo SMV 10 induz sintomas intensos caracterizados no início pelo mosaico e, posteriormente pelo enrugamento e encarquilhamento da folha (figura 2). Os sintomas se estabilizam nesta segunda fase (crônica), e a alteração da cor da folha é generalizada, não sendo possível distinguir áreas verde-claras e verde-escuras (figura 3).

A intensidade e as características destes sintomas não foram afetadas de maneira evidente pelo tratamento em temperaturas diferentes (20-24°C versus 30-34°C).

- Figura 2.** Folha com sintomas do VMS em soja Santa Rosa na fase aguda (direita) comparada com o controle sadio (esquerda).
- Figura 3.** Folha de soja Santa Rosa com inefecção de VMS na fase crônica.
- Figura 4.** Folhas de soja IAC-2 com tratamento durante 13 dias de baixa (esquerda) e alta (direita) temperatura.
- Figura 5.** Folhas de soja IAC-2 com tratamento durante 20 dias de baixa (20-24°C esquerda) e alta (30-34°C direita) temperatura.
- Figura 6.** Comparação dos sintomas observados na 1ª a 4ª folha de soja IAC-2 mantida durante 20 dias em condições de temperatura controlada. O tratamento de alta temperatura produz também redução do enrugamento causado pelo VMS na 3ª e 4ª folha.



A variedade IAC-2 apresenta em geral sintomas menos intensos que a soja Santa Rosa. A fase aguda inicial, geralmente manifestada na primeira folha trifoliolada, é similar à descrita para a variedade Santa Rosa. Mas os sintomas da fase crônica são influenciados pela temperatura ambiente. Em temperaturas altas os sintomas se tornam mais fracos e reciprocamente, com temperaturas baixas a severidade dos sintomas aumenta. Estas mudanças podem ser observadas na casa de vegetação correlacionadas com a ocorrência de dias frios ou quentes. Os experimentos com temperatura controlada confirmaram estas observações.

As plantas de IAC-2 mantidas em baixa temperatura (20-24°C) mostraram sintomas do tipo observado na var. Santa Rosa: mosaico indefinido, enrugamento e encarquilhamento foliar (figuras 4, 5 e 6). A 30-34°C os sintomas se tornaram mais fracos, num processo que pôde ser acompanhado nas folhas emitidas nessa temperatura. Após 13 dias, a primeira folha nessas condições (segunda folha trifoliolada) apresentou diminuição da área verde-clara (figuras 4). Esta redução da parte verde-clara foi ainda maior na terceira e quarta folha, após 20 dias de tratamento (figuras 5 e 6).

6.2. Concentração do vírus em relação à temperatura e às áreas do mosaico.

Em plantas de soja IAC-2 colocadas durante sete dias em condições de temperatura controlada na fase aguda da infecção (uma semana após inoculação), foi avaliada a concentração viral através de testes de MEIAD (figuras 9 e 10). A contagem de partículas obtida é mostrada na figura 7. A primeira folha (inoculada) não apresentou variação, mas na segunda folha o número de partículas foi quase três vezes maior na planta mantida em baixa temperatura (20-24°C). Na

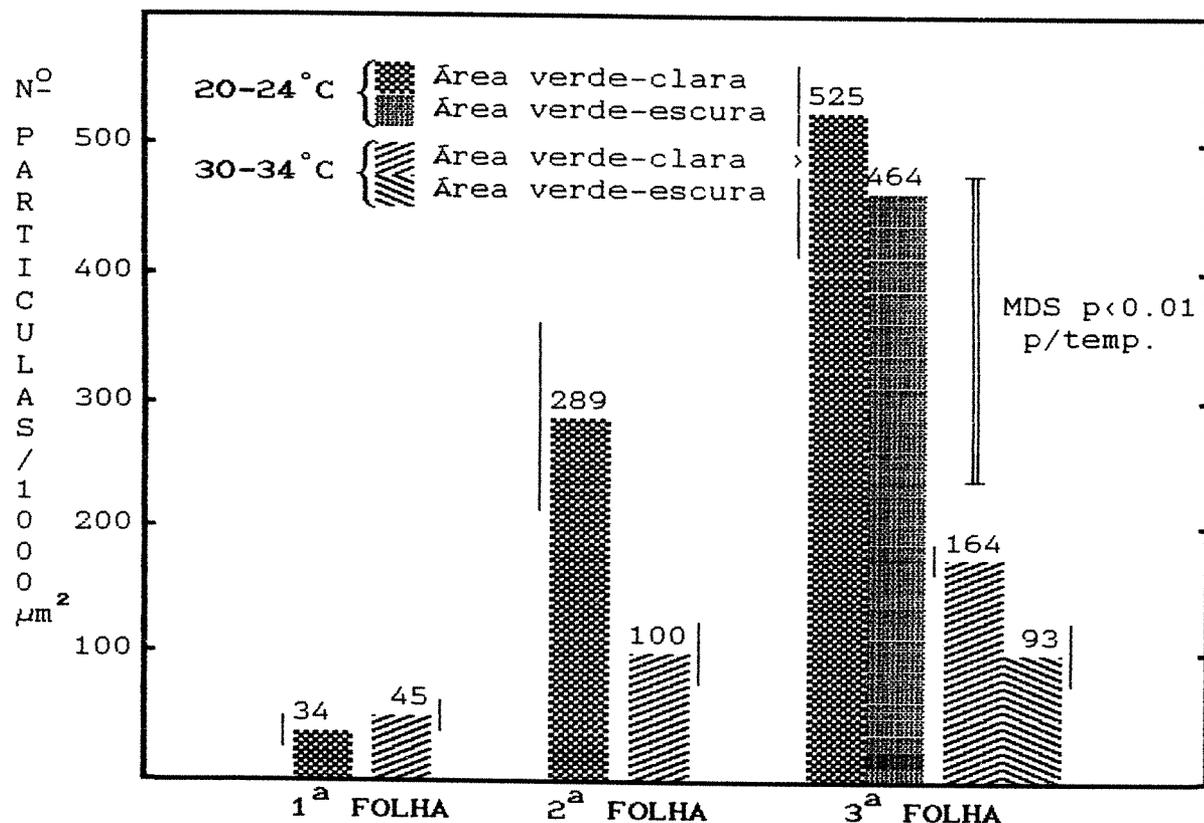


Figura 7 . Contagem de partículas em extratos de soja IAC-2 em condições de temperatura controlada durante 7 dias (entre o 10^o e 17^o dia após inoculação). Os valores representam o número de partículas em 1000 μm^2 de filme-suporte, na preparação pela técnica de ISEM. Os resultados foram padronizados para extratos preparados na relação 1:10 (peso:volume de tampão). Cada valor é média de 2-4 determinações. A linha vertical representa \pm erro padrão. Determinações separadas para as áreas verde-claras e escuras somente foram possíveis na terceira folha. MDS: Mínima Diferença Significativa para $p < 0.01$ entre médias de diferentes temperaturas.

terceira folha, emitida durante o tratamento diferenciado de temperatura, a concentração viral foi quase quatro vezes maior a 20-24°C, em relação à média da mesma folha a 30-34°C (diferença significativa ao nível de $p < 0.01$).

O conteúdo de vírus é igualmente alto nas partes claras e escuras do mosaico na terceira folha a 20-24°C (a diferença não é significativa). Mas nesta folha a 30-34°C, além da forte queda da concentração viral, observou-se uma distribuição não uniforme do vírus: foi 76% maior nas áreas verde-claras, diferença que foi significativa ao nível de $p < 0.05$.

A variedade suscetível Santa Rosa, após sete dias de tratamento em temperatura controlada, as contagens de partículas em testes de MEIAD apresentaram 3400 ± 870 partículas por $1000 \mu\text{m}^2$ em alta temperatura e de 5180 ± 1730 p.v./ $1000 \mu\text{m}^2$ em baixa temperatura. Ambos valores são médias de 4 plantas \pm erro padrão. A diferença observada entre os tratamentos de alta e baixa temperatura, de cerca de 50%, não atinge significância estatística por causa da alta variabilidade evidenciada pelos valores do erro padrão. Contudo, a queda na contagem de vírus nas plantas de Santa Rosa mantidas em alta temperatura, embora de magnitude muito menor que na IAC-2, demonstra que esta condição ambiental favorece alguma forma de resistência na variedade suscetível. Note-se que os valores obtidos nesta variedade são muito maiores (quase dez vezes) que na IAC-2, representados nas figuras 7 e 8.

Num experimento mais prolongado com a variedade IAC-2 foi observado que, após 25 dias em câmara de crescimento com temperatura controlada, a concentração de vírus medida na 4^ª e 6^ª folha é reduzida a 1/20 nas plantas a 30-34°C, em relação às mantidas a 20-24°C (figura 8). Neste experimento a distribuição do vírus nas áreas do mosaico apresentou marcadas diferenças de concentração: a 20-24°C as

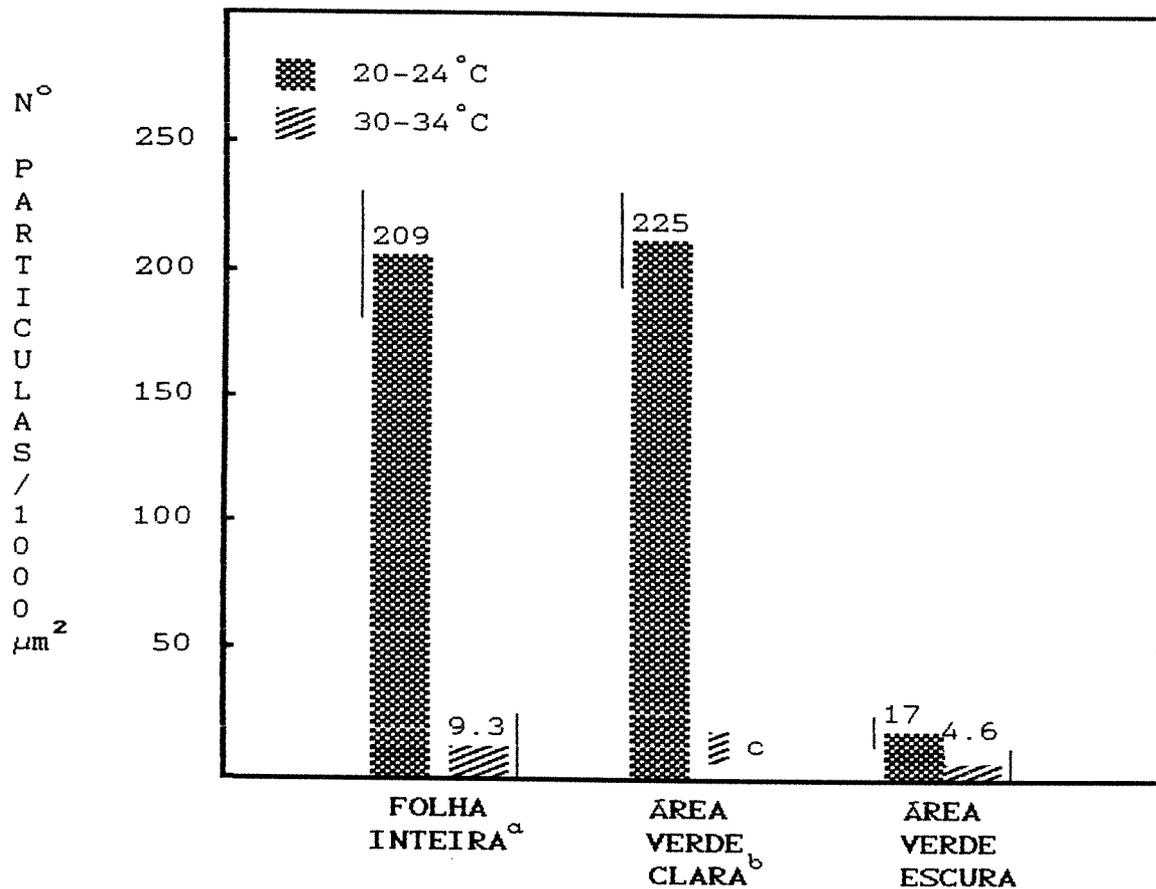


Figura 8. Avaliação da concentração de vírus nas 4^a-6^a folhas de soja IAC-2 após 25 dias em condições de temperatura controlada. Os valores representam número de partículas virais por 1000 μm^2 , contadas em testes de MEIAD.

- Em folha inteira foram feitos testes de MEIAD com os mesmos extratos utilizados na dosagem de catalase e peroxidase.
- As determinações nas áreas diferenciadas do mosaico foram feitas em extratos preparados com dois discos de 1,7 mm de diâmetro macerados em 50 μl de tampão.
- As plantas mantidas a 30-34 °C não apresentam áreas verde-claras em quantidade suficiente para determinar a concentração viral.

partes verde-claras contêm 13 vezes mais vírus do que as verde-escuras.

Em alta temperatura, como já mencionado, a área verde-clara se reduz, e em testes mais prolongados a folha apresenta coloração verde escura normal. Portanto, nestes casos só foi possível avaliar a concentração viral em áreas verde-escuras. Na maioria destas amostras foi verificada ausência de vírus, e em média a concentração foi um terço da observada em 20-24°C (figura 8).

6.3. Citopatologia.

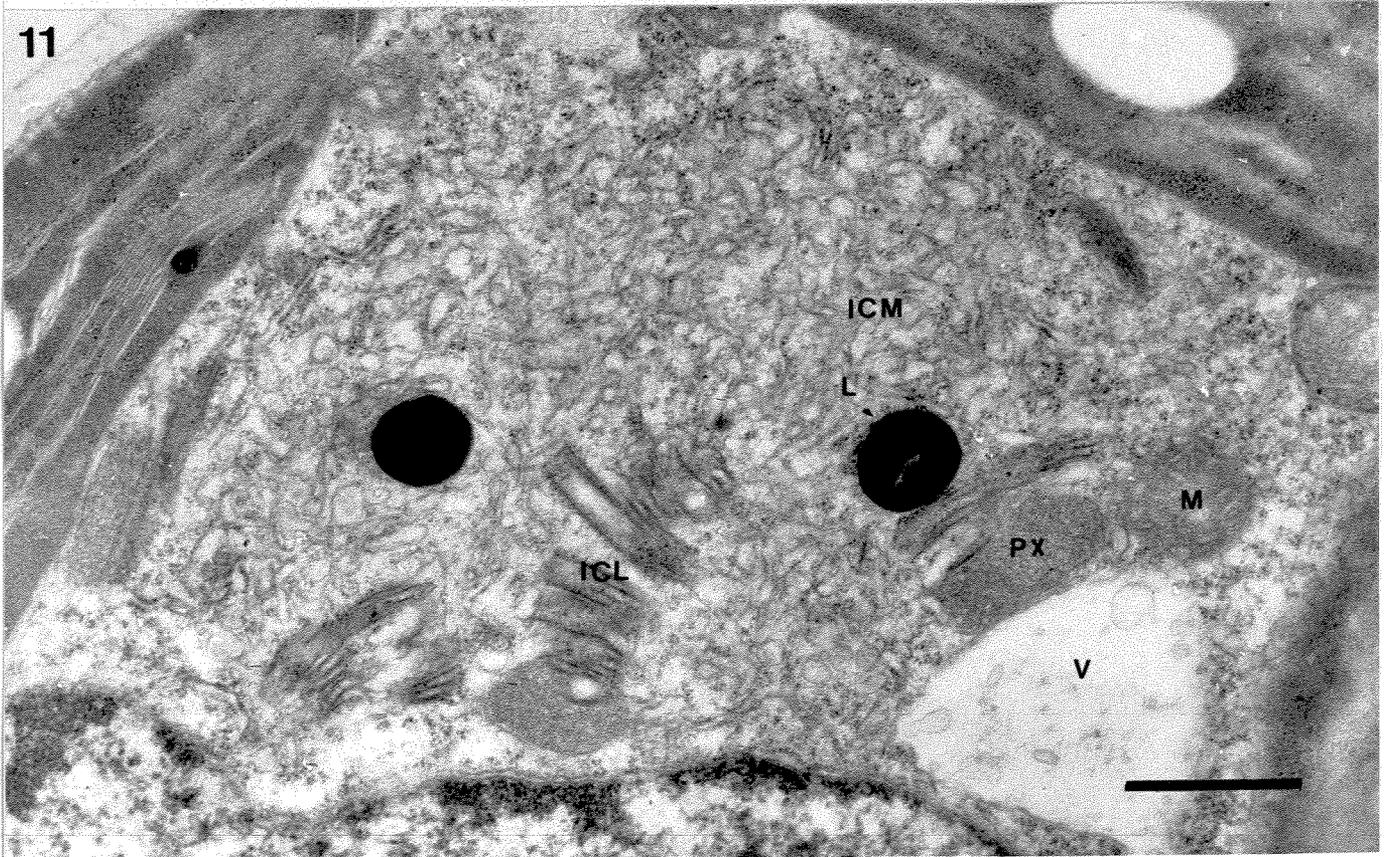
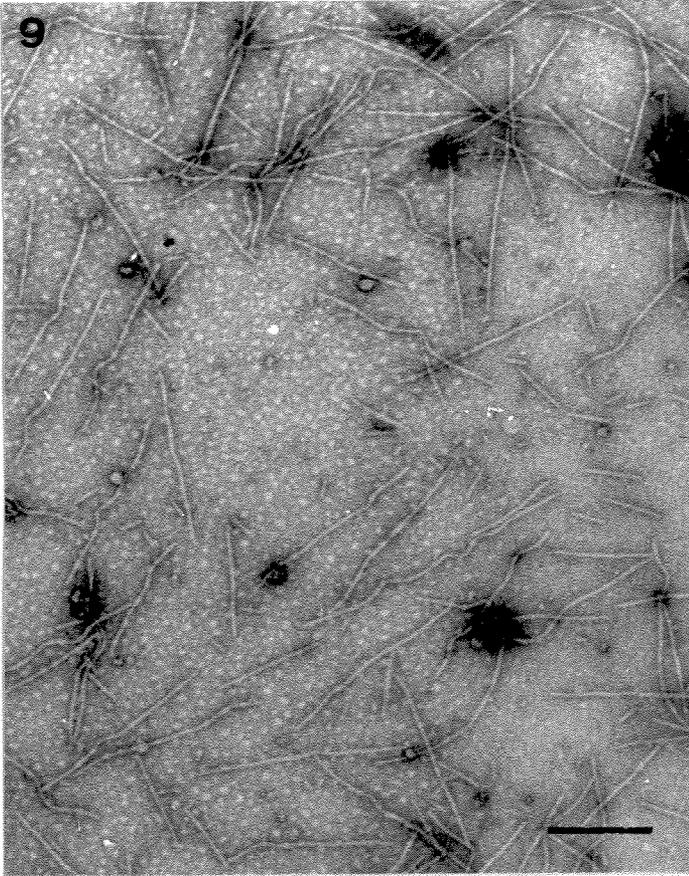
6.3.1. Inclusões citoplasmáticas lamelares e membranosas.

A característica mais consistente da citopatologia do vírus do mosaico da soja, como da maioria dos potyvirus, é a formação de inclusões citoplasmáticas, principalmente as do tipo catavento ("pinwheel"), tubulares, ou laminadas. No presente trabalho estas inclusões serão denominadas inclusões citoplasmáticas lamelares (ICL), para diferenciá-las das que serão chamadas inclusões citoplasmáticas membranosas (ICM). As inclusões deste segundo tipo, observado também no citoplasma, consistem em acúmulos de vesículas e cisternas que parecem derivar do retículo endoplasmático, junto com ribossomas. As ICM, cujo tamanho varia entre 1 e 8 μm , apareceram sempre nas proximidades ou incluindo ICL (figura 11). Dentro da massa membranosas se observam também ribossomas e gotas lipídicas, e eventualmente inclusões lamelares. Na periferia da ICM são normalmente observadas mitocôndrias e peroxissomas.

Figura 9. Micrografia de teste de MEIAD mostrando alta densidade de partículas virais .

Figura 10. Teste de MEIAD apresentado densidade média de partículas virais . Traço das figuras 9 e 10 representa 0,5 μm .

Figura 11. Inclusão citoplasmática membranosa (ICM) mostrando a presença de retículo endoplasmático (RE), inclusões citoplasmáticas lamelares (ICL), peroxissomas (PX) em contato com as ICL, gotas lipídicas (L) e mitocôndrias (M). V: vacúolo.
Traço de referência = 1 μm .



Embora todas estas alterações sejam indicativas da infecção pelo vírus, a observação de partículas virais é rara em amostras processadas rotineiramente para cortes de tecidos.

6.3.2. Imuno-citoquímica.

Uma série de experimentos para localização de proteínas virais, utilizando métodos imunocitoquímicos, foram realizados visando esclarecer os seguintes aspectos: a. Associação entre ocorrência de inclusões e efetiva presença do vírus ou da sua proteína na célula. b. Localização das partículas virais ou de sua proteína em células que contêm inclusões citoplasmáticas. c. Confirmar a natureza da proteína que forma as ICL, só identificadas pela sua morfologia, e examinar a possibilidade de outras localizações intracelulares desta proteína.

Os testes realizados utilizando o antissoro para a proteína da capa viral, ou vírus inteiro, mostraram que as células que têm inclusões contêm também a proteína estrutural do vírus. As partículas virais foram claramente visíveis em alguns experimentos de imunocitoquímica, formando feixes às vezes bastante grandes (figuras 12 e 13) ou alinhadas junto ao tonoplasto (figura 14), geralmente nas proximidades das ICL. As partículas virais foram fortemente marcadas com ouro (figuras 12-14 e tabela 3).

Nos materiais processados para imuno-citoquímica foi freqüentemente observada a presença de numerosos ribosomas nas inclusões lamelares, que parecem em contato com a lamela básica da inclusão (figuras 13-14). No exame destas micrografias deve-se cuidar de diferenciar a marcação pela sonda de ouro dos ribosomas. A presença em grande

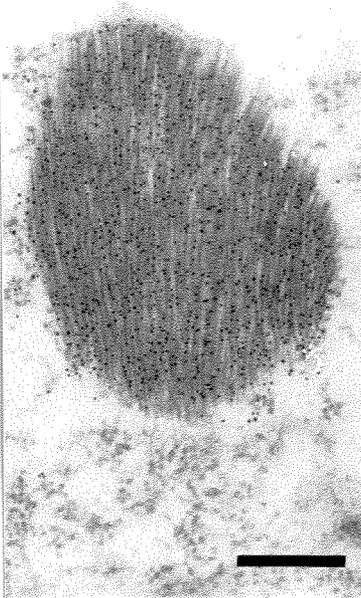
Figura 12. Feixe de partículas virais fortemente marcado pela sonda de ouro-proteína A com antissoro para VMS (vírus inteiro ou proteína da capa viral).

Figura 13. Preparação de "immunogold" com antissoro para a proteína da capa do VMS. A inclusão citoplasmática lamelar (ICL) apresenta leve marcação de ouro e contém abundantes ribossomas. Para diferenciar os ribossomas dos pontos de ouro observar que estes são menores e com limite mais definido. A ICL aparece em contato com um peroxisoma (PX) à esquerda e com um feixe de partículas virais (PV) à direita.

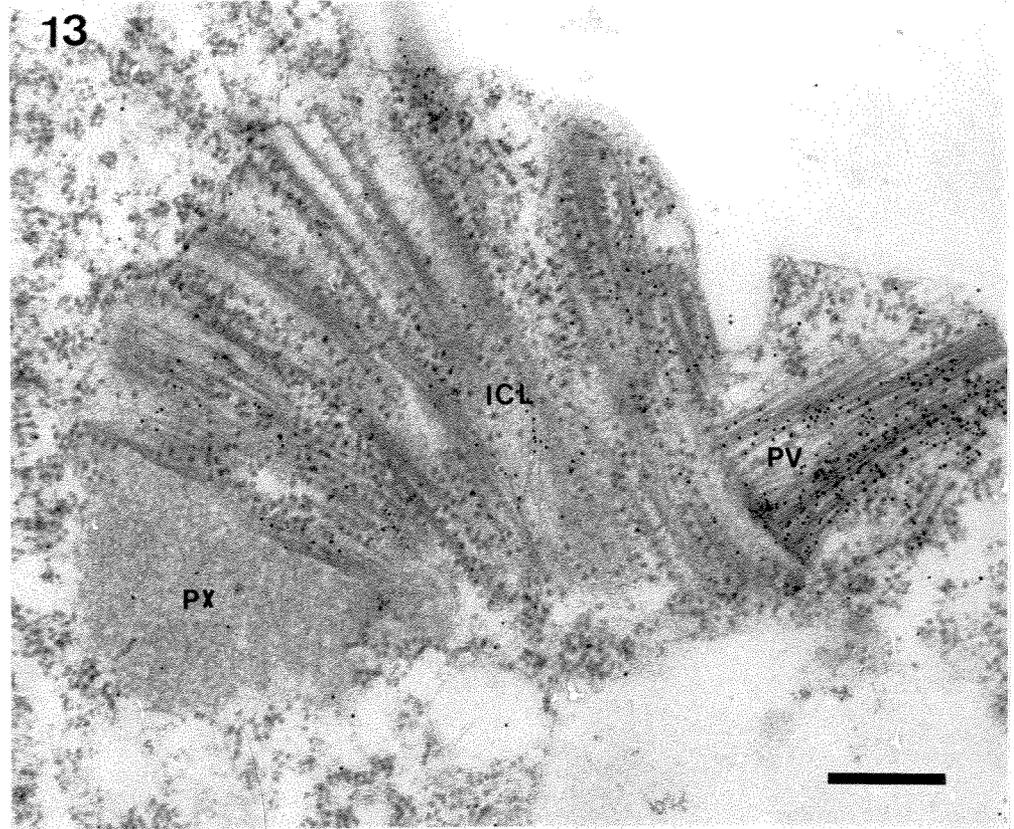
Figura 14. Marcação de anticorpos para a proteína da capa do vírus presentes em ICLs associadas aos peroxissomas (PX) e em partículas virais (PV) alinhadas junto ao tonoplasto (PV).

Traço de referência = 0,25 μ m.

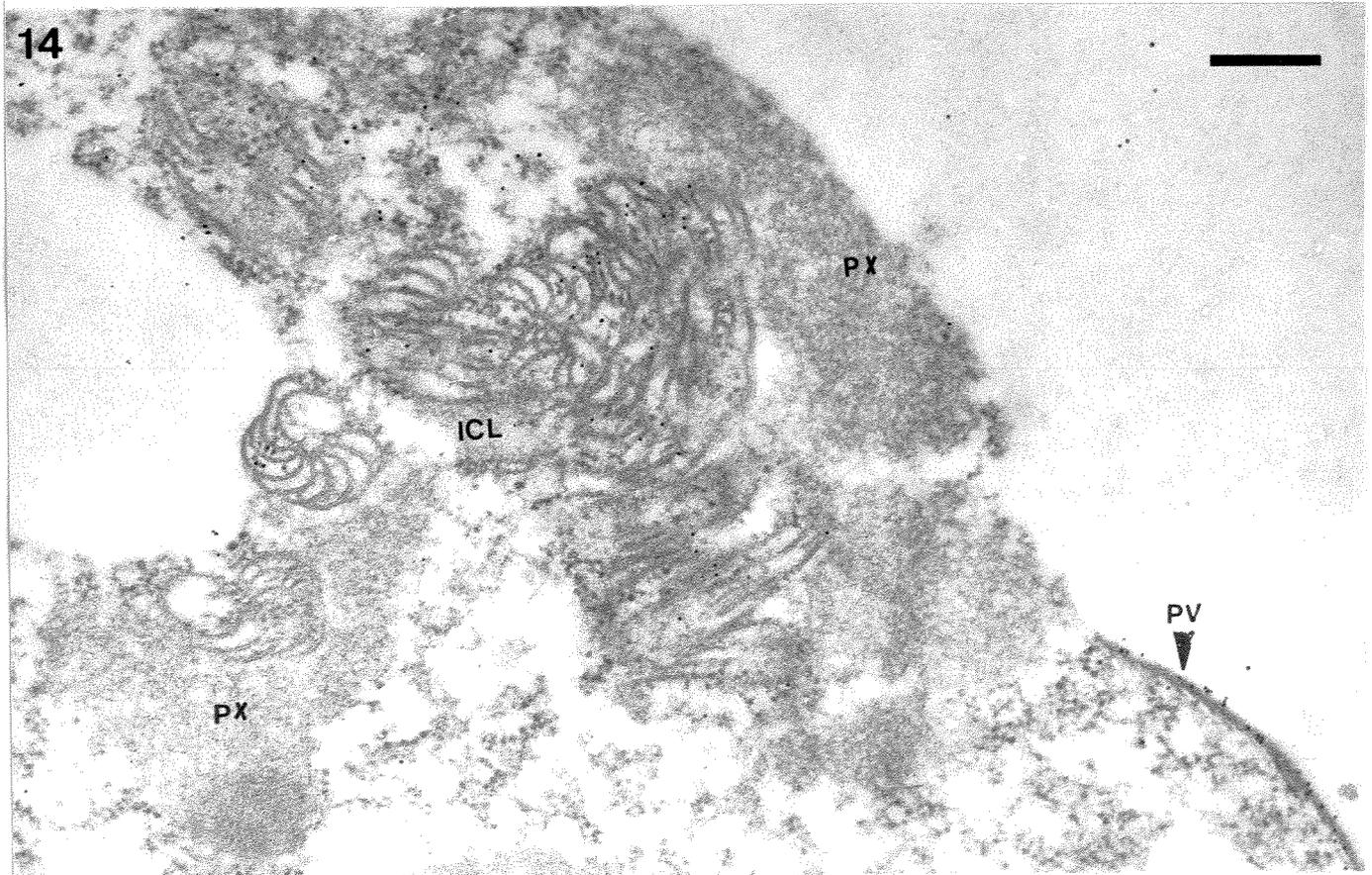
12



13



14



número destas organelas citoplasmáticas, responsáveis pela síntese de proteínas, associadas às ICL sugere que na inclusão ocorre síntese protéica.

As inclusões lamelares foram também marcadas em testes de "immunogold" quando usado antissoro para o vírus inteiro ou sua proteína, embora com menor intensidade que o próprio vírus (tabela 3). Deve-se tomar cuidado de diferenciar as partículas de ouro dos ribosomas que aparecem na inclusão (figuras 13-14). As partículas de ouro que marcam as ICL (fig. 14) não parecem acompanhar sua estrutura como acontece quando utilizado antissoro específico para a proteína das ICL (figura 16). Isto indica a presença de antígeno viral no volume ocupado pelas ICL, embora aparentemente não faça parte da lamela básica da inclusão.

Outras áreas marcadas consistentemente pelo antissoro para o vírus foram observadas próximas às ICL. Estas áreas contêm ribosomas e eventualmente estruturas filamentosas

Tabela 3. Distribuição de anticorpos anti-proteína da capa do VMS marcados pela sonda Proteína A-ouro

Estrutura	Área (μm^2) examinada	Total de partí- culas de ouro	Partículas por μm^2
Citoplasma	6,87	85	12,4
Inclusões cit. lamelares (ICL)	3,47	306	88,2
Áreas citop. prováveis ICM	2,30	172	74,8
Partículas virais (feixes)	0,2	284	1.372,0

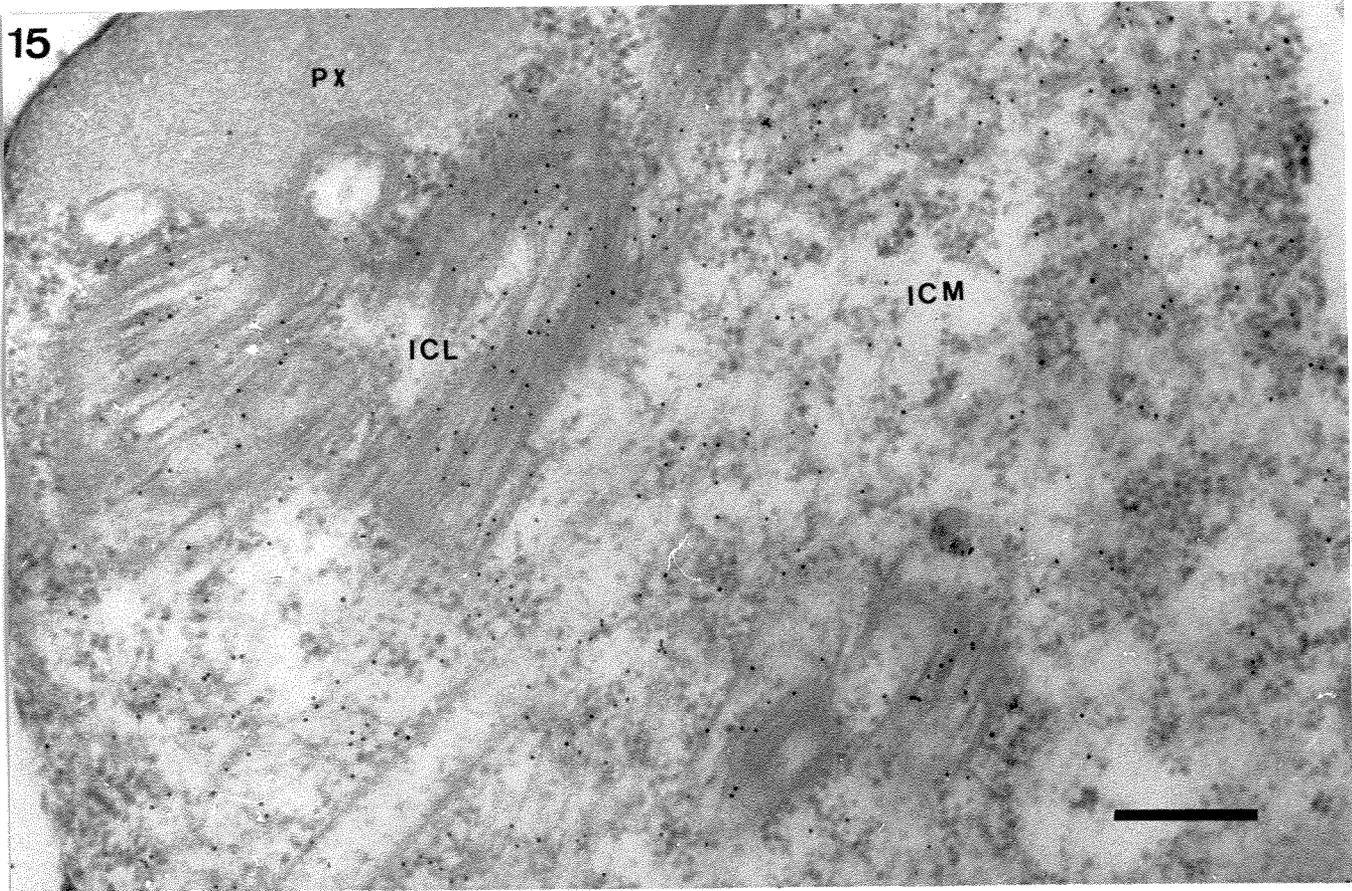
Figura 15. Area citoplasmática, que presumivelmente corresponde a uma inclusão membranosa (ICM), apresentando marcação pelo antissoro para o VMS, vizinha às ICL também marcadas e associadas à peroxisomas (PX).

Figura 16. Marcação pelo antissoro para a proteína das ICL. Observar que, além de mais intensa que com o antissoro para o vírus, a marcação segue a estrutura das inclusões. A associação das ICL com peroxisomas e vacúolos (V) faz que parte dos pontos de ouro apareçam sobre estas organelas. A seta indica o que parece ser um fragmento de peroxisoma em contato com uma ICL.

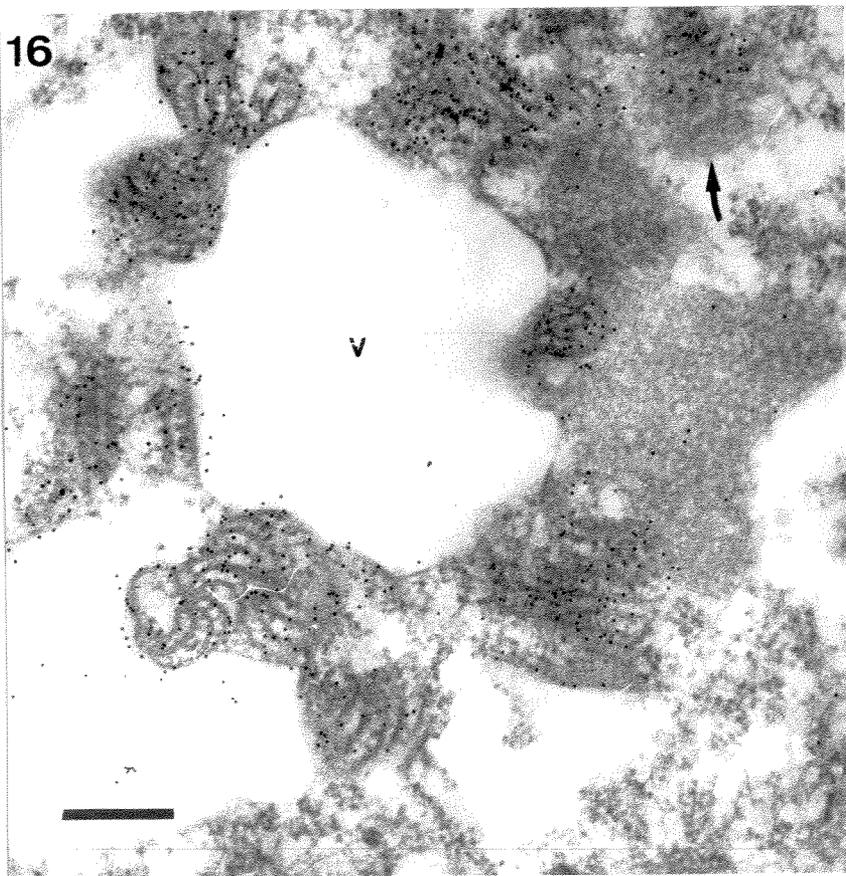
Figura 17. Inclusão marcada pela sonda e praticamente incluída num peroxisoma (PX).

Traço de referência = 0.25 μ m.

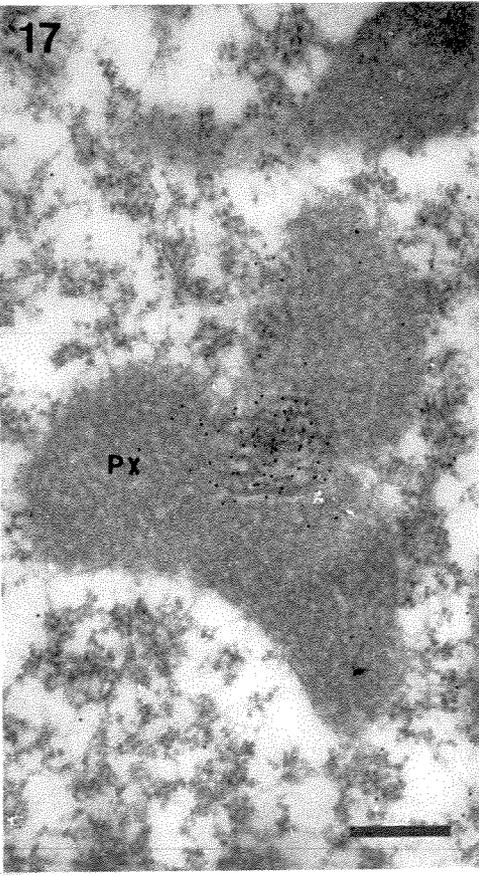
15



16



17



tênuas (figura 15). Estas últimas poderiam corresponder a partículas virais espalhadas nessas porções do citoplasma, embora sua densidade eletrônica seja menor que a observada nas partículas formando feixes (figura 12). A intensidade de marcação destas áreas é semelhante à observada nas ICL (tabela 3). Embora o processo de fixação para imuno-citoquímica não preserve as membranas, o que dificulta a identificação de estruturas membranosas, aparentemente estas áreas correspondem às ICM visíveis em material processado com ósmio (figura 11).

Os testes "immunogold" com antissoro para a proteína das ICL mostraram forte marcação destas inclusões. Com este antissoro as partículas de ouro aparecem dispostas seguindo a estrutura das ICL (figura 16). A associação entre ICL e peroxisomas faz com que em alguns casos estas organelas apareçam fragmentadas. Como os fragmentos aparecem também associados às ICL, eventualmente podem aparecer marcados pelo antissoro para ICLs (figura 16), mas geralmente é visível a estrutura da ICL contatando, ou invaginando, a membrana desta organela (figuras 16 e 17). A identificação destas estruturas como fragmentos dos peroxisomas é confirmada pela presença de catalase, demonstrada através de citoquímica (figuras 18 e 19).

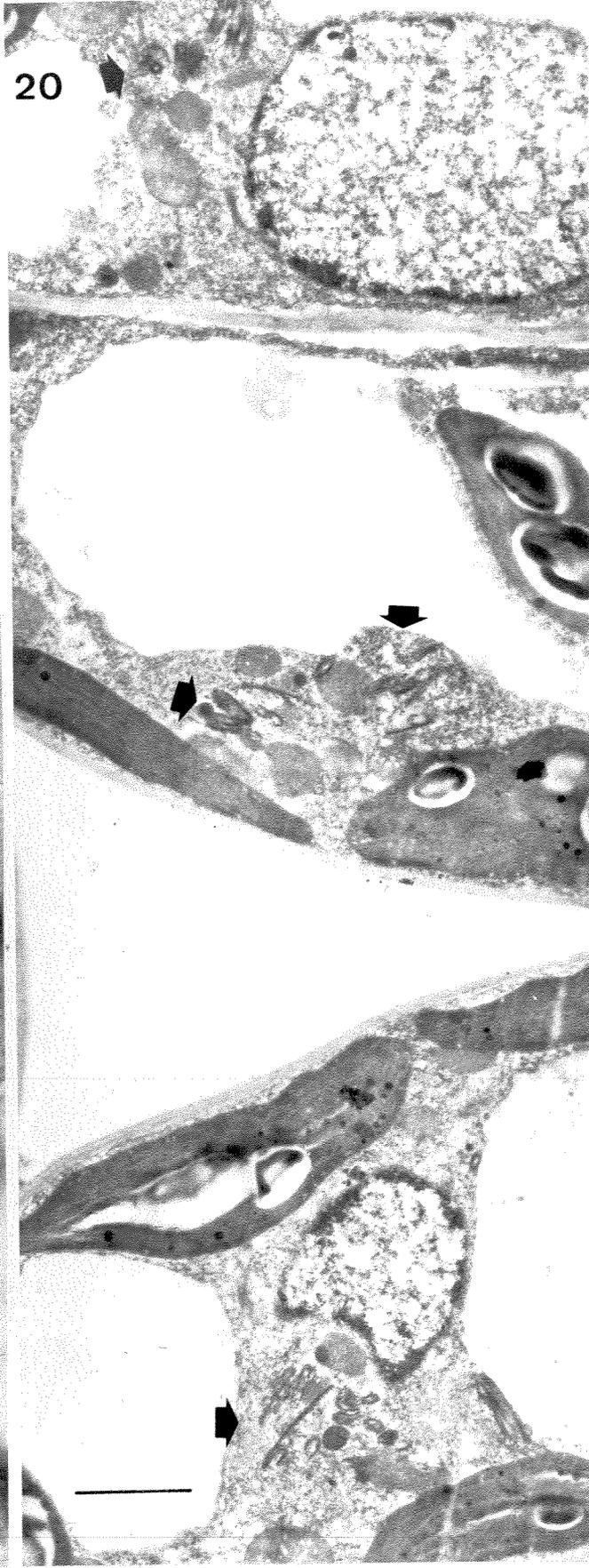
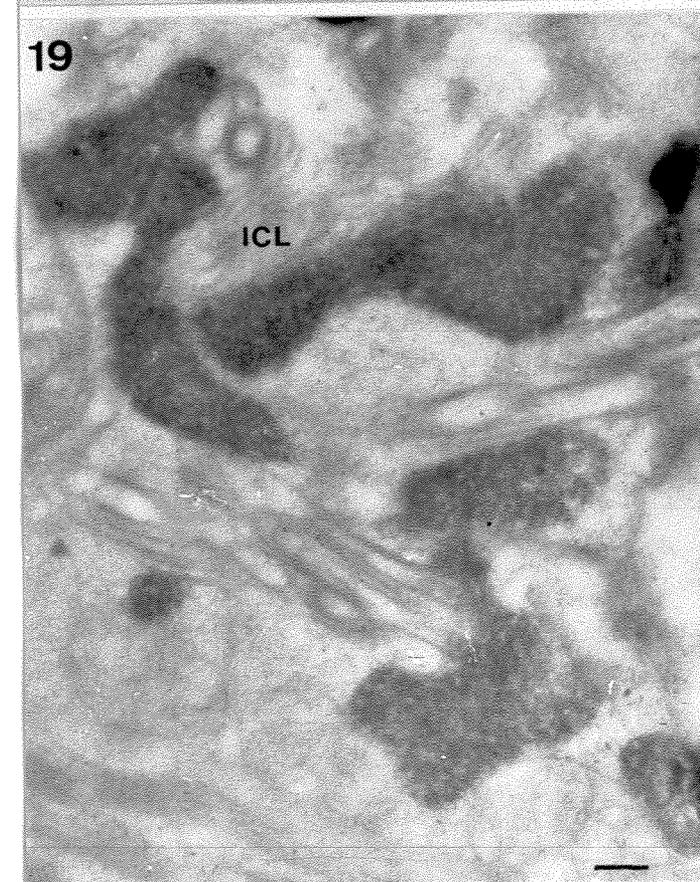
6.3.3. Efeito do tratamento térmico na citopatologia.

A quantidade de inclusões citoplasmáticas é visivelmente menor nas folhas de plantas mantidas em alta temperatura, esta diminuição foi aparentemente proporcional à duração do tratamento. Embora não tenha sido possível obter dados quantitativos de esta variação, o resultado baseia-se no estudo de numerosas amostras, provenientes dos experimentos em condições de temperatura controlada.

Figura 18. Peroxisoma de soja IAC-2 sadia, marcado pela reação de citoquímica enzimática para localização da catalase, apresentado forma arredondada.
Traço = 0.25 μm .

Figura 19. Localização da catalase em soja IAC-2 infectada com SMV, mostrando a fragmentação dos peroxisomas em contato com inclusões (ICL). Traço = 0,25 μm .

Figura 20. Micrografia eletrônica em baixo aumento mostrando três células do mesófilo da área verde-clara do mosaico com inclusões induzidas pelo VMS (setas).
Traço = 2 μm .



Difícilmente são encontradas IC em amostras provenientes de folhas novas, emitidas em condições de alta temperatura. Ao passo que em folhas do mesmo tamanho e idade, mas desenvolvidas a baixa temperatura (20-24°C), as IC são facilmente observadas.

Normalmente as inclusões formam grandes massas nas células da epiderme, e parecem regularmente distribuídas no parênquima clorofiliano, embora formando geralmente grupos menores. Nos materiais submetidos a alta temperatura observou-se primeiro o desaparecimento das IC do mesófilo. Posteriormente também diminuíram ou desapareceram, dependendo da duração do tratamento, as inclusões da epiderme.

6.3.4. Citopatologia nas áreas do mosaico.

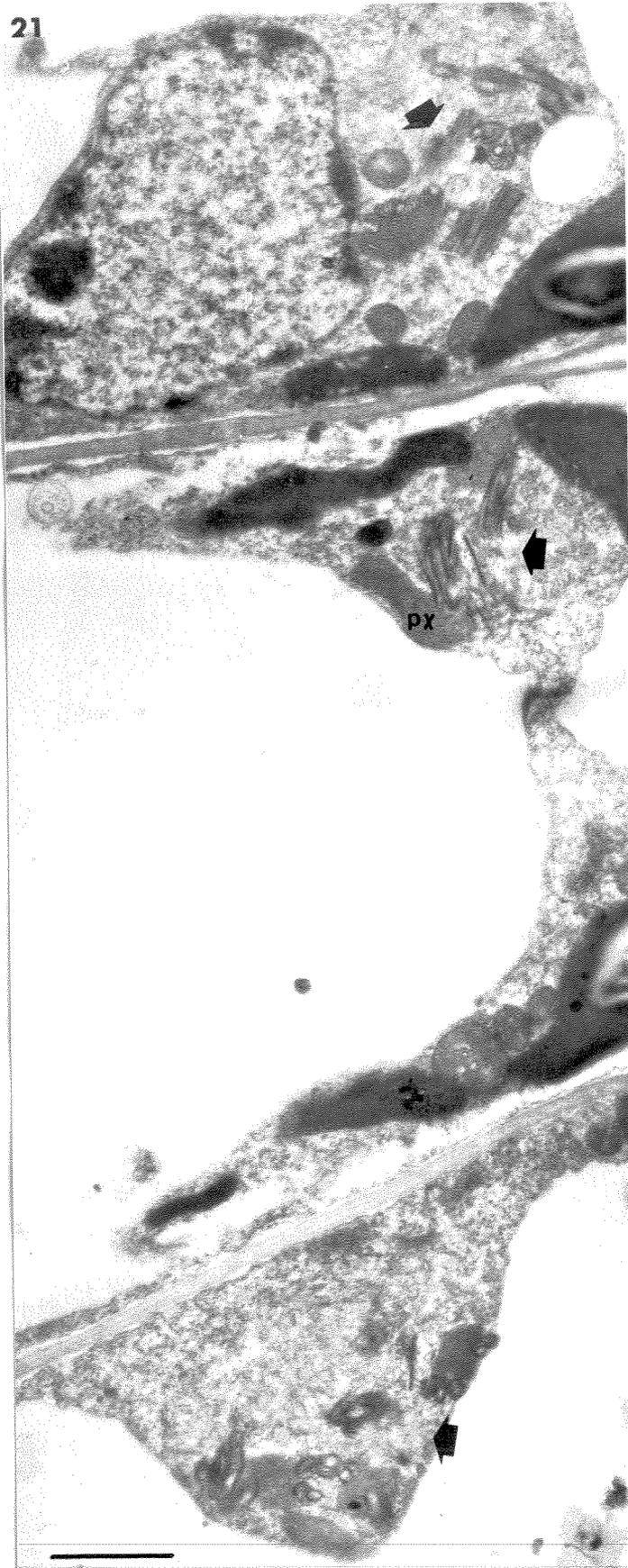
A distribuição das IC no mosaico foi examinada no modelo IAC-2 (resistente) pois neste caso aparecem claramente definidas as áreas verde-claras e escuras. Neste modelo foi verificado que a quantidade de inclusões é alta nas áreas verde-claras, principalmente na aureola mais amarela que separa as duas partes do mosaico (figura 21). Na parte verde-escura a concentração de IC é bem menor. No tratamento de alta temperatura foi difícil encontrar IC nas áreas escuras. Nas folhas mais novas deste tratamento, praticamente sem sintomas, não foram observadas inclusões.

A associação entre peroxissomas e inclusões citoplasmáticas lamelares foi observada tanto na variedade suscetível (Santa Rosa) como na IAC-2. Uma avaliação quantitativa desta associação não foi possível em termos numéricos, mas em geral foi observada com maior frequência na var IAC-2, particularmente na zona mais amarelada que pode ser diferenciada na divisa entre as partes verde-claras e escuras do mosaico (figuras 20, 21 e 22).

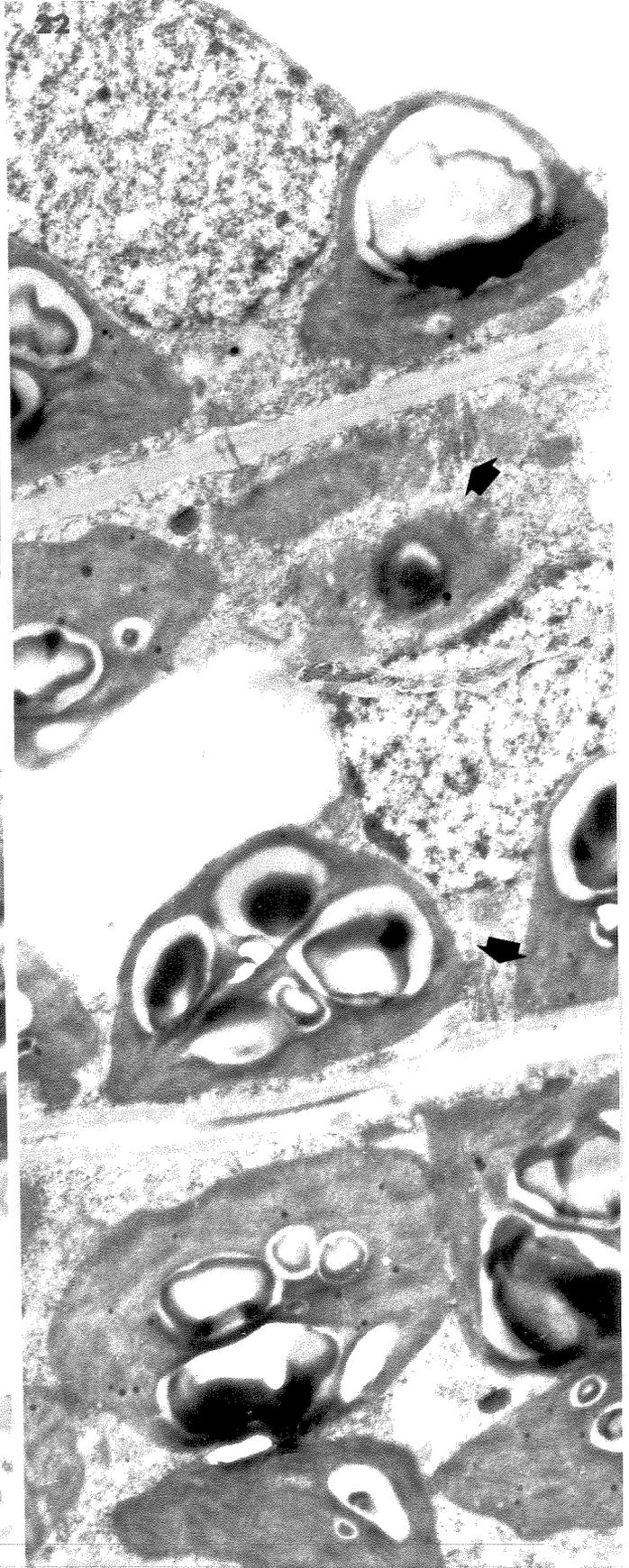
Figura 21. Corte de três células do mesófilo na área da aureola amarelada no limite entre área verde-clara e escura. Observar o grande número de inclusões (setas), geralmente associadas aos peroxisomas (PX).

Figura 22. Micrografia eletrônica mostrando três células do mesófilo da área verde-escura. As inclusões são muito escassas e de menor tamanho (setas).
O traço nas figuras 21 e 22 corresponde a 2 μm .

21



22



6.4. Alterações das atividades enzimáticas associadas com a infecção viral.

É conhecido que diversas infecções virais produzem alterações na atividade de algumas enzimas, principalmente do grupo das oxidases. O efeito da infecção viral sobre a peroxidase tem sido relacionado com a formação de lesões locais, em materiais hipersensíveis (FARKAS, 1978), e o aumento da atividade da catalase foi descrito mais recentemente em soja infectada sistêmicamente pelo VMS (VEGA e COSTA, 1986). No presente estudo foram analisadas as variações na atividade destas duas oxidases, em função da temperatura e das áreas diferenciadas pelo mosaico.

6.4.1. Aumento de atividade da catalase no modelo de suscetibilidade e efeito da temperatura.

Em soja da variedade Santa Rosa tinha sido observado, em estudos anteriores, que o aumento da atividade catalásica apresentava variações consideráveis, aparentemente relacionadas com as condições de temperatura e a idade da folha examinada (VEGA e COSTA, 1986). Para esclarecer este aspecto foram realizados experimentos em condições de temperatura diferenciadas: 20-24°C e 30-34°C.

As dosagens de atividade catalásica realizadas nos experimentos, com soja Santa Rosa mantida durante 21 dias em condições de temperatura controlada, deram resultados coincidentes, representados na figura 23. As determinações foram feitas em amostras tomadas ao acaso, sem discriminar as áreas verde-claras e escuras do mosaico, pois o sintoma desta variedade não permite essa distinção.

Verifica-se que a 20-24°C a atividade catalásica não foi afetada pela infecção viral, tanto nas folhas novas como nas

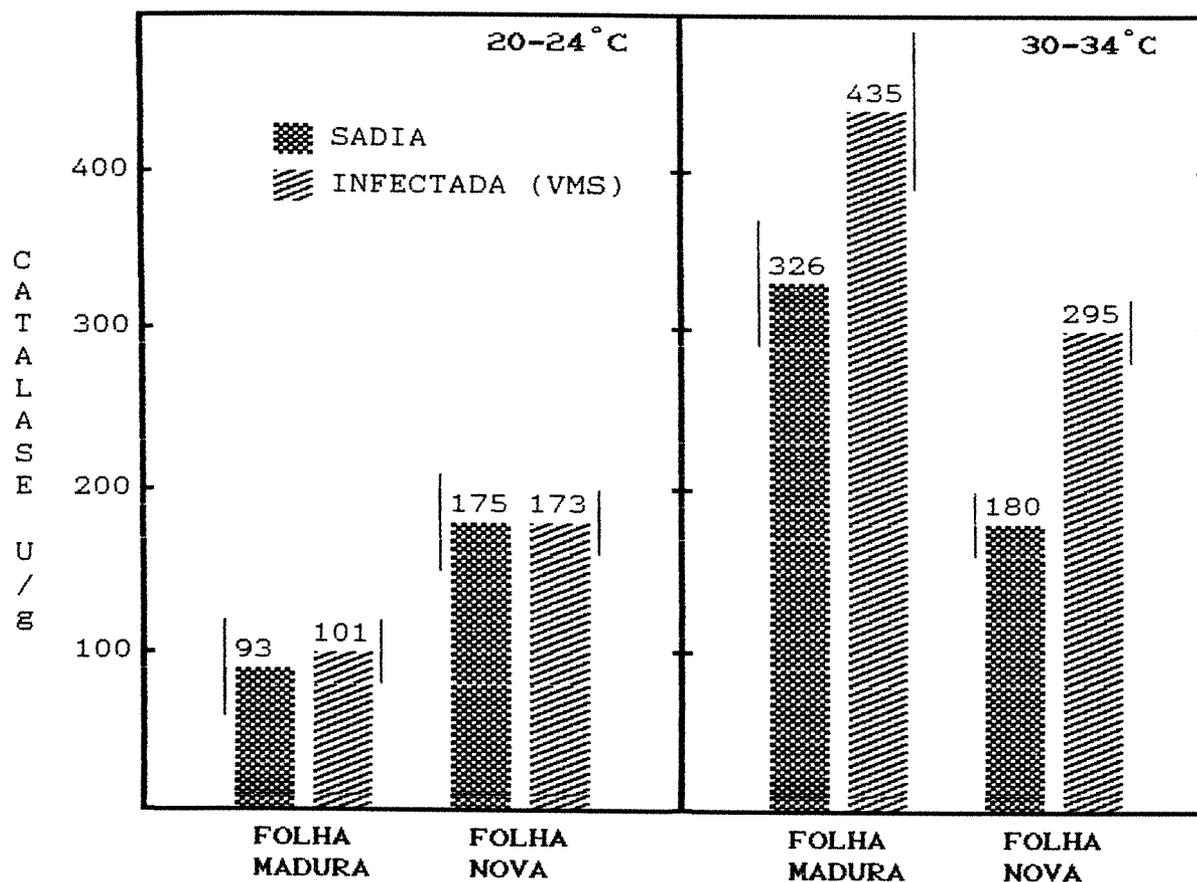


FIGURA 23. Atividade catalásica em plantas de soja 'Santa Rosa' infectadas com o VMS e sadias, mantidas 21 dias em temperatura controlada, comparando folhas maduras com folhas novas. Os valores são médias de 6-11 determinações realizadas em dois experimentos. A linha vertical representa o erro padrão da média. A temperatura afeta a velocidade de crescimento, o que faz com que a 20-24°C sejam consideradas folhas novas as 6^a- 8^a folha, ao passo que a 30-34°C são as folhas 8^a a 10^a.

já desenvolvidas (figura 23). Em condições de alta temperatura (30-34°C) as folhas novas infectadas tiveram 64% mais atividade catalásica que a folha sadia (significativo para $p < 0.01$). Nas folhas maduras, embora a alta temperatura tenha induzido aumento de atividade em relação às mantidas a 20-24°C, a diferença entre a sadia e a infectada, de 33%, não foi significativa estatisticamente.

Nestes experimentos os tratamentos de temperatura provocam também diferenças na velocidade de crescimento. Isto faz com que as folhas chamadas novas, em alta temperatura, sejam as 8ª a 10ª folha, ao passo que em baixa temperatura são as 6ª a 8ª folha. Contudo, a idade fisiológica das folhas comparadas foi semelhante.

6.4.2. Aumento de atividade catalásica no modelo de resistência: efeito da temperatura e variação nas áreas diferenciadas do mosaico.

A dosagem da catalase nas áreas verde-claras e escuras do mosaico foi realizada na variedade resistente IAC-2, que delimita estas áreas claramente. Após dezessete dias de inoculadas, sete dos quais em tratamento de temperatura controlada, foram obtidos os resultados resumidos na figura 24. A terceira folha, a primeira a mostrar o sintoma típico de mosaico sistêmico, apresentou atividade da catalase duas a três vezes maior que a mesma folha sadia. Os níveis de atividade da folha infectada foram similares nas duas temperaturas mas o aumento foi proporcionalmente maior a 20-24°C, em razão do baixo nível de atividade do controle nessa temperatura.



Figura 24. Atividade catalásica em plantas de soja IAC-2 mantidas durante 7 dias em condições de temperatura controlada. Os valores são médias de 3 repetições, com o erro padrão da média representado pela linha vertical. A primeira folha é a folha primária, que recebeu a inoculação mecânica. Note-se que nesta variedade de soja ocorreu aumento significativo da catalase nas terceiras folhas, tanto em baixa (A) como em alta (B) temperatura. Contudo, em baixa temperatura (A) o maior aumento ocorreu nas áreas verde-escuras.

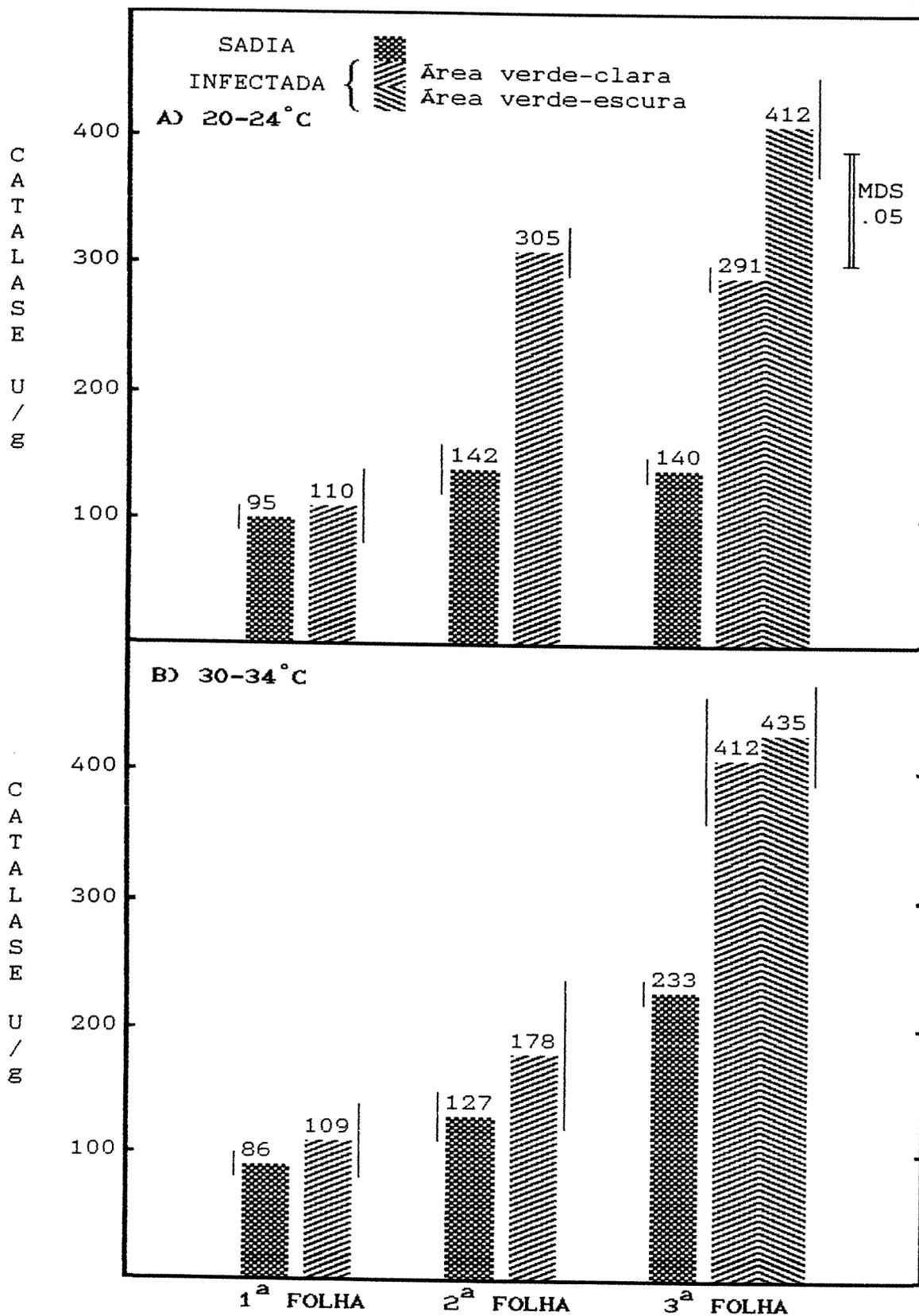


Figura 24. Legenda no verso da página anterior.

A distribuição da catalase nas áreas do mosaico não foi uniforme, principalmente a 20-24°C: a área verde-escura teve 40% mais atividade que a verde-clara (diferença significativa ao nível de $p < 0.05$). A 30-34°C as duas áreas quase não diferiram quanto à atividade catalásica (a verde-escura mostrou apenas 5% mais atividade que a verde-clara) e apresentaram altos níveis de atividade, similares ao da área verde-escura a baixa temperatura.

Aparentemente o aumento significativo da atividade catalásica associado à infecção viral ocorreu principalmente nas áreas verde-escuras, nas plantas mantidas a baixa temperatura. Ao passo que no tratamento de alta temperatura o aumento desta enzima localizou-se igualmente nas áreas verde-claras e verde-escuras. Além de alterar os níveis da catalase, a alta temperatura reduz gradualmente a área ocupada pelas partes verde-claras, como mostrado nas figuras 4-6.

Na folha inoculada (1ª folha) não houve alteração da atividade da catalase associada à infecção. Na segunda folha, onde pode haver início de sintomas sistêmicos, notou-se aumento da atividade desta enzima, que só foi significativo nas plantas mantidas a baixa temperatura (20-24°C). Provavelmente isto se deve ao fato de que o número de células infectadas é ainda baixo, não chegando a estabelecer-se as condições próprias da infecção sistêmica.

6.4.3. Correlação entre atividade da catalase e concentração do vírus e efeito da temperatura.

Em dois experimentos realizados com soja IAC-2 foram aplicados os tratamentos de temperatura controlada por períodos diferentes: no primeiro (A) o tratamento foi aplicado

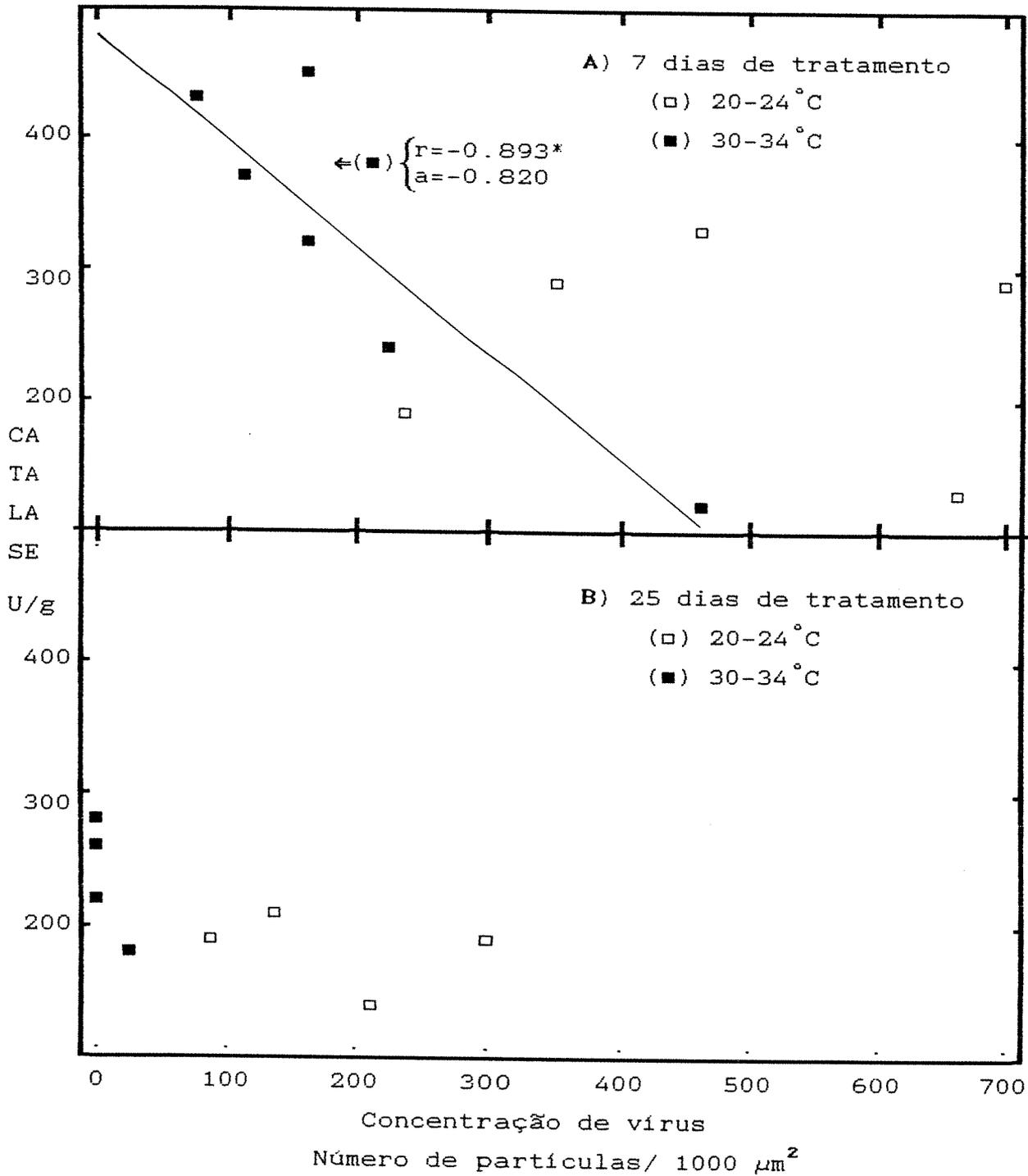


Figura 25. Representação dos valores obtidos para atividade catalásica vs. concentração de vírus, em dois testes com soja IAC-2 em condições de temperatura controlada durante A) 7 dias e B) 25 dias. r: coeficiente de correlação significativo (* $p < 0,02$) a: coeficiente angular (inclinação) da reta ajustada.

por 7 dias e no segundo (B) durante 25 dias. Após esses períodos, foram examinados os níveis de atividade da catalase e a concentração de vírus, em cada um dos extratos obtidos. No experimento A foi analisada a terceira folha, ao passo que no B foram as quartas e quintas folhas. Os resultados estão representados na figura 25.

No experimento A foi verificada forte correlação negativa entre atividade da catalase e concentração viral nas plantas mantidas em alta temperatura (30-34°C): o coeficiente de correlação (r) foi de -0.893 que é significativo ao nível de $p < 0.02$. O coeficiente angular da reta ajustada foi $a = -0.82$, o que indica uma relação quase equivalente entre as duas variáveis: a uma duplicação da atividade da catalase, corresponderia uma diminuição quase à metade da concentração viral. Neste mesmo experimento se verifica que nas plantas mantidas em baixa temperatura não houve correlação significativa entre estas variáveis ($r = -0.045$).

Nas plantas mantidas 25 dias em condições de temperatura controlada (experimento B) observou-se que tanto a concentração viral como a atividade catalásica são em geral menores, tanto em alta como em baixa temperatura. Nas plantas tratadas a 30-34°C o conteúdo de vírus foi zero na maioria delas, o que invalida a aplicação da análise estatística da correlação. Os dados de plantas mantidas em baixa temperatura não apresentaram correlação significativa ($r = -0.365$), mas mostram concentrações de vírus comparativamente altas associadas aos baixos níveis de atividade da catalase.

Na análise destes experimentos deve levar-se em consideração que, além da influência da duração do tratamento térmico, o fator tempo determina a idade fisiológica da planta e da folha examinada, e também a fase da doença. Assim, no experimento A foi examinada a primeira folha emitida em condições experimentais, apenas 14 dias após a inoculação, quando

Figura 26. Atividade da peroxidase em plantas de soja IAC-2 mantidas durante 7 dias em condições de temperatura controlada. Os valores são médias de 3 repetições, com o erro padrão da média representado pela linha vertical. A primeira folha é a folha primária, que recebeu a inoculação mecânica. Observar que só as folhas mais novas (3ª folha) mostraram maior atividade peroxidásica, principalmente nas áreas verde-claras, nas duas condições de temperatura.

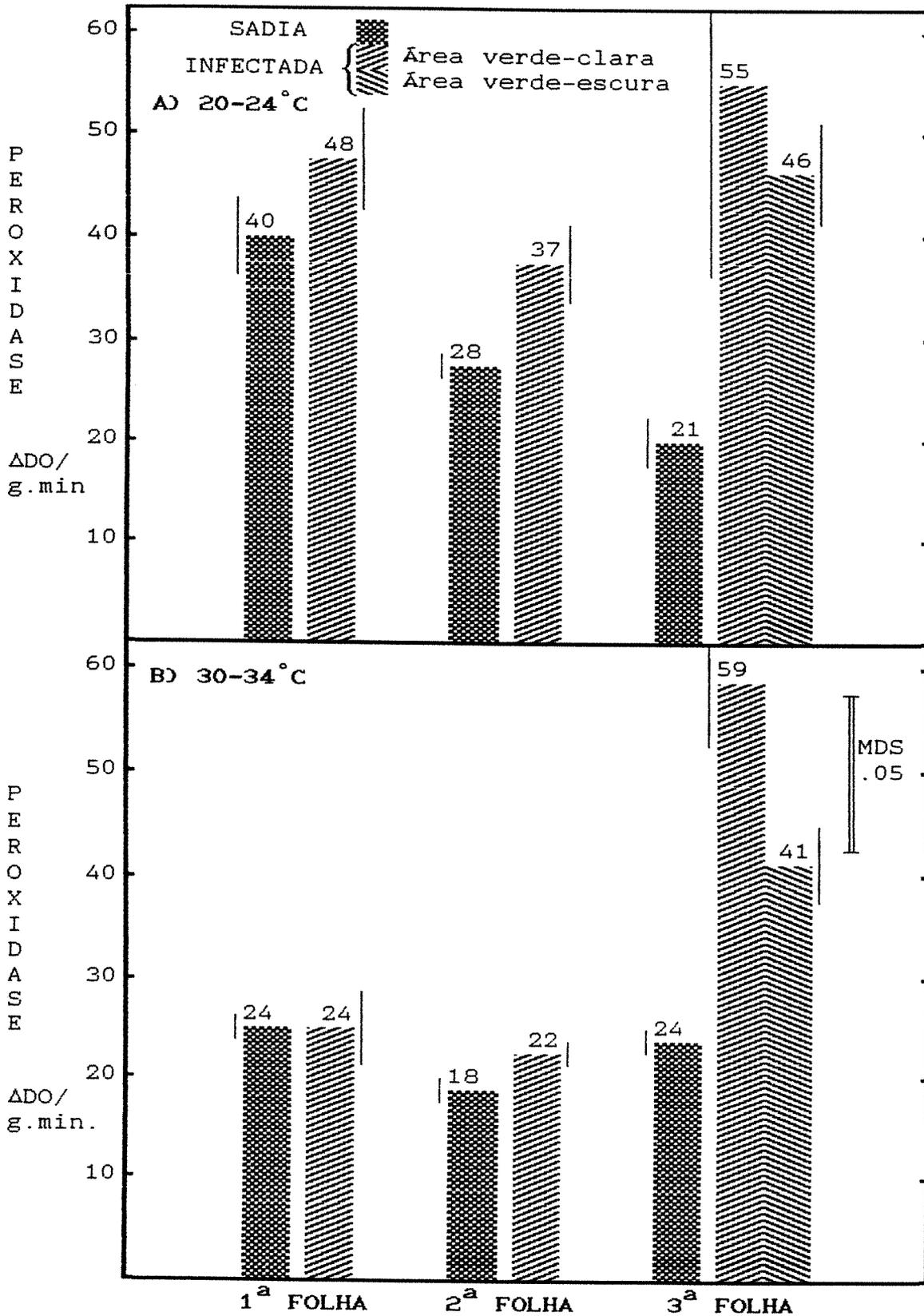


Figura 26. Legenda no verso da página anterior.

a planta ainda se encontra na fase aguda da doença, que se segue à invasão sistêmica. No caso do experimento B foi analisada a quarta e sexta folha, 32 dias depois da inoculação quando a doença entrou já numa fase crônica. O efeito destes fatores pode ser avaliado pela evolução observada nos dados de plantas em baixa temperatura: após 25 dias os valores da catalase e conteúdo de vírus são bem menores que aos 7 dias. Ou seja que há uma queda nos valores das duas variáveis analisadas em função do tempo. O tratamento de alta temperatura provocou uma redução mais rápida em uma das variáveis: a concentração de vírus.

6.4.4. Incremento na atividade da peroxidase em relação à temperatura e variação nas áreas diferenciadas do mosaico.

A atividade da peroxidase aumentou também por efeito da infecção, tanto em alta como em baixa temperatura (figura 26). Este aumento não foi observado na folha inoculada e só se esboça na segunda folha. Somente na terceira folha a diferença com a planta sadia se torna significativa. Como esta resposta foi observada tanto em alta como em baixa temperatura, indica que este fator não afeta a reação ao nível da peroxidase.

A distribuição desta enzima nas áreas do mosaico parece seguir um padrão inverso ao da catalase: houve mais peroxidase nas áreas verde-claras. Isto foi observado em ambas as temperaturas mas foi mais evidente em alta temperatura (30-34°C).

6.4.5. Relação entre peroxidase e concentração do vírus.

O exame das figuras 7 e 26 mostra que as áreas verde-claras, que contêm mais vírus (figura 7), são também as que apresentam mais atividade peroxidásica (figura 26). Esta tendência do valores médios não foi confirmada na análise da correlação ao nível de dados individuais. Contudo, a tendência dos valores médios é inversa à da catalase, que apresenta em geral valores maiores nas amostras com menor conteúdo de vírus.

7. DISCUSSÃO

O modelo soja IAC-2 infectada pelo VMS se caracteriza pela invasão do vírus com manifestação de mosaico sistêmico e posterior regressão dos sintomas, chegando em alguns casos à recuperação total da planta, dependendo das condições de temperatura. Este modelo é completamente diferente, portanto, da resistência por hipersensibilidade demonstrada nas variedades de soja IAC-9 e IAC-11. Nestes casos há formação de lesões locais necróticas, sem invasão sistêmica posterior (COSTA e MIRANDA, 1987).

A comparação entre as variedades de soja Santa Rosa (suscetível) e a IAC-2 (resistente) em diferentes condições de temperatura fornece um quadro geral das características diferenciais observadas frente à infecção com o VMS (tabela 4). Da análise destas características e de suas alterações em distintas temperaturas, pode-se obter indicações dos mecanismos envolvidos no processo pelo qual a variedade resistente consegue recuperar-se dos efeitos da infecção do VMS.

Deve lembrar-se que as duas variedades comparadas são hospedeiras do VMS e apresentam diferentes graus de resistência (ou de suscetibilidade) ao vírus. O referencial ideal de

Tabela 4. Características diferenciais das respostas à infecção com VMS das variedades de soja suscetível (Santa Rosa) e resistente (IAC-2).

CARACTERÍSTICA	VARIEDADE SUSCETÍVEL	VARIEDADE RESISTENTE
1. Formação de áreas verde-escuras, com tamanhos crescentes nas folhas mais novas		
1.1. Em baixa temperatura (20-24°C).	-	-
1.2. Em alta temperatura (30-34°C).	-	+++
2. Queda da concentração de vírus em condições da alta temperatura		
7.1. Nas áreas verde-claras	} -	+
7.2. Nas áreas verde-escuras		++
3. Diferencial de concentração de vírus: maior nas áreas verde-claras do que nas verde-escuras	n.d.	+
4. Ocorrência de associação peroxissomas-inclusões citoplasmáticas	+	+++
5. Aparente localização preferencial das inclusões associadas com peroxissomas na junção das áreas verde-claras e verde-escuras.	n.d.	+
6. Aumento significativo da atividade da catalase, por efeito da infecção.		
6.1. Em baixa temperatura.	-	++
6.2. Em alta temperatura.	+	+
7. Diferencial da atividade catalásica em baixa temperatura: menor nas áreas verde-claras.	n.d.	+
8. Correlação inversa entre conteúdo de vírus e atividade catalásica, significativa só em alta temperatura.	n.d.	+

n.d.: não determinado.

suscetibilidade total, onde o vírus não sofre nenhum tipo de limitação na sua replicação nem na sua distribuição na planta, é uma raridade (ZAITLIN and HULL, 1987) e obviamente não é o caso da soja Santa Rosa.

A primeira diferença entre as variedades pode ser notada a nível sintomatológico pois na variedade resistente há tendência para formação de áreas verde-claras e escuras melhor definidas que na soja Santa Rosa. Em condições de alta temperatura, a superfície ocupada pelas áreas verde-claras aumenta nitidamente na variedade IAC-2. Este fenómeno não se observa sistematicamente na variedade suscetível, embora eventualmente possam aparecer áreas (ilhas ou "bolhas") verde-escuras. Na variedade resistente as áreas verde-escuras vão também tomando as características da folha normal na medida em que aumenta sua área. Nisto diferem das ilhas verdes da variedade suscetível que apresenta uma cor aparentemente mais intensa que a normal e geralmente mostram deformação (formam "bolhas") por crescerem mais que os tecidos circundantes.

O processo descrito ocorre mais claramente nas folhas novas que são emitidas nas condições de alta temperatura. A continuidade destas condições faz com que este processo cause uma grande redução da área verde-clara, levando à recuperação praticamente total da planta.

Nos resultados aqui apresentados se demonstra também que o tratamento de alta temperatura na variedade IAC-2 induz forte queda da concentração viral nas duas áreas do mosaico, passando rapidamente a valores de quase zero nas partes verde-escuras. Tratamentos similares na variedade suscetível não produziram queda significativa no conteúdo de vírus. Deve levar-se em consideração que os resultados das contagens de partículas virais em testes de MEIAD em soja Santa Rosa foram quase dez vezes maiores que na variedade resistente.

A distribuição desigual de vírus nas áreas do mosaico, com maior concentração de vírus nas áreas verde-claras e baixa (ou nula) nas verde-escuras, confirma o observado para outros vírus que induzem este tipo de sintoma. Este resultado é similar ao descrito para reovirus (KIMURA, 1962), tombusvirus (REID and MATTHEWS, 1966) e tobamovirus (ATKINSON and MATTHEWS, 1970). O mosaico causado por potyvirus parece seguir a mesma distribuição, como mostram os resultados de REZENDE et al. (1982) com o vírus do mosaico de mamoeiro ("papaya ringspot virus") e os aqui apresentados com o vírus do mosaico da soja. No caso do vírus do mosaico do mamoeiro foi observado que o inóculo tomado de "bolhas" verdes transmitiu o vírus em 40% dos casos, ao passo que o inóculo das partes verde-claras transmitiu em porcentagem próxima a 100%. O maior número de casos negativos indica menor concentração viral nas áreas verde-escuras ("bolhas").

A citopatologia observada nas diferentes áreas do mosaico indica um paralelismo com as concentrações virais observadas. Nas áreas verde-claras ocorrem as maiores alterações citopatológicas: presença de inclusões lamelares, membranosas e eventualmente feixes de partículas virais.

O estudo de imuno-citoquímica confirma que a presença de inclusões é indicativa de antígeno viral na célula, embora não possa se fazer uma correlação quantitativa destes dois parâmetros. Em muitos casos é clara a associação do antígeno viral com as inclusões lamelares e membranosas, o que sugere o envolvimento destas estruturas no ciclo replicativo do vírus ao nível celular. Um detalhe da ultraestrutura das inclusões lamelares é particularmente significativo, quanto à sua possível função: a frequente presença de ribossomas que aparecem associados à lamela da inclusão. Isto sugere que nas ICL ocorre síntese de proteínas, pelo menos em alguma

fase do ciclo do vírus na célula. Por ser a ICL uma estrutura induzida pelo vírus, as proteínas que nela são produzidas devem estar associadas ao vírus, podendo ser proteínas da capa viral (estrutural) ou não estruturais. Em muitos casos inclusões lamelares que não mostravam partículas virais associadas apresentam fraca marcação por "immunogold" com anticorpos para a proteína da capa viral. Como a proteína das inclusões lamelares e da capa viral não são relacionadas serologicamente, uma possível interpretação para esse fato é que nas ICL seja produzida a poli-proteína que resulta da tradução do genoma nos potyvirus (DOUGHERTY and CARRINGTON, 1988). Esta poli-proteína contém as seqüências das diversas proteínas codificadas pelo genoma viral e é rapidamente processada por proteases originando cada uma das proteínas virais (CARRINGTON and DOUGHERTY, 1987). É possível que a fraca marcação observada nas ICL seja atribuível à presença desta poli-proteína, que seria sintetizada na inclusão e rapidamente processada.

O tratamento de alta temperatura afeta também, como é de se esperar, a citopatologia: provoca diminuição drástica no número de inclusões citoplasmáticas, principalmente na variedade resistente e nas áreas verde-escuras desta.

A associação das inclusões lamelares com peroxissomas, característica só descrita para o VMS (VEGA, 1985), foi observada com maior frequência na variedade resistente, principalmente nas áreas de junção entre as partes verde-claras e verde-escuras.

Os testes de "immunogold" utilizando antissoro para a proteína das ICL e os testes de citoquímica enzimática para localização da catalase nos peroxissomas, demonstram que a associação entre ICL e peroxissomas resulta num estreito contato da membrana, e aparentemente também da matriz, desta organela com as lamelas da inclusão.

Como pode ser visto na tabela 4 , outro parâmetro que é alterado pelo tratamento de alta temperatura é o nível da atividade catalásica. Neste caso a variedade resistente se diferencia claramente da suscetível pela resposta em baixa temperatura: na soja IAC-2 a infecção induz uma atividade catalásica entre duas e três vezes maior que no controle sadio. Na variedade suscetível não há reação alguma a infecção nessas condições de temperatura. Quando mantidas em alta temperatura nas duas variedades houve aumento da atividade da catalásica, embora em maior proporção na IAC-2 (Figuras 23 e 24).

Outro aspecto significativo é a localização deste aumento de atividade catalásica nas áreas verde-claras. Aparentemente é nestas áreas onde ocorre a maior parte do aumento desta atividade associado com alta temperatura: na planta infectada mantida a baixa temperatura as áreas verde-claras têm menos atividade que as escuras. Em alta temperatura apresentam níveis de atividade iguais às partes verde-escuras (Figura 24).

A correlação significativa detectada entre concentração de vírus e atividade da catalase (figura 25) confirma o sugerido pela variação dos valores médios (figuras 7 e 24). Na análise da correlação são utilizados os dados individuais de atividade enzimática e concentração viral para cada extrato e não os valores médios. Portanto a idéia de relação inversa entre atividade catalásica e conteúdo de vírus recebe apoio destes dois tipos de análise estatística.

O fato de ter-se verificado correlação significativa unicamente em alta temperatura indica que este fator ambiental afeta de alguma maneira a relação entre as duas variáveis. Em condições de baixa temperatura não há relação entre as variáveis, mas a condição de alta temperatura parece ativar uma mecanismo que liga o aumento da atividade da catalase com a queda da concentração viral.

Aparentemente o aumento da catalase ocorre nas áreas verde-escuras, recuperadas ou em vias de recuperação (no caso das verde-claras em alta temperatura). Ao passo que a peroxidase aparece em níveis maiores nas áreas verde-claras, onde o vírus ocorre em maior concentração. Isto sugere que o aumento da catalase estaria relacionado à recuperação desse tecido. No caso da peroxidase, seu aumento parece ser uma consequência da maior concentração viral. Provavelmente esta enzima, localizada principalmente na parede celular (VAN UYSTEE, 1987) é parte do mecanismo defensivo para outros tipos de patógenos cuja ação sobre a parede celular é fundamental (BUONAURO *et al.* 1987). Neste caso a resposta da peroxidase seria não específica e provavelmente ativada pela intensa replicação do vírus.

7.1. Proposta de um esquema geral para a interpretação dos resultados.

Um esquema relacionando entre si os diferentes resultados obtidos é proposto na figura 28. Segundo esta proposta a alta temperatura afetaria o metabolismo da planta principalmente pelo aumento da fotorrespiração. É conhecido que aumentos de temperatura entre 15°C e 35°C induzem aumentos da fotorrespiração, em proporção maior que os da respiração e da fotossíntese (ZELITCH, 1971, TOLBERT, 1980b). Este aumento é explicado, ao menos em parte pela maior solubilidade do O_2 do que do CO_2 na água, o que aumentaria a disponibilidade de oxigênio nos cloroplastos. A fotorrespiração (Figura 29) considerada uma consequência da competição entre O_2 e CO_2 por um sítio comum da enzima que, através de carboxilação, inicia o processo de assimilação do CO_2 . Esta enzima,

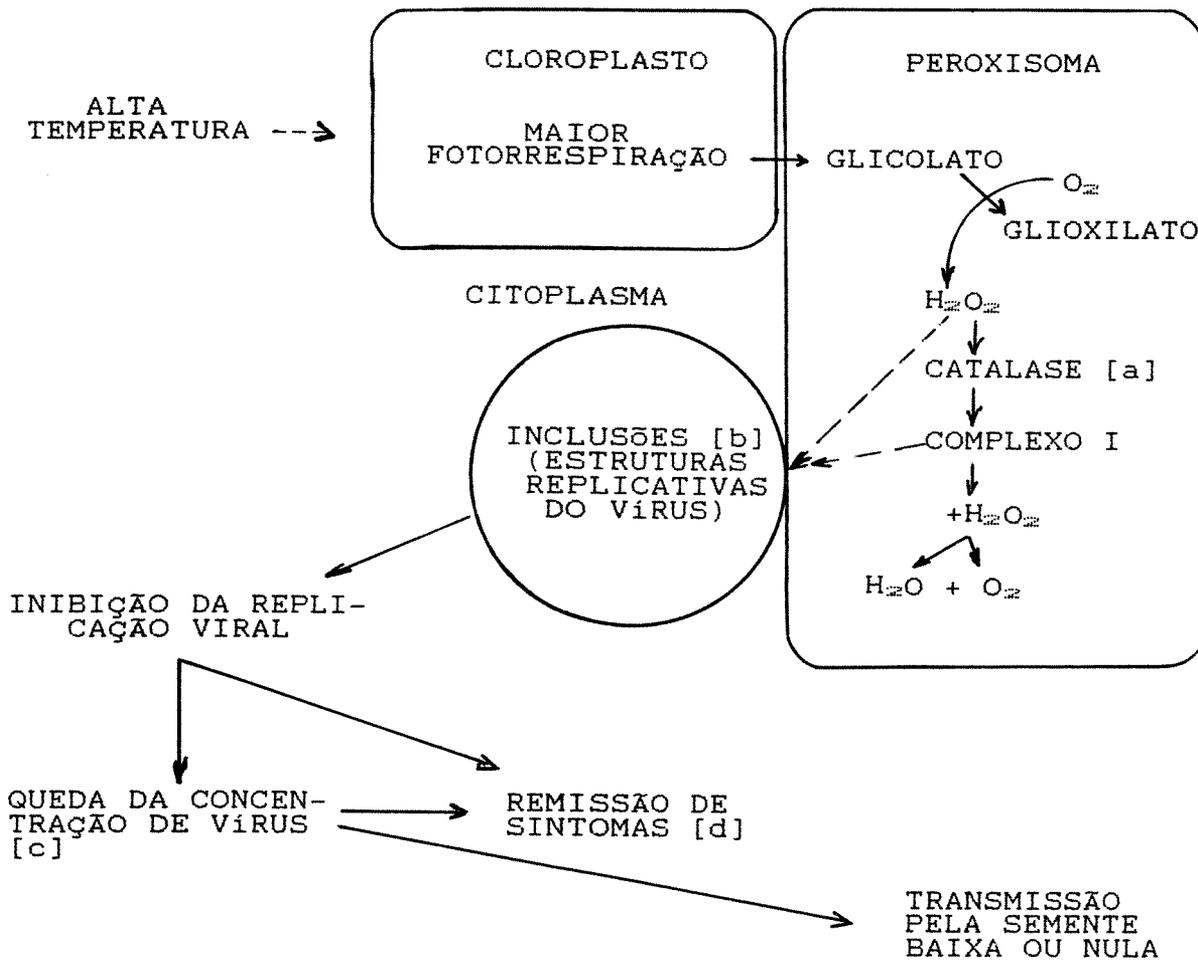


Figura 28. Esquema proposto para relacionar as características associadas à resistência da soja IAC-2 ao VMS. As letras entre colchetes correspondem às alterações demonstradas no presente trabalho: [a] aumento do nível de catalase, [b] associação entre inclusões e peroxisomas, [c] queda da concentração de vírus inversamente correlacionada ao nível de catalase e [d] remissão dos sintomas.

a ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase-oxigenase, é uma enzima bifuncional: ela realiza a carboxilação quando o CO_2 ocupa seu sitio ativo (reação 1 da figura 29), mas quando o ocupante é O_2 a reação será de oxigenação (reação 2). O oxigênio seria favorecido, nesta competição, pela sua maior solubilidade em alta temperatura resultando numa maior atividade do ciclo C2. O glicolato produzido no cloroplasto é metabolizado no peroxisoma pela glicolato oxidase (reação 3), que o transforma em ácido glioxílico. O resto do ciclo C2 é completado na mitocôndria, com a produção de CO_2 e serina. Esta última ingressa no ciclo C3 como 3-P-glicerato (figura 29). Por cada molécula de glicolato oxidada na reação (3) é produzida uma molécula de peróxido de hidrogênio. No peroxisoma há grande quantidade de catalase

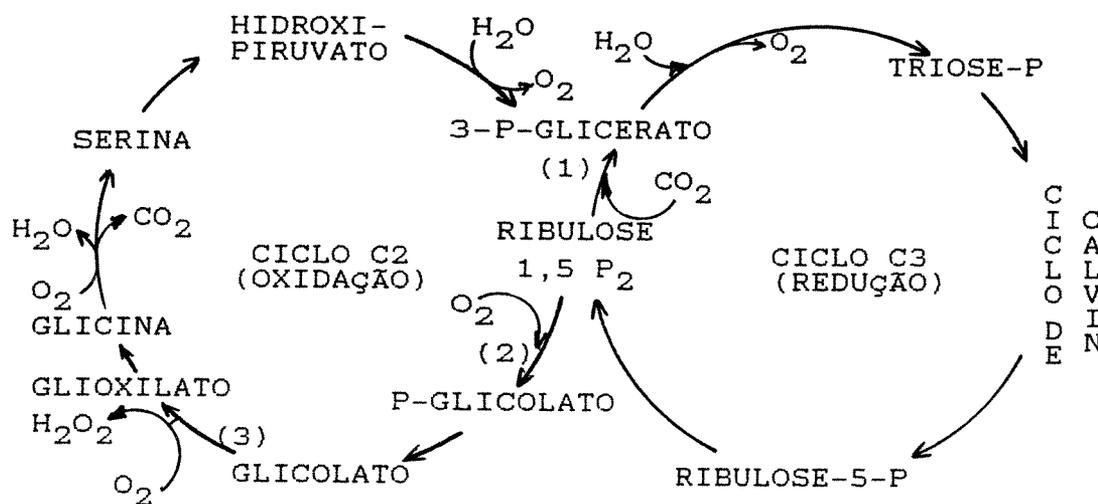
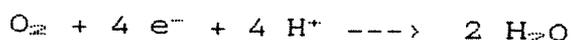


Figura 29. Representação esquemática da relação entre fotorrespiração (ciclo C2) e fotossíntese (ciclo C3), como proposto por LORIMER (1981). O ciclo C3 pode operar independentemente mas o C2 (fotorrespiração) é parasitário, pois depende da fotossíntese para regenerar o substrato ribulose 1,5-bisfosfato.

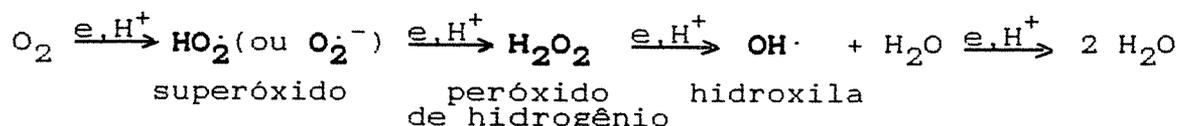
que neutraliza os efeitos deletérios do peróxido. O fato de que seja formado peróxido de hidrogênio (água oxigenada), uma das espécies ativas do oxigênio, indica que outras destas espécies podem também ser geradas neste processo (ELSTNER, 1982, DEL RÍO et al. 1983).

7.2. As espécies ativas de oxigênio e a defesa contra patógenos.

A produção de radicais de oxigênio de alta reatividade química, denominados espécies ativas de oxigênio (EAOs), é uma propriedade dos organismos aeróbicos que parece ser consequência inevitável do uso do oxigênio em processos bioenergéticos. As EAOs são formas intermediárias da redução do O_2 (dioxigênio) que finalmente formam água. No processo respiratório são evitadas as formas intermediárias pela ação da citocromo-oxidase, que força a reação numa única etapa envolvendo quatro elétrons:



Nas sucessivas reduções univalentes do dioxigênio aparecem as seguintes formas intermediárias, de alta reatividade (ELSTNER, 1982):



Estas EAOs, principalmente o radical hidroxila (OH^\cdot), podem causar sérios danos por oxidação na própria célula em razão da sua alta reatividade. O radical OH^\cdot reage praticamente com qualquer substância no local de formação. Estes danos são evitados por um sistema capaz de desativar as EAOs, do qual fazem parte a catalase, as peroxidases, a

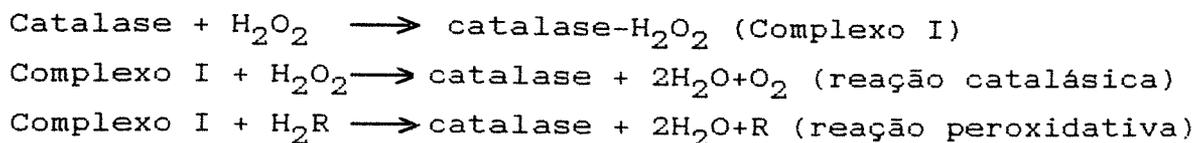
superóxido dismutase (SOD) e antioxidantes não enzimáticos como glutatona e ácido ascórbico (MENEHINI, 1987).

Em animais superiores tem sido bem demonstrado que as células utilizam o potencial deletério das EAOs para inativar patógenos, através de diversos mecanismos, como parte do sistema de defesa contra a infecções. As células fagocitárias do sangue matam os microorganismos, antes de fagocita-los, através da grande produção de EAOs, principalmente o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Nas pessoas que apresentam granulomatose crônica, as células fagocitárias não têm capacidade de produzir EAOs, mas realizam a fagocitose. Nestes casos ocorre agravamento dos processos inflamatórios, mostrando a importância das EAOs no sistema defensivo do organismo (MENEHINI, 1987).

Nos vegetais é conhecida a formação de EAOs em vários pontos do processo de captação de energia luminosa para a fotossíntese e também na fotorrespiração. As EAOs tem sido associadas aos danos de herbicidas, de poluentes atmosféricos (como SO_2) e de patógenos como fungos e vírus (ELSTNER, 1982). Quanto ao envolvimento das EAOs nas respostas de resistência a patógenos vegetais, ela já foi relatada por DOKE e colaboradores. O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), tem sido vinculado à resistência por hipersensibilidade à Phytophthora em batata (DOKE 1983). Mais recentemente a resistência ao vírus do mosaico do fumo por hipersensibilidade também foi associada à produção de $O_2^{\cdot-}$ em fumo portador do gene N (DOKE and OHASHI, 1988).

No esquema proposto na figura 28 a água oxigenada produzida reage com a catalase do peroxisoma formando o complexo I. Neste ponto aparece a primeira evidência experimental aqui apresentada para o esquema proposto: o aumento significativo da atividade catalásica por efeito da infecção viral ([a] na figura 28). Em condições de baixa temperatura este aumento só ocorre na variedade resistente IAC-2.

O complexo de catalase- H_2O_2 (complexo I) pode seguir o curso da reação catalásica em presença de mais H_2O_2 , liberando oxigênio e água, ou pode também reagir peroxidativamente:



Na reação peroxidativa podem ser oxidadas substâncias simples, como etanol, metanol ou mais complexas como 3,3'-diaminobenzidina (utilizada nos testes citoquímicos).

O contato dos peroxisomas com as inclusões virais é outro dado experimental [b] que é interpretado pelo esquema proposto na figura 28. Este contato favoreceria a possível ação das EAOs (H_2O_2 ou outras provavelmente derivadas do complexo I) sobre as inclusões virais (setas pontilhadas na figura 28). As inclusões citoplasmática lamelares estão aparentemente relacionadas com a replicação viral, como sugerido pela associação com ribosomas aqui descrita e pela literatura recente (DOUGHERTY and CARRINGTON, 1988). Portanto o contato das ICL com os peroxisomas, e a provável ação das EAOs, inibiria a replicação do vírus provocando a queda de concentração viral [c].

A menor replicação e conseqüente baixa concentração de vírus, levaria à diminuição dos sintomas como observado nos experimentos (fase [d] na fig. 28). Em termos gerais a soja IAC-2 tem mostrado que não é uma boa hospedeira par o vírus: ele não atinge altas concentrações, como as obsevasdas em Santa Rosa. Alem disto, a tendência é de queda da concentração viral, que ocorre mais rapidamente em alta temperatura (Figura 25). Provavelmente a baixa concentração de vírus

é responsável pela baixa transmissibilidade do vírus pela semente. Os tecidos meristemáticos que formam a flor são em geral mais dificilmente invadidos pelos vírus. É provável que a baixa concentração do vírus nos tecidos onde normalmente se replica ativamente dificulte ainda mais a invasão dos primórdios florais, e portanto dos tecidos esporogênicos, diminuindo ou eliminando a transmissão pela semente. É possível que este mesmo mecanismo explique a menor formação da mancha-café na soja IAC-2. Aparentemente esta mancha da semente se forma pela invasão da testa, durante a fase de primórdio. A baixa concentração de vírus dificultaria a invasão destes tecidos seminais, de maneira semelhante ao proposto para os tecidos esporogênicos.

O esquema proposto é consistente com os resultados aqui apresentados e, embora várias etapas sejam ainda especulativas, oferece uma forma de relação e seqüência lógicas para os fenômenos determinados experimentalmente.

7.3. Fotorrespiração e resistência à vírus.

A fotorrespiração é responsável pela perda de cerca de 25% do CO_2 fixado pela fotossíntese em plantas C3, com concentrações normais de O_2 e CO_2 no ar. Estas perdas podem ser muito maiores em condições de "stress" por alta intensidade luminosa ou por atmosfera com baixa concentração de CO_2 ou alta de O_2 (TOLBERT, 1980b). Isto significa que as taxas máximas das atividades carboxilase:oxygenase está entre 3:1 e 4:1, ou seja que por cada 3 ou 4 CO_2 fixados (ciclo C3 fig. 29) é formada uma molécula de glicolato (LORIMER, 1981). O glicolato é oxidado pela glicolato oxidase gerando H_2O_2 em quantidades equimoleculares. Portanto, se um valor típico de planta C3 é a produção de

30-40 $\mu\text{M}/\text{mg}$ clorofila/h de glicolato (LORIMER, 1981), são também produzidos 30-40 $\mu\text{M}/\text{mg}$ clorofila/h de água oxigenada. A disponibilidade de peróxido de hidrogênio é um dado importante pois é uma EAO intermediária que pode gerar espécies mais agressivas como o radical hidroxila (OH^{\bullet}) (ELSTNER, 1982). Presumivelmente, o potencial deletério da relativamente alta produção de H_2O_2 nas células onde a fotorrespiração é mais ativa, poderia prejudicar o processo de replicação viral, de maneira semelhante ao que acontece nas células fagocitárias humanas, num outro nível (MENEHINI, 1987).

A presença dentro do peroxisoma da catalase, e de outras enzimas que desativam as EAOs (DEL RÍO *et al.* 1983), evita danos à célula por oxidação. Isto também limita as possibilidades de utilizar as EAOs para inativar o patógenos. Uma alternativa para superar esta limitação seria que, de alguma maneira, seja estimulada a associação entre peroxisomas e inclusões citoplasmáticas induzidas pelo vírus. Além do contato entre ICL e peroxisomas, ocorre também fragmentação destes o que permite uma maior relação superfície/volume, facilitando o contato ou a difusão de EAOs do interior do peroxisoma. Deste modo as inclusões virais seriam mais facilmente oxidadas pelas EAOs, o que resultaria numa menor produção de vírus.

No presente estudo há duas evidências que sugerem o envolvimento de EAOs geradas no peroxisoma no tipo de resistência estudado. A primeira é a associação das inclusões citoplasmáticas com peroxisomas, organela que além do peróxido de hidrogênio, muito provavelmente produz outras EAOs, como o superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (DEL RÍO *et al.* 1983). A segunda evidência é o aumento de atividade catalásica associado à infecção pelo vírus, que pode ser interpretado como indicativo de maior produção de H_2O_2 . O aumento da

catalase provavelmente depende de uma maior atividade fotorrespiratória, que implica uma maior produção de peróxido de hidrogênio e presumivelmente outras EAOs.

Os resultados apresentados sugerem a idéia de que o incremento da atividade catalásica está, de alguma maneira, relacionado com a queda de concentração viral. Isto é sugerido principalmente pela significativa correlação inversa encontrada entre esta atividade e o conteúdo de vírus. O fato de ter-se verificado que esta correlação só existe (é significativa) em alta temperatura indica que este fator ambiental afeta de alguma maneira a relação entre as duas variáveis. A condição de alta temperatura parece ativar um mecanismo que liga o aumento da atividade da catalase com a queda da concentração viral. Possivelmente o mecanismo que liga estes dois fenômenos é o aumento de atividade fotorrespiratória, como proposto no esquema da figura 28.

É concebível que uma maior quantidade de EAOs disponíveis, em função do aumento da fotorrespiração, facilitaria sua utilização no sistema defensivo da planta, aumentando sua eficiência e acelerando o processo de recuperação.

Na variedade resistente IAC-2 há aumento no nível de atividade da catalase por efeito da infecção pelo VMS, da ordem de duas a três vezes, independentemente da temperatura ambiente (Figura 24). Diferentemente, na variedade suscetível Santa Rosa não houve aumento da catalase associado à infecção viral em temperatura relativamente baixa (20-24°C), e em condições de temperatura alta (30-34°C) o aumento foi da ordem de 30-60% (Figura 23).

Aceitando que a atividade da catalase representa também uma avaliação da atividade generativa de EAOs, estes resultados sustentariam a hipótese de que, ao menos neste aspecto, a diferença entre as duas variedades examinadas reside na

capacidade de aumentar produção de EAOs em resposta à infecção, mesmo em condições de temperatura mais baixa.

A influência da temperatura no processo de recuperação da planta resistente, acompanhado da queda de concentração viral, pode estar associada a variações da atividade fotor-respiratória.

7.4. Provável papel da catalase peroxisomal no mecanismo de resistência.

Um ponto não explicado da composição dos peroxisomas é o alto conteúdo de catalase, que representa de 10 a 25% total de proteína desta organela. A atividade desta enzima in vitro é de 1.000 a 10.000 vezes maior que a da glicolato oxidase, a enzima responsável pela liberação do peróxido de hidrogênio, substrato da catalase (HUANG et al. 1983, TOLBERT, 1980a). Embora não haja dados sobre a concentração de água oxigenada in vivo, parece haver um grande excesso de atividade catalásica sobre a capacidade de produção de H_2O_2 . Geralmente é assumido que o excesso de atividade catalásica garantiria a completa destruição do H_2O_2 , imediatamente após produzido. Outra possibilidade que não tem sido considerada, e que merece ser investigada, é que o excesso de catalase tenha por finalidade acumular H_2O_2 na forma de complexo I, que poderia ser utilizado em outros processos, entre eles no mecanismo de defesa contra patógenos ao nível celular. Esta interpretação permitiria explicar a grande quantidade de catalase presente nos peroxisomas, e também seu aumento em soja resistente IAC-2 em resposta à infecção pelo VMS.

Vários aspectos deveriam ser esclarecidos para que esta hipótese seja comprovada. O primeiro seria estabelecer se em

condições de baixa concentração de H_2O_2 , como parece acontecer in vivo, o complexo I é estável o suficiente para funcionar como um compartimento celular.

Outro assunto a ser esclarecido é se o complexo I pode oxidar, através de uma reação peroxidativa, diretamente o patógeno, ou algum componente do seu ciclo celular. Outra possibilidade seria que o complexo I funcione como um reservatório de EAOs, para serem liberadas de acordo com as necessidades. Neste mecanismo poderia estar envolvida uma reação do tipo Fenton, como relatado para as lesões causadas pelo H_2O_2 no DNA nuclear (ELSTNER, 1982, MENEHINI, 1987). Na reação tipo Fenton é gerado o radical hidroxila (OH^*), a mais reativa das EAOs, a partir de H_2O_2 em presença de Fe^{+2} . A catalase é uma hemoproteína, cujo grupo prostético heme é um complexo que inclui o íon férrico (FRUTON and SIMMONDS, 1958). Provavelmente a partir do complexo I formado pela catalase mais H_2O_2 possa ser gerado através de uma reação similar à Fenton, mas de maneira controlada, o ânion hidroxila e/ou outras EAOs, que podem danificar o RNA viral, genômico ou suas formas replicativas intermediárias.

Até o presente a fotorrespiração tem sido interpretada como um processo inevitável numa atmosfera que contém mais oxigênio que dióxido de carbono, e dadas as peculiaridades da enzima central da fotossíntese: a ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase-oxigenase (LORIMER, 1981). Embora este processo consuma boa parte do produto da fotossíntese, não tem sido dada explicação razoável da sua função na planta, fora a de evitar os danos por foto-oxidação e possivelmente a regulação do nível de CO_2 atmosférico (TOLBERT, 1980b). Uma possível função adicional da fotorrespiração seria a de fornecer formas ativas de oxigênio para o sistema defensivo da planta. Neste caso, por ser a atividade fotorrespiratória de

alto custo energético, deveria estar submetida a um eficiente mecanismo de controle provavelmente ativado pela entrada do patógeno.

Os mecanismos propostos são consistentes com os dados disponíveis, no caso de soja infectada com VMS, mas é possível que estes não sejam generalizáveis para outros tipos de resistência a outros vírus. Por exemplo no caso da resistência ao vírus do mosaico do fumo por hipersensibilidade em fumo, relatado por DOKE e OHASHI (1988), a capacidade de gerar superóxido ($O_2^{\cdot -}$) desaparece a temperaturas acima de 28°C. Aparentemente neste caso não estaria envolvida a fotorrespiração, que é mais ativa a altas temperaturas, mas outro sistema gerador de EAOs.

8 . CONCLUSÕES

1. A resistência ao vírus do mosaico da soja na variedade IAC-2 se manifesta como forte limitação à replicação do vírus nos tecidos foliares. A distribuição do vírus é provavelmente afetada como consequência da menor concentração viral.
2. A limitação da replicação viral é maior em condições de alta temperatura, que consequentemente induzem a queda mais rápida de concentração de vírus e aceleram a remissão dos sintomas.
3. A queda de concentração viral em alta temperatura está correlacionada com o aumento da atividade catalásica.
4. A variedade resistente IAC-2 tem a capacidade de reagir à infecção com incremento da atividade catalásica mesmo em condições de baixa temperatura. Esta característica a diferencia da variedade suscetível Santa Rosa.

5. O efeito da alta temperatura na variedade resistente é observado principalmente no aumento de atividade da catalase nas áreas verde-claras do mosaico.
6. O aumento da atividade da catalase peroxisomal e a associação das inclusões induzidas pelo VMS com os peroxisomas, correlacionado com a queda da concentração viral na soja resistente, sugere o envolvimento da fotorrespiração e de formas tóxicas de oxigênio no mecanismo de resistência.
7. O mecanismo de resistência ao VMS da variedade IAC-2 é de interesse para o melhoramento, sendo possível sua detecção através de alguma das características da planta infectada. A testagem na combinação com resistência por hipersensibilidade depende ainda da descoberta de um indicador na planta sadia, pois é um mecanismo ativado pelo patógeno.

9. LITERATURA CITADA.

- ALI, M.A. 1950. Genetics of resistance to the common beanmosaic virus (Bean virus 1) in the bean (Phaseolus vulgaris L.). Phytopathology 40:69-79.
- ATABEKOV, J.G. and DOROKHOV, YU.L. 1984. Plant specific transport function and resistance of plants to viruses. Adv. Virus Res. 29:313-364
- ATKINSON, P.H. and MATTHEWS, R.E.F. 1970. On the origin of dark green tissue in tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. Virology 40:344-356.
- BEACHI, R.N. and MURAKISHI, H.H. 1971. Local lesions formation in tobacco tissue culture. Phytopathology 61:877-878
- BEIER, H., BRUENING, G., RUSSELL, M.L. and TUCKER, L. 1979. Replication of cowpea mosaic virus in protoplasts isolated from immune lines of cowpeas. Virology 95:165-175.

- BIANCHINI, A. e COSTA, A.S. 1981. Dois tipos de resistência em variedades de feijoeiro ao vírus do mosaico comum da soja. Fitopatol. Bras. 6:527.
- BRANDES, J. and WETTER, C. 1959. Classification of elongated plant viruses on the basis of their particle morphology. Virology 8:99-115.
- BUONAURO, R., DELLA TORRE, G. and MONTALBINI, P. 1987. Soluble superoxide dismutase (SOD) in susceptible and resistant host-parasite complexes of Phaseolus vulgaris and Uromyces phaseoli. Physiol. and Mol. Plant Pathol. 31:173-184.
- CARRINGTON, J.C. and DOUGHERTY, W.G. 1987. Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease. J. Virol. 61:240-248.
- CHO, E.K. and GOODMAN, R.M. 1979. Strains of soybean mosaic virus. Classification based on virulence in resistant soybean cultivars. Phytopathology 69:467-470.
- COOPER, J.I. and JONES, A.T. 1983. Responses of plants to viruses: Proposal for the use of terms Phytopathology 73:127-128.
- COSTA, A.S. 1977. Investigações sobre moléstias da soja no estado de São Paulo. Summa Phytopathologica 3:3-30

- COSTA, A.S. 1987. Fitoviroses do feijoeiro no Brasil. In Bulisani, E.A. (editor) Feijão: fatores de produção e qualidade. Fundação Cargill. Campinas. pp. 173-256.
- COSTA, A.S. e MIRANDA, M.A.C., 1987. IAC- e IAC-11 variedades de soja resistentes (hipersensíveis) ao vírus do mosaico comum. Summa Phytopathol. 13:24 (resumo).
- COSTA, A.S. e MULLER, G.W., 1982, General evaluation of the impact of virus diseases of economic crops on the development of Latin American countries. Proc. 1st. International Conference on the impact of viral diseases on the development of Latin American countries and the Caribbean region. Vol. I, Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, pp. 216-230.
- COSTA, A.S., MIRANDA, M.A.C. e MASCARENHAS, H.A.A. 1981. Reação de algumas cultivares de soja em estudo no Instituto Agronômico ao vírus do mosaico comum. Anais do II Seminário Nacional de Pesquisa em Soja. CNPSo, EMBRAPA, Vol.II, pp.262-264.
- DEL RÍO, L.A., LYON, D.S., OLAH, I., GLICK, B. and SALIM, M.L. 1983. Immunocytochemical evidence for a peroxisomal localization of manganese superoxide dismutase in leaf protoplasts from a higher plant. Planta 158:216-224.
- DEMEY, J. 1984. Coloidal gold as a marker and tracer in light and electron microscopy. Electr. Micr. Soc. of America Bulletin 14:54-66.

- DERRICK, K.S. and BRLANSKY, R.H. 1976. Assay for viruses and mycoplasmas using serologically specific electron microscopy. Phytopathology 66:815-820.
- DOKE, N. 1983. Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. Physiol. Plant Pathol. 23:359-367.
- DOKE, N. and OHASHI, Y. 1988. involvement of an O_2^- generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. Physiol. and Mol. Plant Pathol. 32:163-172.
- DOUGHERTY W.G. and CARRINGTON J.C. 1988. Expression and functions of potyviral gene products. Ann. Rev. Phytopathol. 26::123-143.
- DOUGHERTY, W.G. and HIEBERT, E., 1980a, Translation of potyvirus RNA in a rabbit reticulocyte lysate: Reaction conditions and identification of capsid protein as one of the products of in vitro translation of tobacco etch and pepper mottle viral RNAs, Virology 101:466-474.
- DOUGHERTY, W.G. and HIEBERT, E., 1980b, Translation of potyvirus RNA in a rabbit reticulocyte lysate: Identification of nuclear inclusion proteins as products of tobacco etch virus RNA translation and cylindrical inclusion protein as a product of the potyvirus genome, Virology 104:174-182.

- DOUGHERTY, W.G. and HIEBERT, E., 1980c, Translation of potyvirus RNA in a rabbit reticulocyte lysate: Cell-free translation strategy and a genetic map of the potyviral genome, Virology 104:183-194.
- EDWARDSON, J.R. 1974, Some properties of the potato virus Y-group. Fla. Exp. Sta. Monogr. Ser. No. 4, 398 pp.
- ELSTNER, E.F., 1982. Oxygen activation and oxygen toxicity. Annu. Rev. of Plant Physiol. 33:79-96.
- FARKAS, G.L. 1978. Senescence and plant disease. In J. G. Horsfall and E.B. Cowling (eds.), Plant Disease. Vol 3. Academic Press, New York, pp. 391-412.
- FARKAS G.L. and STAHMANN, M.A., 1966. On the nature of changes in peroxidase isozymes in bean leaves infected with southern bean mosaic virus. Phytopathology 56:669-677.
- FRANCKI, R.I.B., MILNE, R.G., and HATTA, T., 1985. Atlas of plant viruses, Vol. II, CRC Press, Boca Raton, FL, 284 pp.
- FRUTON, J.D. and SIMMONS, S. 1958. General Biochemistry. Wiley, New York, 1077 pp.
- GOODMAN, R. N., KIRALY, Z. and WOOD, K.R. 1986. The biochemistry and physiology of plant disease. University of Missouri Press, Columbia, U.S.A., 433 pp.

- HARRISON, B.D., FINCH, J.T., GIBBS, A.J., HOLLINGS, M., SHEPHERD, R.J., VALENTA, V. AND WITTER, C. 1971. Sixteen groups of plant viruses. Virology 45:356-363.
- HOLLINGS, M. and BRUNT, A.A. 1981, Potyviruses. In K. Kurstak (ed.), Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp.731-807.
- HUANG, A.H.C., TRELEASE, R.N. and MOORE, T.S. 1983. Plant peroxisomes. Academic press, New York, 252 pp.
- HUBER, R., REZELMAN, G., HIBI, T. and VAN KAMEN, A. 1977. Cowpea mosaic virus infection of protoplasts from Samsun tobacco leaves. J. Gen. Virol. 34:315-323.
- HULL, R. 1989. The movement of viruses in plants. Annu. Rev. Phytopathol. 27:213-240.
- KARNOVSKY, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 27:137A.
- KASSANIS, B., 1981, Some speculations on the nature of the natural defence mechanism of plants against virus infection. Phytopath. Z., 102 277-291.
- KIMURA, I. 1962. Further studies on rice dwarf virus. Ann. Phytopath. Soc. (Japan) 27:197-203 (citado em MATTHEWS, 1981).
- KITAJIMA E.W. and LAURITIS, J.A. 1969. Plant virions in plasmodesmata. Virology 37:681-683.

- LORIMER, G. H. 1981. The carboxylation and oxygenation of ribulose 1,5-bisphosphate: the primary events in photosynthesis and photorespiration. Annu. Rev. Plant Physiol. 32:349-383.
- LUCK, H. 1965. Catalase. In H.U. Bergmeyer (ed.) Methods of enzymatic analysis. Verlag Chemie/Academic Press, Weinheim/ New York, pp. 885-894.
- LURIA, S.E., DARNELL, J.E. Jr., BALTIMORE, D. and CAMPBELL, A. 1978. General virology, 3rd edition, John Wiley, New York, 578 pp.
- MATSUOKA, S., 1982, Impact of sugar mosaic virus on past sugar industry and future perspectives for Latin America. Proc. 1st. International Conference on the impact of viral diseases on the development of Latin American countries and the Caribbean region. Vol. I, Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, pp. 241-258.
- MATTHEWS, R.E.F., 1981. Plant Virology. Academic Press. New York. 897 pp.
- MATTHEWS, R.E.F., 1982. Classification and nomenclature of viruses, Intervirology 17:1-199.
- MAURY, Y. 1985. Soybean mosaic virus. In R. Shibles, (Ed.) World Soybean Research Conference III Proceedings. Westview Press, Boulder, U.S.A.. p. 507-514.

- VAN HUYSTEE, R.B. 1987. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. Annu. Rev. Plant Physiol. 38:205-219.
- VAN LOON, L.C., 1983. Mechanisms of resistance in virus-infected plants. In Bailey J.A. & Deverall B.J. (editores), The dynamics of host defence. Academic Press, New York, pp. 123-190.
- VEGA, J. 1985. Associação entre peroxisomas e inclusões citoplasmáticas induzidas pelo vírus do mosaico comum da soja. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, SP.
- VEGA, J. e COSTA, A.S. 1986. Mosaico comum da soja: efeito da temperatura sobre concentração de vírus, intensidade de sintomas e atividade catalásica. Fitopatologia Bras. 11:365 (resumo).
- VEGA, J., ALMEIDA, A.M.R. e COSTA, A.S. 1981. Organismos tipo micoplasma associados ao superbrotamento do picão. Fitopatol. Bras. 6:29-33.
- VENABLE, J. and COGGESHALL, R. 1965. The use of a simple lead citrate stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 25:407-408.
- WANG, H.-L., YEH, S.-D., CHIU, R.-J. and GONSALVES, D. 1987. Effectiveness of cross-protection by mild mutants of papaya ringspot virus for control of ringspot disease of papaya in Taiwan. Plant Disease 71:491-497.

YEH, S.-D., GONSALVES, D., WANG, H.-L., NAMBA, R. and CHIU, R.-J. 1988. Control of papaya ringspot virus by cross protection. Plant Disease 72:375-380.

ZEITLIN M. and R. HULL. 1987. Plant virus-host interactions. Ann. Rev. Plant Physiol. 38:291-315.

ZELITCH, I. 1971. Photosynthesis, photorespiration and plant productivity, Academic Press, New York, 337 p.