

CIBELE MARLI CAÇÃO PAIVA GOUVÊA (x)



EFEITO DE DOIS VÍRUS SOBRE PEPINO E TOMATE: ESTUDOS ATRAVÉS DE ELETROFORESE E DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

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

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) CIBELE MARLI PAIVA GOUVÊA e aprovada pela Comissão Julgadora.

Orientadores

Prof Dr. Cândido Pereira Pinto Ricardo (mt)
Centro de Tecnologia Química e Biológica
Oeiras, Portugal

Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira (x)
Departamento de Bioquímica
Universidade Estadual de Campinas

CAMPINAS - SP

1993



A JÚLIO, JULIANA, CAMILA

VALTER e ZÉLIA,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior (CAPES) pelo apoio financeiro recebido, sem o qual esse trabalho não teria sido viabilizado.

Ao Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira, exemplo de pesquisador, pela amizade, apoio, orientação desde o primeiro ano de Universidade, pela excepcional contribuição em minha formação profissional e por ter conseguido meu estágio em Portugal.

Ao Prof. Dr. Cândido Pereira Pinto Ricardo pela atenção, apoio e valiosa orientação durante a realização desse trabalho em seu laboratório de Bioquímica Vegetal (Oeiras, Portugal).

À Prof. Dra. Helena Santos pela atenção, apoio e pelos ensinamentos de RMN.

Ao Prof. Dr. António Xavier, Diretor do Centro de Tecnologia Química e Biológica (Oeiras, Portugal), pela oportunidade da realização desse trabalho no CTQB.

Ao Prof. Dr. Óscar Sequeira pela atenção, apoio e gentileza no fornecimento dos vírus utilizados neste trabalho.

Ao Eng. Fernando Matos pela atenção, apoio e orientação técnica na utilização do RMN.

Ao Prof. Ladaslav Sodek pela ajuda na interpretação dos resultados, pela análise prévia e sugestões sobre a tese.

Aos Profs. Drs. Darcy Martins da Silva, Álvaro do Santos Costa, Jorge Vega e Luís Gonzaga Santoro pelo exame prévio do manuscrito e sugestões sobre a tese.

À Prof. Dra. Eliane Martins, coordenadora do curso de pós-graduação em Biologia Vegetal, pela atenção e auxílio nos tramites burocráticos.

À Cristina Umino pelas fotos e slides.

Aos amigos Maria de Paula Silva, Philip Jackson, Ana Cristina Vaz, Júlia Costa, Paula Cristina Ramos, Ana Paula Regalado e Margarida Teixeira pela amizade, apoio, técnicas, discussões e feliz convivência durante a estadia em Portugal.

À minha família pelo apoio e constante estímulo, sem os quais este trabalho não teria sido realizado.

ÍNDICE

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
ABREVIATURAS.....	iii
<hr/>	
1.Introdução.....	1
2.Revisão da literatura.....	2
3.Materiais e métodos.....	11
3.1.Análise de proteínas.....	11
3.2.Estudos de ressonância magnética nuclear.....	40
4.Resultados e discussão.....	45
4.1.Análise de proteínas.....	45
4.2.Ressonância magnética nuclear.....	77
5.Conclusões.....	97
6.Bibliografia.....	98

RESUMO

Foram analisadas alterações nos padrões de proteínas e compostos de fósforo e carbono em folhas de pepino e tomate infectadas pelos vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA) e do mosaico do pepino (VMP), através de eletroforese e ressonância magnética nuclear (RMN).

As extrações de proteínas foram feitas 48 h e aos 5, 10, 15 e 20 dias após a inoculação dos vírus. Foi detectado aparecimento de proteína com PM 39.000 Da na fração microssomal de pepino com VMAA e de tomate com VMP. Foi observado que a infecção de pepino e tomate por TMV não induz aparecimento dessa proteína na fração microssomal.

A metodologia utilizada para caracterização parcial revelou que a proteína de PM 39.000 Da não é glicosilada, é uma proteína periférica das membranas microssomais, não está presente no fluido intercelular e na parede celular. A eletroforese bidimensional mostrou que a proteína acumulada em pepino e tomate possui a mesma carga elétrica e o mesmo número de isoformas. Assim, é possível que esta seja uma proteína relacionada ao processo de patogênese (proteína PR) e seu aparecimento reflete alterações no metabolismo da planta hospedeira. Foi ainda observado aumento de atividade peroxidásica nas plantas infectadas.

Através dos estudos de RMN foi observado acúmulo de sacarose, diminuição de açúcares fosfato e aumento de fosfato inorgânico nas folhas infectadas. Isto indica uma provável alteração no metabolismo de carboidratos, devido à infecção virótica. Foi, ainda, detectado aumento de glicolato em pepino infectado sugerindo uma possível interferência do processo infeccioso sobre a atividade de oxigenase da ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase-oxigenase. Nos tomateiros infectados foi observado aumento de compostos aromáticos.

ABSTRACT

The changes in the leaf protein pattern, phosphorus and carbon compounds from cucumber and tomato infected with zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) and cucumber mosaic virus (CMV) were analysed by gel electrophoresis and nuclear magnetic resonance (NMR).

The leaf proteins were extracted 48 hr and 5, 10, 15 and 20 days after virus inoculation. A MW 39,000 Da protein was induced in the microsomal fraction from cucumber infected with ZYMV and tomato with CMV.

The partial characterization of the MW 39,000 Da revealed that it was not glycoprotein, but a peripheral protein from microsomal membranes and not present in the intercellular fluid and cell wall. The bidimensional electrophoresis analysis revealed the same characteristics of the protein induced in both infected plants. Thus, is possible that the protein is a pathogenesis related (PR protein) and its accumulation in infected plants reflects changes in host plant metabolism.

The NMR studies showed sucrose accumulation, sugar phosphate decrease and inorganic phosphate increase. These findings indicate a probable change in host plant carbohydrate metabolism. An increase was observed in glycolate level in infected cucumber. It suggests a change on Rubisco oxygenase activity. An increase was detected in aromatic compounds in infected tomato plants

ABREVIATURAS

BCIP: 5-bromo 4-cloroindoxil fosfato

BSA: albumina de soro bovino

Da: dalton

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilenodiamino tetracético

MES: ácido 2N-morfolino-etano sulfônico

MHz: mega Hertz

NBT: azul de tetrazolium

PMSF: fluoreto de p-metil sulfóxido

PVDF: fluoreto de polivinilideno

PVPP: polivinil polipirrolidona

RMN: ressonância magnética nuclear

SDS: dodecil sulfato de sódio

T: tesla

TCA: ácido tricloro acético

TEMED: N,N,N',N' tetrametil etileno diamina

TMV: vírus do mosaico do fumo

TRIS: triidróxi metil animo metano

VMAA: vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita

VMP: vírus do mosaico do pepino

1. INTRODUÇÃO

Os processos de patogênese, em geral, induzem respostas específicas aos patógenos e alterações metabólicas características em plantas infectadas. Algumas das respostas observadas no hospedeiro decorrem da incompatibilidade com o agente patogênico seja ele fungo, bactéria, vírus ou nematóide.

As infecções por vírus causam muitas moléstias de importância econômica e provocam alterações no metabolismo da planta infectada, especialmente ao nível protéico, levando ao aparecimento ou acúmulo de proteínas induzidas pelo processo de patogênese ("pathogenesis related proteins", proteínas PR). As alterações dos perfis proteicos têm sido estudadas por técnicas de eletroforese e metodologias auxiliares que permitem a caracterização de proteínas.

A ressonância magnética nuclear (RMN) tem sido utilizada nos estudos de fisiologia e bioquímica vegetal, uma vez que permite observações diretas dos processos metabólicos em curso. Contudo não há ainda citação da utilização desta técnica em fitopatologia. Esta foi a primeira vez que aplicou-se RMN para estudos de fitovirologia.

No Brasil têm sido utilizadas uma ampla gama de metodologias para os estudos de fitoviroses, porém, não há relatos sobre análise de proteínas PR e sobre a utilização de RMN para estudos de processos patogênicos em geral e em particular de fitovirologia.

Assim o presente trabalho teve como objetivo verificar as alterações nos padrões de proteínas e compostos de fósforo e carbono em folhas de pepino e tomate infectadas pelos vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA) e do mosaico do pepino (VMP), através de eletroforese e ressonância magnética nuclear.

2.REVISÃO DA LITERATURA

Nas interações patógeno hospedeiro ocorrem, frequentemente, reações específicas do hospedeiro em resposta ao agente patogênico. Em muitos casos as reações de incompatibilidade frente a patógenos como fungos, bactérias, vírus e nematóides são expressas de modo geral, ocorrendo alterações fisiológicas, morfológicas e metabólicas nas plantas afetadas (GOODMAN *et al.*, 1986; BOWLES, 1990).

Numerosos vírus fitopatogênicos, que afetam diversas espécies de plantas, levam a modificações no metabolismo do hospedeiro, causando danos economicamente importantes.

O vírus do mosaico do pepino (VMP, "cucumber mosaic virus"), descrito pela primeira vez por DOOLITTLE (1916), tem sido identificado em ampla gama de hospedeiros, sobretudo em culturas hortícolas de cucurbitáceas e solanáceas (FRANCKI *et al.*, 1979).

O VMP, é o vírus tipo do grupo Cucumovirus (FRANCKI *et al.*, 1979), apresenta partículas isodiamétricas com 28-30 nm de diâmetro. A partícula viral é um icosaedro formado por grupos hexaméricos e pentaméricos de subunidades proteicas. O genoma é composto por 3 RNAs de fita simples (Tricornavirus), indispensáveis para ocorrência da infecção, podendo ainda apresentar RNAs satélites, determinantes da severidade da doença, que pode variar desde a ausência de sintomas até a morte da planta. Os principais sintomas da virose são mosaico, deformação foliar, nanismo e necrose. O vírus pode ser transmitido de forma não persistente por mais de 60 espécies de afídeos, por cuscuta, enxertia e inoculação mecânica (FRANCHI *et al.*, 1979; WATERWORTH *et al.*, 1979; COSTA *et al.*, 1987).

O VMP tem sido assinalado em vários países da Europa, África, Ásia e América, especialmente em regiões temperadas (FRANCKI *et al.*, 1979). No Brasil há inúmeras ocorrências de VMP em várias culturas incluindo alface, banana, baunilha, caupi, ervilha, *Euphorbia prostata*, feijão, feijão lima, maracujá, maxixe, melão milho, orquídea, pimenta-do-reino, salvia, tomate além de outras (KITAJIMA, 1986; DUSI *et al.*, 1992).

O vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA, "zucchini yellow mosaic virus") foi observado pela primeira vez em 1973 no norte da Itália, sendo descrito posteriormente no mesmo país por LISA *et al.*, (1981). É transmitido de forma não persistente por afídeos, inoculação mecânica e enxertia. Membro do grupo Potyvirus (LISA *et al.*, 1981), o VMAA apresenta partículas alongadas e flexuosas com comprimento normal de 750 nm e genoma constituído por RNA de fita simples (LISA *et al.*, 1981).

Desde sua descrição o VMAA tem sido detectado em vários países da Europa, Oriente Médio, Ásia, África, América do Norte e Austrália onde causa mosaico, amarelecimento, clorose seguida de necrose, deformação e enrolamento das folhas, engrossamento do caule, atrofia, malformação e distorção das flores, frutos e sementes (LISA & LECOQ, 1984; PROVVIDENTI *et al.*, 1984; HSEU *et al.*, 1985; DAVIS, 1986; GREBER *et al.*, 1987; AL-MUSA, 1979; HUANG *et al.*, 1989). No Brasil o primeiro relato da ocorrência de VMAA foi feito por VEGA *et al.*, (1992) em melancia proveniente de Votuporanga, no estado de São Paulo.

A infecção virótica é normalmente estabelecida após a inoculação do vírus (mecânica ou por vetor) na planta. O fato das partículas virais atingirem o espaço intercelular não garante que a infecção seja eficiente, pois a parede celular constitui uma barreira à penetração dos vírus. As partículas virais não possuem enzimas que degradam a parede celular, no entanto, alterações desta e de várias membranas intercelulares, incluindo das organelas microssomais, são frequentemente observadas em plantas infectadas por vírus (MARTELLI, 1980). As alterações

induzidas na parede celular, pela infecção virótica, incluem acúmulo de proteínas e glicoproteínas, aumento de lignificação e deposição de substâncias pécticas, que atuam evitando a penetração celular dos vírus e a disseminação destes pela planta (GOODMAN *et al.*, 1986).

O mecanismo de especificidade da interação planta/vírus não é conhecido, contudo há evidências do envolvimento de glicoproteínas nesse processo. Embora as evidências para o reconhecimento do vírus pela célula vegetal não sejam substantivos, as glicoproteínas vegetais e do capsídeo viral teriam um papel fundamental nesse processo.

Em muitas plantas infectadas por vírus têm sido detectadas alterações do padrão protéico das folhas e, geralmente, o aparecimento de proteínas induzidas pelo processo de patogênese ("pathogenesis related proteins", proteínas PR) é mencionado (GIANINAZZI *et al.*, 1970; VAN LOON & VAN KAMEN, 1970; VAN LOON, 1985; BOWLES, 1990).

As proteínas relacionadas aos processos de patogênese foram primeiramente detectadas em folhas de fumo com reação de hipersensibilidade ao vírus do mosaico do fumo ("tobacco mosaic virus", TMV) (GIANINAZZI, 1970; VAN LOON & VAN KAMEN, 1970) e têm sido agora encontradas em inúmeras espécies de plantas sob ação de fitopatógenos ou de estímulos químicos e ambientais (GIANINAZZI *et al.*, 1980; AHL *et al.*, 1981; GIANINAZZI & KASSANIS, 1974; WHITE, 1979; VAN LOON, 1977; FRASER, 1981; ANTONIW *et al.*, 1981; VAN LOON, 1985; BOWLES, 1990). Essas proteínas foram também encontradas no fluido intercelular de plantas infectadas (PARENT & ASSELIN, 1984; CARR *et al.*, 1987) e têm sido relacionadas à defesa das plantas (KAUFFMAN *et al.*, 1989; BOWLES, 1990). Segundo PARENT & ASSELIN (1984) e BOWLES (1990) a presença dessas proteínas indica alterações no metabolismo do hospedeiro, em resposta à infecção.

Outras alterações celulares decorrem da infecção viral especialmente em função da severidade dos sintomas. O aumento da atividade peroxidásica tem sido verificado, após a infecção de plantas por vírus. Isto ocorre tanto em tecidos resistentes como suscetíveis. (MISAGHI, 1982).

As peroxidases são enzimas que catalizam a oxidação de numerosos compostos, participando da biossíntese de etileno, oxidação do ácido indol acético e de compostos aromáticos. Estão presentes no fluido intercelular e em vários compartimentos celulares, incluindo núcleo, mitocôndria, ribossomo, parede celular e membranas (MISAGHI, 1982). Estão, ainda envolvidas nos processos de aquisição de resistência à infecção viral, através do aumento da lignificação da parede celular (HOLDEN & ROHRINGER, 1985) e na defesa das plantas através da oxidação de fenóis (BOWLES, 1990). Em geral a estimulação da atividade de peroxidases citoplasmáticas solúveis e da parede celular, ocorre por aumento da atividade de isoenzimas específicas já presentes no tecido sadio (GOODMAN *et al.*, 1986).

Não foram encontradas citações de trabalhos brasileiros sobre a análise de proteínas PR induzidas por infecção virótica. No Brasil os estudos de proteínas limitam-se à análise de proteínas virais (GASPAR, 1987).

A maioria das metodologias utilizadas nos estudos de metabolismo vegetal envolvem a destruição do tecido vegetal. Assim nos últimos anos tem-se buscado técnicas como a ressonância magnética nuclear (RMN), que permitem observações diretas dos processos metabólicos em células vivas (ROBERTS, 1984; RATCLIFFE, 1987). A natureza não-destrutiva e não-invasiva da RMN permite a utilização de tecidos intactos da planta (GADIAN, 1982; ABRAHAN *et al.*, 1988).

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é basicamente uma forma de espectroscopia de absorção como as de infravermelho e ultravioleta. Esta técnica foi desenvolvida em meados desse século e baseia-se nas propriedades que certos núcleos têm de absorver radiação eletromagnética na região de ráiofrequências.

O fundamento físico da espectroscopia de RMN está associado às propriedades magnéticas de núcleos atômicos. Os sinais de RMN são gerados apenas por núcleos que possuem um momento magnético intrínseco, isto é, com um número quântico de spin (I) diferente de zero. É o caso de ^{31}P , ^{13}C , ^{15}N , ^1H , ^{19}F ($I=1/2$), ^2H ($I=1$), ^{23}Na e ^{39}K ($I=3/2$). Núcleos como ^{12}C e ^{16}O ($I=0$) não geram sinais de RMN. O número quântico de spin é determinado pelo número de massa e número atômico.

Em espectrômetros modernos convencionais, a amostra contida num tubo de vidro (5-25 mm de diâmetro) é colocada na sonda do instrumento, situada num campo magnético muito intenso e homogêneo de 1 a 15 T (1 tesla = 10^4 gauss) gerado por um magneto supercondutor. Nessas condições, os spins nucleares na amostra tendem a alinhar-se na direção do campo aplicado. No caso de núcleos com $I=1/2$, o momento magnético de cada núcleo pode encontrar-se em apenas uma de duas orientações relativamente ao campo magnético aplicado. Essas duas orientações correspondem a estados de energia ligeiramente diferentes, sendo a diferença de energia proporcional à intensidade do campo magnético estático e à razão giromagnética do núcleo. A irradiação da amostra com impulsos de radiação eletromagnética na faixa de ráiofrequências (5 a 700 MHz) induz transições entre os dois estados energéticos, na condição de ressonância. Cada impulso dura apenas alguns microssegundos e excita simultaneamente todo o espectro de ráiofrequências numa dada gama, criando uma magnetização macroscópica na amostra com valor diferente do de equilíbrio. Terminado o impulso, a magnetização tende a retornar a situação de equilíbrio, e é feito o monitoramento do decaimento da magnetização no tempo. Os sinais assim adquiridos são posteriormente sujeitos a tratamento matemático por

transformação de Fourier, para originar espectros no domínio das frequências. A um dado campo magnético aplicado, núcleos diferentes têm frequências de ressonância muito diferentes, e para um determinado núcleo, a frequência de ressonância é dependente do seu ambiente físico-químico. A posição de uma ressonância num espectro de RMN pode indicar o tipo de grupo químico em que o núcleo se encontra inserido e refletir ainda outras características, como o estado de ionização ou ligação a outras espécies químicas. As diferenças nas frequências de ressonância são normalmente consideradas em termos de desvios ou deslocamentos químicos, medidos em partes por milhão (ppm) relativamente às ressonâncias de compostos-referência, e independentes da magnitude do campo magnético aplicado. Esses compostos-referência podem ser internos (endógenos à amostra) ou externos. Neste último caso são normalmente utilizadas soluções em tubos capilares de vidro, colocados no tubo de RMN juntamente com a amostra (HARRIS, 1983).

A ressonância de um núcleo pode desdobrar-se em linhas múltiplas (multipletos) como resultado da interações com núcleos magnéticos vizinhos através de ligações químicas (acoplamento spin-spin). A multiplicidade do desdobramento dos sinais pode ser útil na identificação de ressonâncias, e a magnitude do acoplamento, medida pela constante de acoplamento, está diretamente relacionada com as conformações moleculares. Além das constantes de acoplamento, outros parâmetros, tais como a largura das linhas do espectro e os parâmetros de relaxamento dos núcleos são função da estrutura e dinâmica molecular (HARRIS, 1983).

A intensidade de uma ressonância num espectro de RMN é, em determinadas circunstâncias, proporcional ao número de núcleos que representa, e como tal, o valor de sua área integrada pode ser usada para quantificar vários compostos. Além da concentração de compostos na amostra, as áreas dos sinais dependem da intensidade do impulso de radiofrequências aplicado e da velocidade de repetição dos impulsos usada na experiência. A

repetição rápida de impulsos, muitas vezes usada para conseguir espectros com melhor razão sinal/ruído em períodos de tempos mais curtos, pode impedir o relaxamento completo dos núcleos e provocar a sua saturação, o que se reflete na intensidade dos sinais obtidos invalidando medições para fins quantitativos. Os núcleos em diferentes grupos químicos têm diferentes valores de relaxamento e a intensidade dos respectivos sinais pode ser afetada de modo desigual. A saturação pode ser evitada usando intervalos de tempo suficientemente longos entre os impulsos para permitir relaxamento adequado dos núcleos (HARRIS, 1983).

A RMN possibilita análise da estrutura de compostos celulares, obtenção de dados sobre concentração e distribuição de metabólitos na célula, pH intracelular e concentração de íons, fornecendo também importantes informações sobre compartimentação celular, processos de transporte e características físicas do meio intracelular. A utilização da técnica "in vivo" permite, ainda, estudar mecanismos de regulação de processos metabólicos, determinar velocidades de reações enzimáticas e fluxo através de vias metabólicas específicas (SCHAEFER, 1975; KIME *et al.*, 1982; KIME & RATCLIFFE, 1982; SKOKUT *et al.*, 1982; STIDHAN *et al.*, 1983; ASHWORTH *et al.*, 1987; NEEMAN *et al.*, 1985; LINES *et al.*, 1989; ROLLINS *et al.*, 1989; VIOLA *et al.*, 1991).

Os estudos "in vivo" podem ser complementados pela análise de extratos de células e tecidos, o que permite identificar e quantificar vários metabólitos (RATCLIFFE, 1987).

Esse método possibilita a realização de medições sucessivas na mesma amostra biológica sem interferências nos processos celulares em curso. A aquisição de dados é geralmente mais rápida e menos elaborada que por outras técnicas. Entretanto, a utilização do método em sistemas biológicos sobretudo "in vivo", tem a limitação de que metabólitos de baixo peso molecular são de difícil detecção. Para serem detectados os compostos devem apresentar

concentrações de 0,1 mM ou superiores e ter elevado grau de mobilidade no meio intracelular (RATCLIFFE, 1987; ABRAHAN *et al.*, 1988).

A detecção por RMN de núcleos biologicamente importantes como ^{31}P , ^{13}C , ^1H , ^{15}N , ^{23}Na ou ^{39}K permite estudar aspectos muito diversos do metabolismo celular. O núcleo ^{31}P é o mais utilizado em estudos "in vivo" de sistemas biológicos, devido a sensibilidade intrínseca relativamente alta e à abundância natural do isótopo e ainda, pela importância de compostos fosforilados na bioenergética celular. A sua detecção permite observar diversos compostos fosforilados e acompanhar o estado energético da célula, além de medir diretamente velocidade de reações enzimáticas ou determinar o pH de compartimentos intracelulares sem perturbar os processos metabólicos em curso (ROBERTS & JARDETZKY, 1981; GADIAN, 1982).

ROBERTS *et al.* (1981; 1982) e MARTIN *et al.* (1982) estudando raízes de milho, demonstraram que o pH intracelular pode variar na presença de íons e que o pH vacuolar e citoplasmático são regulados por mecanismos diferentes. Além disso, o conteúdo de fosfato inorgânico pode variar na ausência ou presença de vários fatores como oxigênio, luz, açúcar, fosfato disponível no meio (MARTIN *et al.*, 1982; LEE & RATCLIFFE, 1983; WATERTON *et al.*, 1983; WRAY *et al.*, 1983).

O núcleo ^{13}C tem baixa sensibilidade intrínseca e reduzida abundância natural e, na ausência de enriquecimento isotópico, torna-se necessário utilizar concentrações de amostra relativamente elevadas e acumular os sinais durante longos períodos de tempo (ROBERTS & JARDETZKY, 1981; GADIAN, 1982). A maioria dos estudos envolvendo ^{13}C recorre à utilização de substratos ou precursores metabólicos enriquecidos isotopicamente, possibilitando a observação direta de fluxos através de vias metabólicas específicas. A cinética de passos enzimáticos e a distribuição da marca isotópica nos compostos formados nesses processos

também podem ser estudados sem a necessidade de técnicas de separação (STIDHAN *et al.*, 1983; NEEMAN *et al.*, 1985; ASHWORTH *et al.*, 1987; VIOLA *et al.*, 1991).

Apesar da crescente utilização da RMN nos estudos com plantas, não há citações da utilização desta técnica na análise da interação planta-patógeno, em particular nas infecções por vírus. No Brasil a RMN tem sido utilizada na área médica e para estudos de sistemas biológicos como hemácias, bacteriófagos, membranas e proteínas (SCHREIER, 1993).

3.MATERIAIS E MÉTODOS

Os vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA), do mosaico do pepino (VMP) e do mosaico do fumo (TMV) existentes na coleção da Seção de Fitopatologia, Estação Agronômica Nacional, Oeiras, Portugal, foram inoculados mecanicamente em plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) cv. Inglês e de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cv. Roma e mantidas em câmara climatizada com fotoperíodo de 16 h e temperatura de 25 +/- 30C. As plantas inoculadas foram utilizadas para extração de proteínas e estudos de RMN. O controle foi feito com plantas comparáveis inoculadas apenas com tampão.

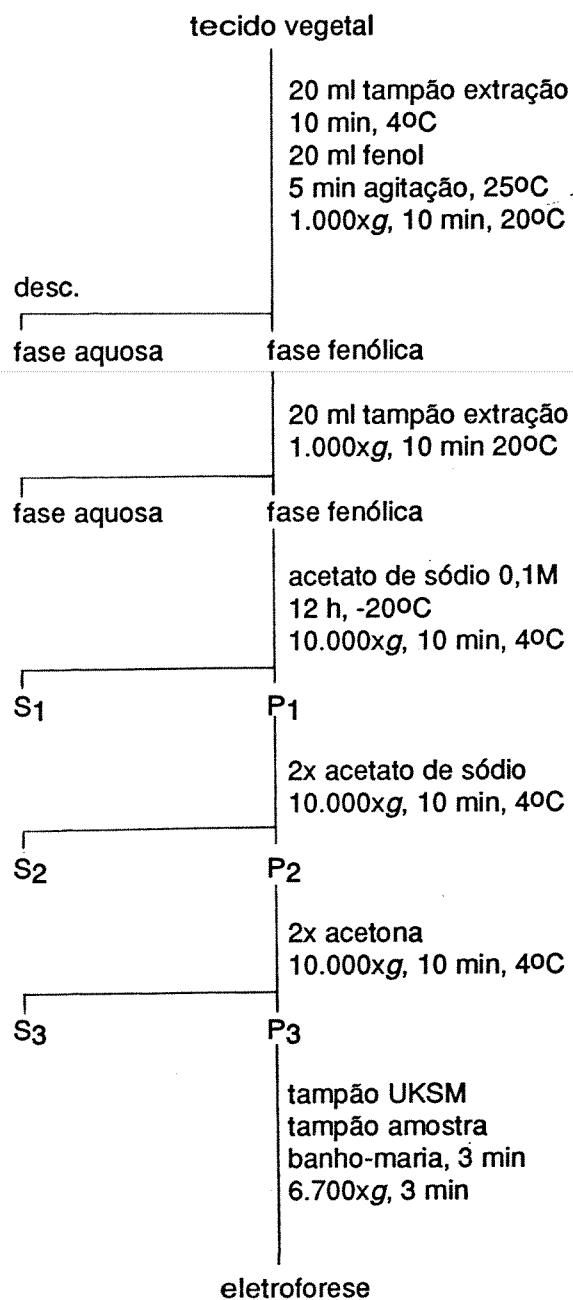
3.1.Análise de proteínas

3.1.1.Extração de proteínas totais

Proteínas totais foram extraídas de acordo com o método descrito por CAMACHO-HENRIQUEZ & SANGER (1982). Folhas e cotilédones de pepino e de tomate (5 g) foram triturados com N₂ líquido e homogeneizados em 20 ml de tampão de extração Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo EDTA 50 mM, KCl 0,1 M e sacarose 0,7 M e mantido, por 10 min, a 40 C. A seguir foi adicionado igual volume de fenol saturado em água e mantido à temperatura ambiente durante 5 min, sob agitação, após o que a amostra foi centrifugada a 1.000xg, por 10 min, a 200C. A fase aquosa foi descartada e a fase fenólica foi lavada duas vezes com o mesmo volume de tampão de extração e centrifugada a 1.000xg, por 10 min, a 40C. O sobrenadante (S₁) foi eliminado e o precipitado (P₁) foi lavado duas vezes com acetato de sódio 0,1 M em metanol e centrifugado a 10.000xg, por 10 min, a 40C. O sobrenadante (S₂) foi descartado e o precipitado (P₂) lavado duas vezes com acetona e centrifugado a 10.000xg, por 10 min, a 40C. O sobrenadante (S₃) foi descartado e para melhor dissolução do precipitado (P₃), este foi

dissolvido em pequeno volume de tampão UKSM pH 8,2, constituído por uréia 9,5 M, K_2CO_3 7 mM, SDS a 1,25% (p/v) e 2-mercaptoetanol (2 ME) a 5% (v/v). Depois de dissolvido foi adicionado igual volume de tampão amostra contendo Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, DTT 0,1 M, SDS a 2% (p/v), glicerol a 15% (p/v) e azul de bromofenol a 0,006% (p/v). A amostra foi fervida em banho-maria, por 3 min, centrifugada a 6.700xg, por 3 min e utilizada para eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (Esquema 1).

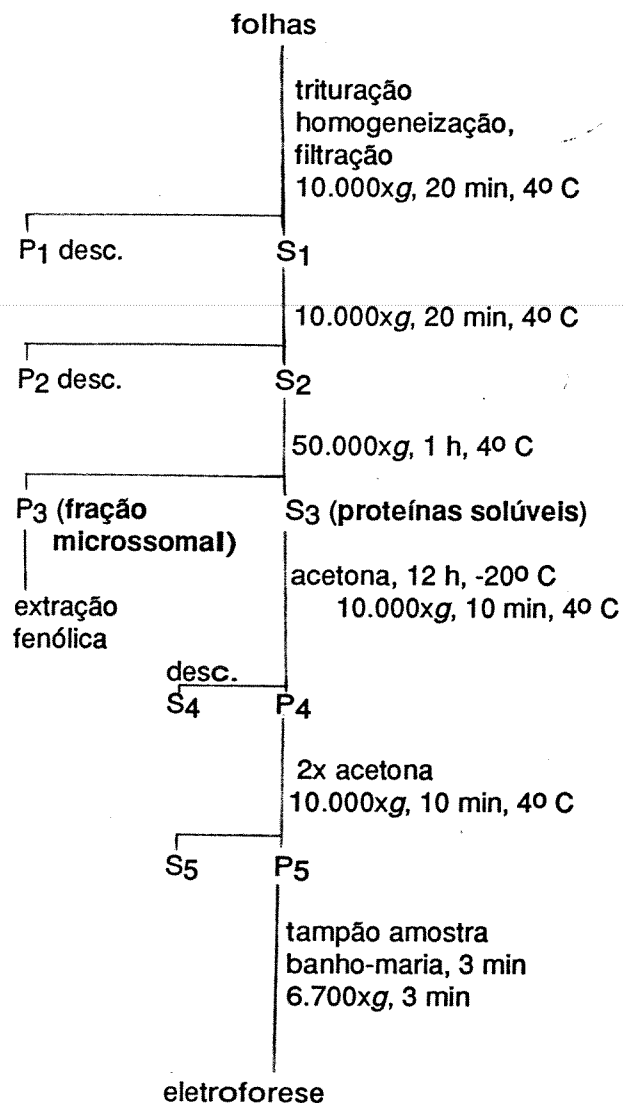
ESQUEMA 1.Extração de proteínas totais de pepino e tomate



3.1.2.Extração de proteínas solúveis e obtenção da fração microssomal

A extração de proteínas solúveis foi feita segundo metodologia descrita por HURKMAN & TANAKA (1986). As folhas (5 g) de pepino e tomate sadias e infectadas com vírus foram trituradas com N₂ líquido e homogeneizadas em 20 ml de tampão de homogeneização, Tris-HCl 30 mM, pH 8,7, contendo EDTA 1 mM, sacarose 0,25 M, PVPP a 5% (p/v), 2 ME a 2% (p/v), BSA a 0,1% (p/v) e PMSF 0,5 mM. O homogeneizado foi filtrado em rede de nylon (poro de 200 um) e centrifugado a 10.000xg, por 20 min, a 4º C. O precipitado (P₁) foi descartado e o sobrenadante (S₁) foi centrifugado a 10.000xg, por 20 min, a 4º C. O precipitado (P₂) foi desprezado e o sobrenadante (S₂) foi centrifugado a 50.000xg, por 1 h, a 4º C. O precipitado (P₃) obtido foi utilizado para extração da fração microssomal (FM). Ao sobrenadante (S₃), que continha a fração solúvel, foi adicionado acetona. A amostra ficou armazenada a -20º C, durante 12 h e centrifugada a 10.000xg, por 10 min, a 4º C. O sobrenadante (S₄) foi descartado e o precipitado (P₄) foi lavado duas vezes com acetona e centrifugado a 10.000xg, durante 10 min, a 4º C. O sobrenadante (S₅) foi descartado e o precipitado (P₅) foi dissolvido em tampão amostra, fervida em banho-maria, por 3 min, centrifugado a 6.700xg, por 3 min e utilizado para eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (Esquema 2).

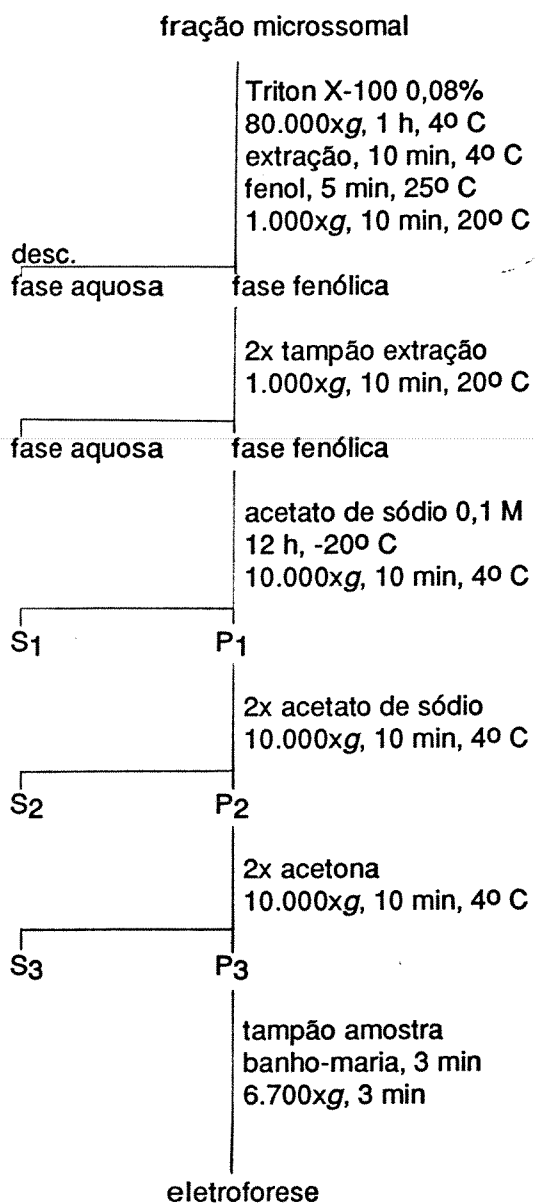
Esquema 2. Extração de proteínas solúveis e obtenção da fração microssomal de folhas e cotilédones de pepino e de tomate.



3.1.3.Extração fenólica das proteínas da fração microssomal

A fração microssomal, obtida como referido em 3.1.2., foi lavada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,2 contendo Triton X-100 a 0,08% (v/v) e centrifugada a 80.000xg, por 1 h, a 4º C. A seguir foi ressuspensa em 1,5 ml de tampão de extração, Tris-MES 10 mM, pH 7,3, contendo sacarose 0,25 M e EDTA 1 mM e mantido, por 10 min, a 4º C. Decorrido o tempo foi adicionado igual volume de fenol saturado em água, mantido à temperatura ambiente, sob agitação, durante 1 min e centrifugado a 1.000xg, por 10 min, a 20º C. A fase aquosa foi descartada e a fase fenólica foi lavada duas vezes com 1,5 ml de tampão de extração e centrifugada a 1.000xg, por 10 min, a 20º C. A fase aquosa foi descartada e à fase fenólica foi adicionado 7,5 ml de acetato de sódio 0,1 M em metanol. A amostra foi mantida a -20º C durante 12 h. Decorrido esse tempo foi centrifugada a 10.000xg, por 10 min, a 4º C. O sobrenadante (S₁) foi descartado e o precipitado (P₁) foi lavado duas vezes com acetato de sódio 0,1 M em metanol e centrifugado a 10.000xg, por 10 min, a 4º C. O sobrenadante (S₂) foi descartado e o precipitado (P₂) lavado duas vezes com acetona e centrifugado a 10.000xg, por 10 min, a 4º C. O sobrenadante (S₃) foi eliminado e o precipitado (P₃) dissolvido em tampão amostra, fervido em banho-maria, por 3 min, centrifugado a 6.700xg e utilizado para eletroforese (Esquema 3).

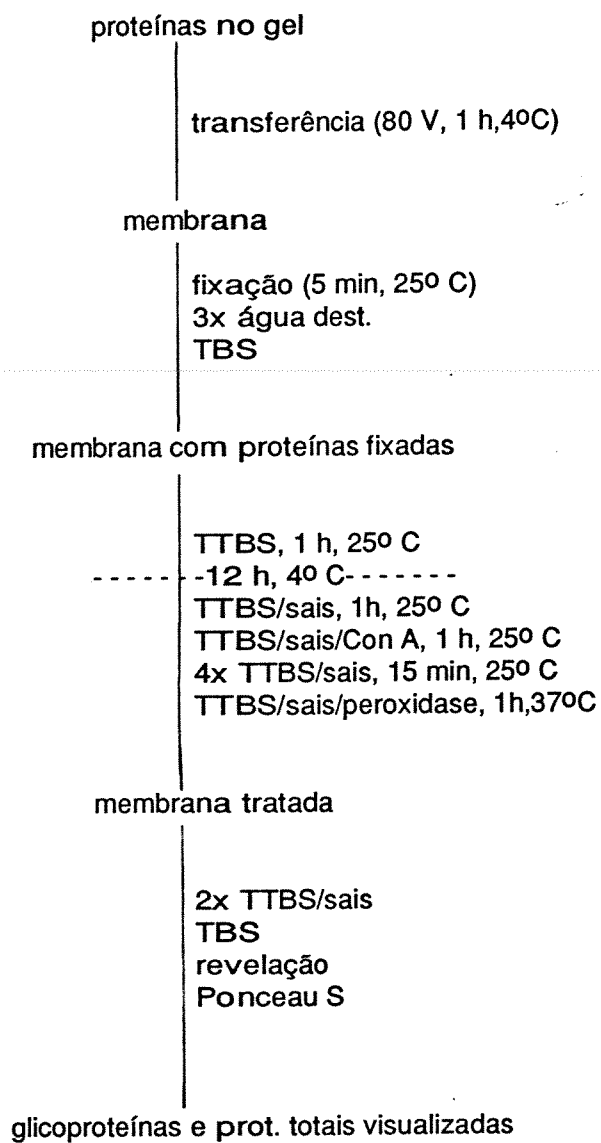
Esquema 3.Extração fenólica das proteínas da fração microssomal



3.1.4. Detecção de glicoproteínas

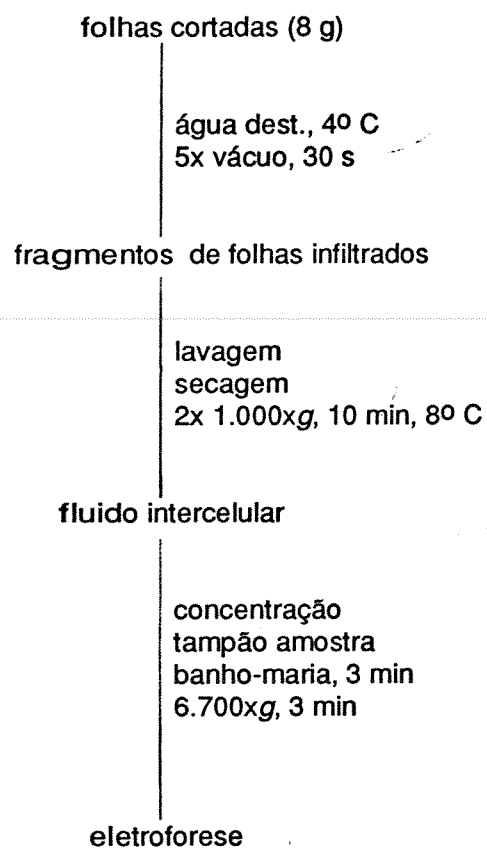
Proteínas da fração microsomal foram submetidas a detecção de glicoproteínas segundo descrito por FAYE & CHRISPEELS (1985). As proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, foram transferidas, utilizando-se aparelho de transferência LKB, para membrana de nitrocelulose, a 80 V, durante 1 h, a 40 C, em tampão Tris 0,025 M, contendo glicina 0,20 M e metanol a 10% (v/v). Após a transferência as proteínas foram fixadas por 5 min, a temperatura ambiente, em solução fixadora de ácido acético : isopropanol : água destilada (10 : 25 : 65 v/v/v) e a seguir lavadas três vezes com água destilada e com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 contendo NaCl 0,5 M (TBS). A membrana de nitrocelulose foi, então, incubada por 1 h à temperatura ambiente, em solução (TTBS) de TBS contendo Tween 20 a 0,1% (v/v). A seguir foi armazenada a 40 C ou processada para visualização de glicoproteínas.

Para visualização de glicoproteínas, inicialmente a membrana foi incubada por 1 h, à temperatura ambiente em tampão TTBS contendo 1 mM de CaCl₂ e de MgCl₂ (TTBS/sais). A seguir a membrana foi incubado à temperatura ambiente em tampão TTBS/sais contendo concanavalina A (Con A), na concentração final de 25ug/ml. Após 1h a membrana foi lavada por 4 períodos de 15 min com TTBS/sais e incubada por 1 h, a 370 C em tampão TTBS/sais contendo peroxidase ("horse heart", Sigma), na concentração final de 50 ug/ml. A seguir o membrana foi lavado com TTBS/sais e com TBS e, então, imerso em solução reveladora contendo 60 mg de 4-cloro-1-naftol e 60 ul de H₂O₂ 30 vol em 100 ml de TBS/sais (Esquema 4). As glicoproteínas apareceram como bandas escuras. O controle da transferência foi feito por coloração do gel, por azul de Coomassie, após a transferência e por coloração da membrana, por Ponceau S, para visualização de proteínas totais (bandas vermelhas).

Esquema 4. Detecção de glicoproteínas em membranas de nitrocelulose

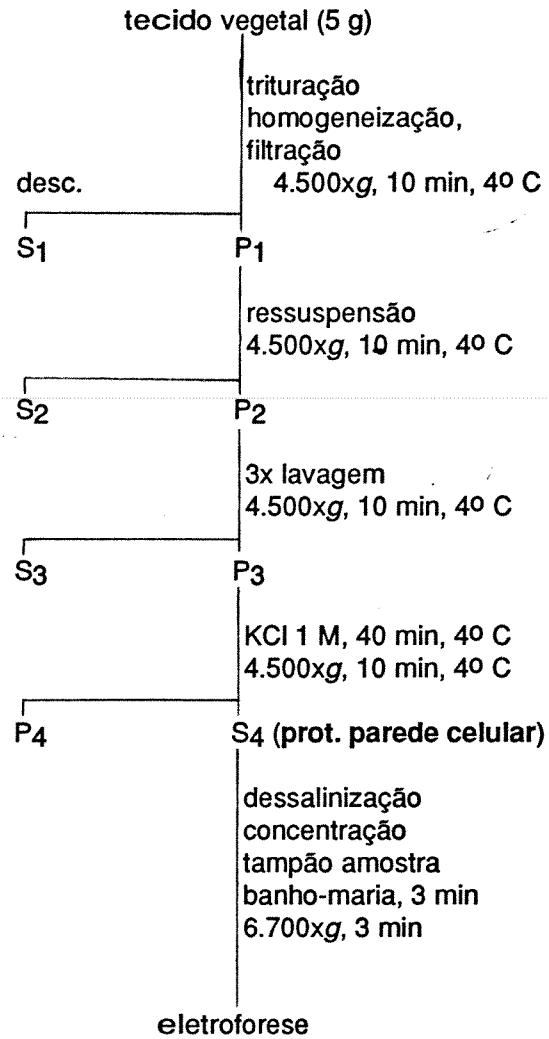
3.1.5.Extração de fluido Intercelular

O fluido intercelular de folhas de pepino e tomate sadios e 15 dias após a inoculação com vírus foi extraído de acordo com o método de PARENT & ASSELIN (1984). Folhas recém-coletadas tiveram a nervura central retirada e foram cortadas com auxílio de uma lâmina, em pequenos pedaços, os quais foram mantidos a aproximadamente 40 C. Os pedaços de folhas (8 g) foram infiltrados sob vácuo, com agitação suave, por 5 períodos de 30 s, em água destilada, a 40 C. A seguir foram cuidadosamente lavados e secos com papel absorvente, colocados numa seringa desprovida de êmbolo, em cuja extremidade foi adaptado um filtro de acetato de celulose (poro 0,2 um), o qual foi direcionado para um tubo de microcentrífuga. Este sistema foi introduzido num tubo de centrífuga e centrifugado duas vezes a 1.000xg, por 10 min, a 80 C. As amostras de fluido intercelular coletadas no tubo de microcentrífuga foram concentradas por ultrafiltração, foi adicionado tampão amostra, fervido em banho-maria por 3 min, centrifugado a 6.700xg, por 3 min e utilizado para eletroforese (Esquema 5).

Esquema 5.Extração de fluido intercelular de folhas de pepino e tomate.

3.1.6.Extração de proteínas da parede celular

Folhas de pepino e tomate sadios e infectados por VMAA e VMP (5 g) foram trituradas com N₂ líquido e homogeneizadas em 20 ml de tampão de homogeneização Tris-HCl 50 mM, pH 7,2 contendo inibidor de proteases PMSF 0,5 mM. O homogeneizado foi filtrado em rede de nylon (poro de 200 µm) e centrifugado a 4.500xg, por 10 min, a 4° C. O sobrenadante (S₁) foi descartado e o precipitado (P₁) foi ressuspenso em tampão de homogeneização contendo Triton X-100 a 1% (v/v). A seguir a suspensão foi centrifugada a 4.500xg, por 10 min, a 4° C. O sobrenadante (S₂) foi desprezado e o precipitado (P₂) foi lavado por três vezes com tampão de lavagem Tris-HCl 50 mM, pH 7,2 e centrifugado a 4.500xg, por 10 min, a 4° C. O sobrenadante (S₃) foi eliminado e o precipitado (P₃) foi ressuspenso em KCl 1 M e mantido por 40 min, a 4° C. A seguir a amostra foi centrifugada a 4.500xg, por 10 min, a 4° C. O precipitado (P₄) foi descartado e o sobrenadante (S₄) foi dessalinizado com tampão Tris-HCl 5 mM, pH 7,2 e concentrado em por ultrafiltração. A seguir foi adicionado tampão amostra e fervido por 3 min em banho-maria, centrifugado a 6.700xg, por 3 min e utilizado para eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (Esquema 6).

Esquema 6.Extração de proteínas da parede celular.

3.1.7. Fracionamento de proteínas externas e integrals da fração microssomal.

3.1.7.1. Fracionamento por Triton X-114

A fração microssomal obtida como descrito no procedimento 3.1.2. foi fracionada segundo o método de KJELBON *et al.* (1989), utilizando-se Triton X-114 (BORDIER, 1981).

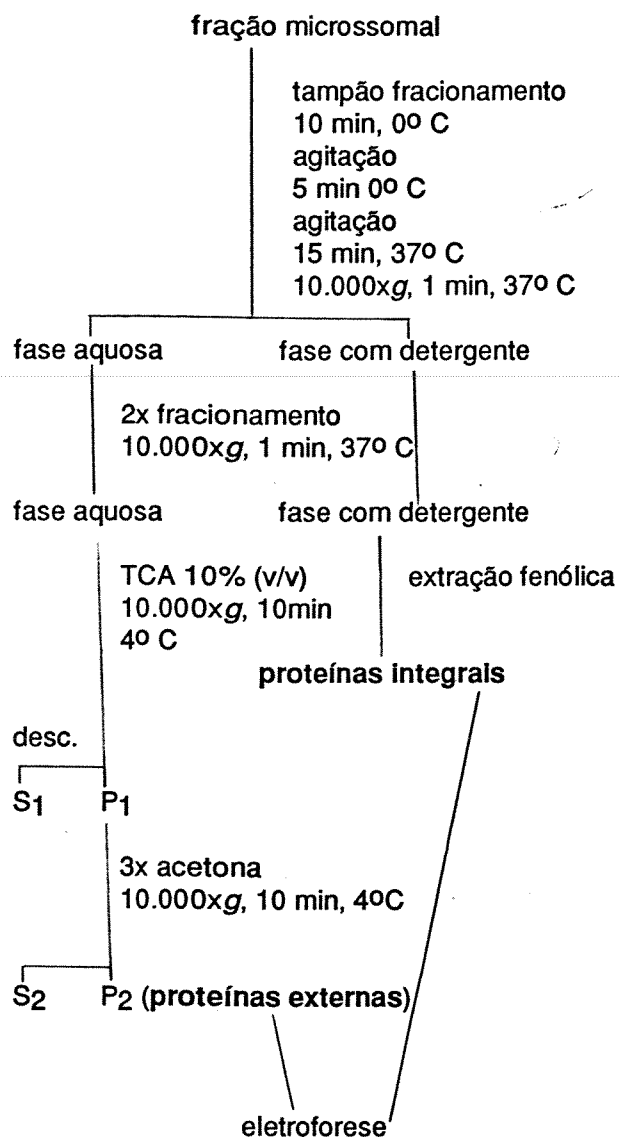
A FM foi ressuspensa em tampão de fracionamento Tri-HCl 10 mM, pH 7,6, contendo Triton X-114 a 1% (v/v), NaCl 150 mM e EDTA 1 mM. A mistura resultante foi incubada por 10 min, a 00 C, agitada e deixada repousar por mais 5 min, a 00 C. A seguir foi novamente agitada e transferida para 370 C, por 15 min e centrifugada a 10.000xg, por 1 min. A fase superior aquosa foi transferida para outro tubo e adicionado igual volume de tampão de fracionamento contendo Triton X-114 (concentração final 1% v/v). À fase inferior contendo Triton foi adicionado igual volume de tampão de fracionamento sem Triton X-114. As amostras foram incubadas novamente a 00 C e a 370 C como descrito anteriormente e após a centrifugação as fases aquosa e com detergente foram separadas e o fracionamento repetido.

As proteínas da fase aquosa (proteínas externas) foram precipitadas com TCA a 10% (v/v) e centrifugadas a 10.000xg, por 10 min, a 40 C. O sobrenadante (S1) foi descartado e o precipitado (P1) obtido foi lavado três vezes com acetona e centrifugado a 10.000xg, por 10 min, a 40 C. A seguir o precipitado (P2) foi dissolvido em tampão amostra e o sobrenadante (S2) foi descartado.

À fração com detergente foi adicionado igual volume de tampão de extração Tris-MES 10 mM, pH 7,3, contendo sacarose 0,25 M e EDTA 1 mM e seguida da extração por fenol como descrito no procedimento 3.1.3. As proteínas (proteínas integrals) obtidas foram dissolvidas em

tampão amostra, fervidas em banho-maria, por 3 min, centrifugadas a 6.700xg, por 3 min e utilizadas para eletroforese (Esquema 7).

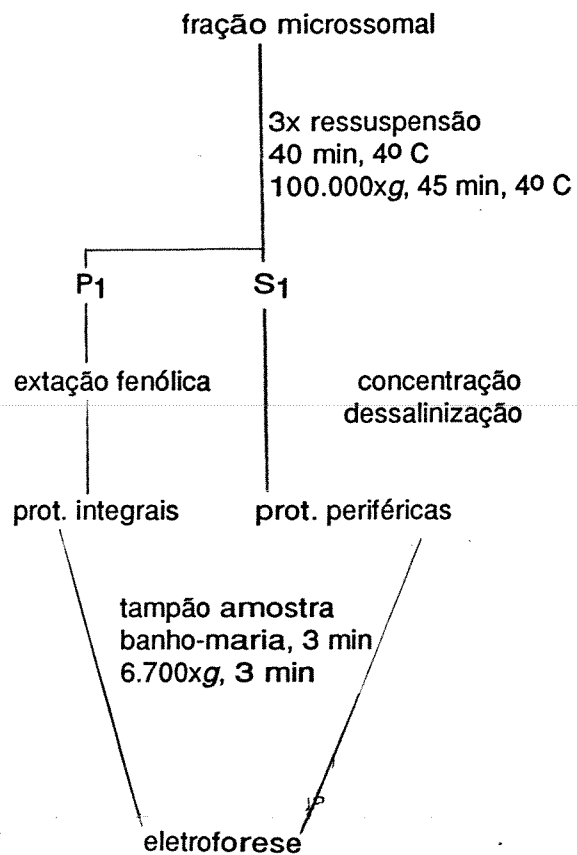
Esquema 7. Fracionamento por Triton X-114 de proteínas externas e Integrals da fração microssomal.

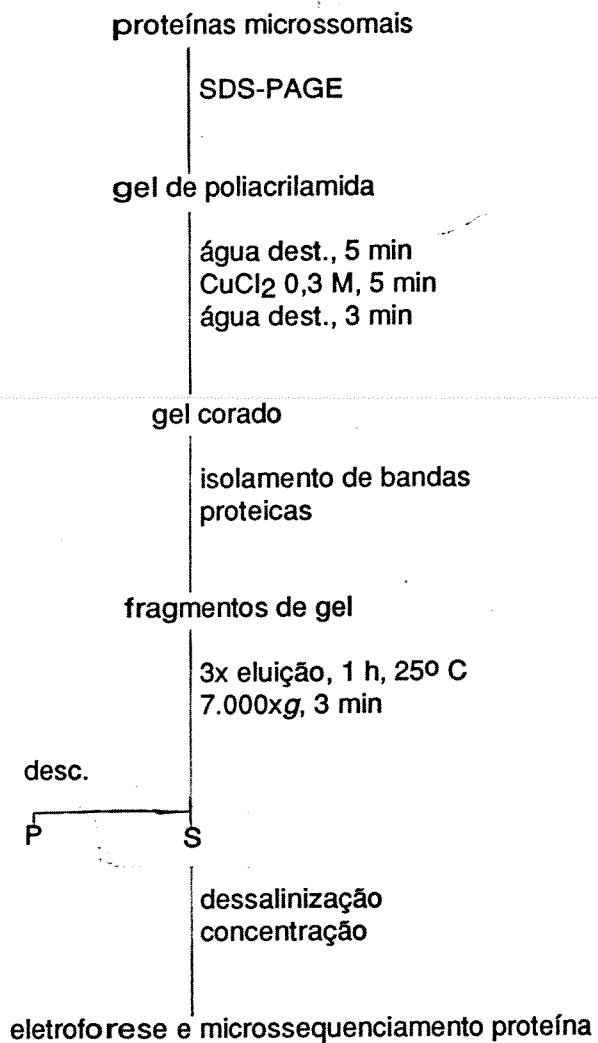


3.1.7.2. Fraçãoamento por KCl

A fração microsomal obtida em 3.1.2. foi ressuspensa em tampão de ressuspensão Tris-HCl 10 mM, pH 7,3 contendo KCl 1 M e EDTA 1 mM. A suspensão foi mantida por 40 min, a 40 C e a seguir centrifugada a 100.000xg, por 45 min, a 40 C. Esse procedimento foi repetido 3 vezes. O sobrenadante (S₁) contendo as proteínas externas foi concentrado e dessalinizado em tampão de ressuspensão sem KCl, por ultrafiltração. O precipitado (P₁), contendo as proteínas integrais, foi utilizado para extração fenólica de proteínas de acordo com o procedimento 3.1.3. Às frações contendo proteínas externas e integrais foi adicionado tampão amostra, foram fervidas por 3 min em banho-maria, centrifugadas a 6.700xg, durante 3 min (Esquema 8).

Esquema 8. Fraçãoamento por KCl de proteínas externas e Integrals da fração microssomal.



Esquema 9. Isolamento de proteínas do gel de poliacrilamida-SDS.

3.1.9."Immunoblotting"

Proteínas da fração microssomal de pepino e tomate sadios e infectados com VMAA obtidas no procedimento 3.1.3. e as proteínas de 39.000 Da de pepino e tomate obtidas no procedimento 3.1.8. foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e a seguir transferidas para membrana de PVDF, segundo metodologia descrita por SWERDLOW *et al.* (1986).

Antes da transferência a membrana foi imersa por 2 min em metanol e a seguir hidratada, por 1 h, à temperatura ambiente, sob agitação, em tampão Tris- HCl 50 mM, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M. A seguir a membrana e o gel foram incubados em tampão de transferência Tris-HCl 25 mM, pH 8,8 contendo glicina 0,19 M e metanol a 20% (v/v), durante 15 min, à temperatura ambiente, sob agitação. A transferência foi feita por 1 h, a 80 V a 4°C. Após a transferência o gel foi corado por azul de Coomassie, como controle. Em seguida a membrana foi autoclavada a 120°C, por 30 min, entre duas folhas de papel de filtro, em água desionizada. Então, foi seca e processada de acordo com a metodologia de FERREIRA & SHAW (1989). A seguir, a membrana foi tratada com tampão fosfato-salina 0,1 M, pH 7,4 (PBS), contendo BSA a 3% (p/v) e leite em pó a 2% (p/v), durante 1 h, à temperatura ambiente, sob agitação. A seguir foi lavada por 10 min com PBS contendo Tween 20 a 1% (p/v) (PBST). Foi, então, incubada com antissoro anti-VMAA, diluído 1:2.000, em solução incubadora de PBS contendo Tween 20 a 0,05% (p/v) e BSA a 3% (p/v), durante 1 h. A seguir, a membrana foi lavada com PBST, por duas vezes durante 5 min, depois com solução salina contendo NaCl 1M, Na₂HPO₄ 0,01 M e Tween 20 a 0,5% (p/v) e, então, com solução incubadora durante 15 min. Decorrido o tempo a membrana foi incubada com antissoro anti-IGG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma), durante 1 h, sob agitação. A seguir a membrana foi lavada com PBST, por duas vezes, durante 5 min, depois com solução salina, por 10 min e com PBST por três vezes, durante 5 min

e, então, com PBS por 1 min. A seguir a membrana foi incubada em tampão Veronal-acetato 0,15 M, pH 9,6 e revelada como descrito por BLAKE *et al.*, (1983).

A membrana foi revelada por 12 h, no escuro, a 37°C, em solução contendo BCIP a 0,05 mg/ml em dimetilformamida, NBT a 0,1 mg/ml em tampão veronal e MgCl₂ 4 mM.

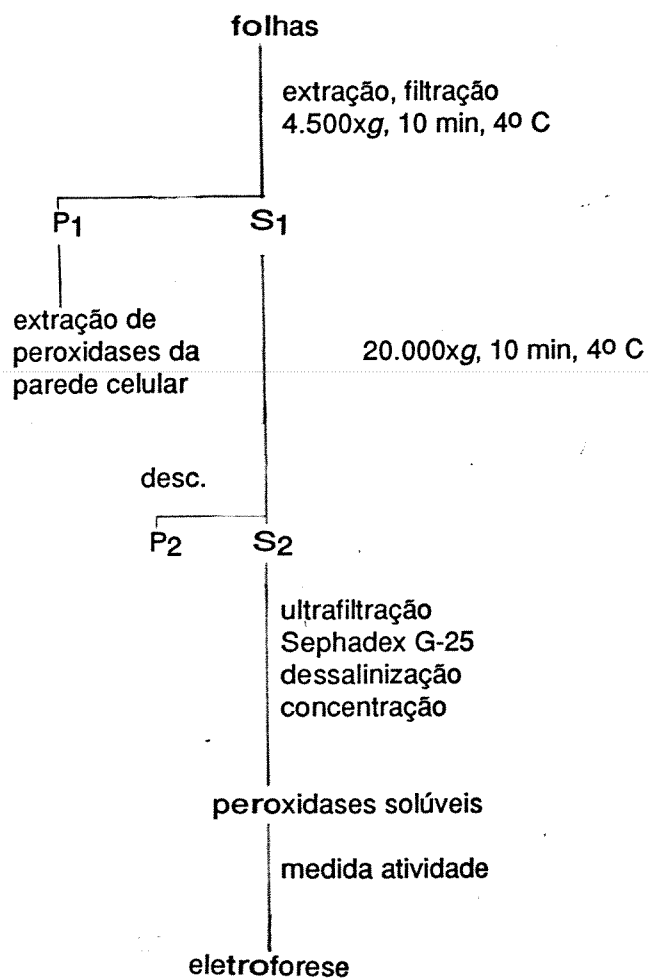
3.1.10.Extração de peroxidases

3.1.10.1.Extração de peroxidases solúveis e obtenção da fração para extração de peroxidases da parede celular.

Peroxidases solúveis e da parede celular foram obtidas de acordo com a metodologia descrita por JACKSON & RICARDO (1992). Folhas recém-coletadas foram trituradas em almofariz com areia, em 2 ml/g (peso fresco) de tampão de extração Tris-HCl 50 mM, pH 7,2 contendo inibidores de proteases (aprotinina 0,5 mM, leupeptina 0,5 mM e antipainá 0,5 mM). O homogeneizado foi filtrado em rede de nylon (poro 200 µm) e centrifugado a 4.500xg, por 10 min, a 4º C. O precipitado (P1) foi utilizado para extração de peroxidases da parede celular e o sobrenadante (S1) foi centrifugado a 20.000xg, por 20 min, a 4º C. A seguir o precipitado (P2) foi descartado e o sobrenadante (S2), contendo as peroxidases solúveis, foi concentrado até 2,5 ml por ultrafiltração e, então, passado por coluna de Sephadex G-25 PD-10 (Pharmacia), equilibrada com CaCl₂ 2 M e eluído com a mesma solução. A fração coletada foi concentrada por ultrafiltração e dessalinizada com tampão B-alanina-ácido acético 3,5 mM, pH 4,5. A dessalinização foi feita em Por ultrafiltração ou por diálise.

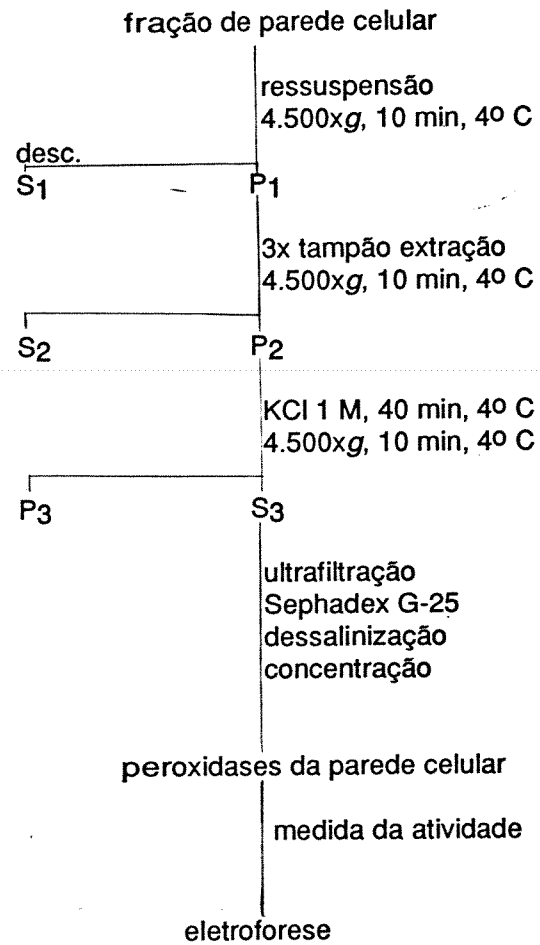
A atividade de guaiacol-peroxidases foi medida por monitoramento a 25ºC, em ácido succínico 0,1 M, pH 5,0 contendo guaiacol 1 mM e H₂O₂ 1 mM. Uma unidade de atividade de peroxidase foi definida como sendo equivalente à mudança de 0,1 unidades de absorbância a 450 nm por minuto (JACKSON & RICARDO, 1992) e logo após foram analisadas em gel de poliacrilamida, em sistema nativo (Esquema 10).

Esquema 10.Extração de peroxidases solúveis de folhas saudias e infectadas de pepino e tomate.



3.1.10.2.Extração de peroxidases da parede celular.

A fração contendo as paredes celulares, obtida como descrito no método 3.1.9.1., foi utilizada para extração de peroxidases. A fração foi ressuspensa em tampão de extração contendo Triton X-100 a 1% (v/v) e centrifugada a 4.500xg, por 10 min, a 4º C. O sobrenadante (S₁) foi desprezado e o precipitado (P₁) foi lavado três vezes com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,2 e centrifugado a 4.500xg, por 10 min, a 4º C. O sobrenadante (S₂) foi descartado e o precipitado (P₂) foi ressuspensa em KCl 1 M (1ml/g de tecido inicial) e mantido por 40 min, a 4º C. A seguir a mostra foi centrifugada a 4.500xg, por 10 min, a 4º C. O precipitado (P₃) foi descartado e o sobrenadante (S₃) contendo as peroxidases da parede celular foi processado como descrito em 3.1.9.1., para as peroxidases solúveis (Esquema 11).

Esquema 11. Extração de peroxidases da parede celular.

3.1.11. Técnicas eletroforéticas

3.1.11.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

As amostras de proteínas obtidas nos procedimentos 3.1.1., 3.1.2., 3.1.3., 3.1.5., 3.1.6., 3.1.7.1., 3.1.7.2. foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS em sistema descontínuo-desnaturante, com sistema tampão de LAEMMLI (1970). A eletroforese foi feita à temperatura ambiente, com tampão do eletrodo Tris-glicina-SDS, em placa vertical de 18 x 16 cm (4h a 100 V) ou 7 x 8 cm (45 min a 50 V). Os géis foram preparados com espessura de 1,5 e 0,75 mm, respectivamente, utilizando gel de concentração com 4% e gel de resolução com 12% de acrilamida. As proteínas aplicadas no gel (20 ou 40 ug) foram dosadas pelo método de Lowry modificado (BENNETT, 1982). Os pesos moleculares das proteínas separadas no gel foram estimadas por comparação com padrão de peso molecular corrido no mesmo gel, contendo: BSA (66.000 Da), ovoalbumina (45.000 Da), pepsina (34.700 Da), tripsinogênio (24.000 Da), B-lactoglobulina (18.400 Da) e lisozima (14.300 Da) ou contendo BSA (66.000 Da), ovoalbumina (45.000 Da), glicose-3-fosfato desidrogenase (36.000 Da), anidrase carbônica (29.000 Da), tripsinogênio (24.000), inibidor da tripsina (20.100 Da) e alfa lactoglobulina (14.200 Da).

Decorridas as eletroforeses os géis foram corados por 30 min em solução de azul de Coomassie R-250 a 0,1% (p/v), dissolvido em ácido acético : metanol : água (1 : 5 : 4 v/v/v) e descorados por solução contendo ácido acético : metanol : água (2 : 1 : 17 v/v/v). Em alguns casos os géis foram corados por nitrato de prata segundo descrito por BLUMM *et al.* (1987).

3.1.11.2. Eletroforese bidimensional.

Para eletroforese bidimensional foram utilizadas proteínas da fração microsomal de pepino com VMAA e de tomate com VMP isoladas do gel unidimensional como descrito no método 3.1.8. A primeira dimensão NEPHGE ("nonequilibrium pH gradient electrophoresis") foi efetuada em tubos de vidro (150 x 3 mm), segundo descrito por O'FARRELL *et al.* (1977). Os tubos selados com "parafilm" foram preenchidos com gel constituído por acrilamida 6,5% (v/v), uréia 1g/ml, Nonidet P-40 (NP-40) a 3,45% (v/v), mistura de anfólitos a 8,6% (v/v) e persulfato de amônio a 0,01 (p/v). Antes de ser colocada nos tubos, a solução foi desgaseificada e a seguir adicionado TEMED a 0,12% (v/v). A mistura de gel foi introduzida nos tubos com auxílio de uma seringa com agulha longa. O gel foi coberto com 20 ul de solução de uréia 8 M e deixado polimerizar durante 12 h. Decorrido o tempo a solução de uréia 8 M foi retirada e 100ug de proteína de cada amostra foi aplicada por tubo. A amostra de proteína em tampão Tris-MES 10 mM, pH 7,2, contendo EDTA 1 mM foi dissolvida em tampão amostra uréia contendo uréia 9 M, NP-40 a 8% (v/v), anfólitos a 4% (v/v) e 2-mercaptoetanol a 4% (v/v). A amostra foi recoberta com 20 ul de solução contendo uréia 9 M e mistura de anfólitos a 1% (v/v) Em seguida foi acrescentado 20 ul de tampão do ânodo, previamente desaerado. Os tubos foram colocados na cuba de eletroforese e o "parafilm" dos tubos foi perfurado.

A eletroforese foi efetuada a 400 V por um período de 4:30 h, em direção ao cátodo. O tampão catódico foi constituído por NaOH 0,02 N e o anódico por H₃PO₄ 0,01 M. Decorrida a eletroforese da primeira dimensão, o gel foi cuidadosamente removido dos tubos e equilibrado durante 30 min em tampão amostra-SDS, constituído por Tris-HCl 65 mM, pH 6,8, contendo glicerol a 10% (v/v), 2-mercaptoetanol a 5% (v/v), SDS a 2,3% (p/v) e azul de bromofenol a 0,006% (p/v).

A segunda dimensão foi realizada segundo descrito por O'FARRELL (1975), em sistema descontínuo-desnaturante, em placa vertical de 18 x 16 cm, utilizando sistema tampão de LAEMMLI (1970), . Os géis de concentração e de resolução foram preparados com 4 e 12% de acrilamida, respectivamente. O gel da primeira dimensão, depois de equilibrado, foi colocado sobre o gel da segunda dimensão e selado com agarose 1% (p/v) em tampão amostra-SDS. A eletroforese decorreu a 70 V por 14 h. A seguir os géis foram corados por Coomassie ou por prata.

3.1.11.3.Eletroforese em gel de poliacrilamida

As peroxidases extraídas de pepino e tomate obtidas nos procedimentos 3.1.9.1 e 3.1.9.2. foram submetidas a eletroforese catódica, não desnaturante, em gel de poliacrilamida, segundo descrito por JACKSON & RICARDO (1992). No gel de eletroforese foram aplicadas 10 unidades de peroxidases solúveis e 20 unidades de peroxidases de parede celular. A eletroforese foi efetuada em placa vertical de 18 x 16 cm em gel de 1,5 mm de espessura, contendo 7,5% de acrilamida, preparada em tampão de eletroforese B-alanina 35 mM - ácido acético 14 mM, pH 4,5 e polimerizado com persulfato de amônio 17,5 mM e TEMED 2,7 mM.

As amostras de peroxidase foram aplicadas no gel em tampão de eletroforese diluído 10 vezes, contendo glicerol a 10% (v/v) e fucsina básica, como marcador de migração. Imediatamente antes da aplicação das amostras no gel foi adicionado Citocromo c ("horse heart", Sigma). Decorrida a eletroforese o gel foi corado para isoperoxidasas por imersão em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 5,0, contendo guaiacol 1 mM e H₂O₂ 1 mM, durante 2 h a temperatura ambiente.

3.2. Estudos de ressonância magnética nuclear

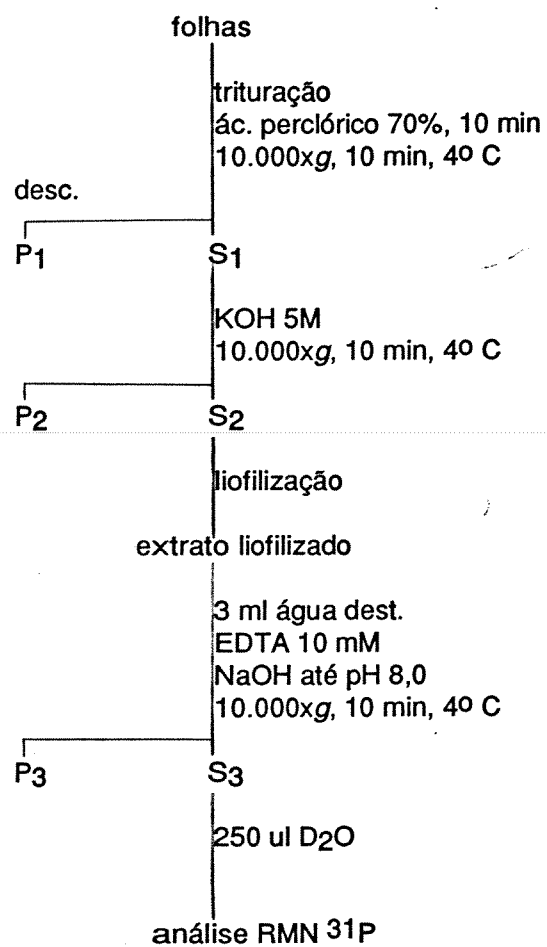
3.2.1. Análise "in vivo" de compostos de ^{31}P e ^{13}C .

Folhas de pepino e tomate com 1,5 cm de comprimento foram utilizadas para estudos "in vivo" de RMN de compostos de fósforo e carbono. As folhas recém-coletadas foram cortadas em discos de 0,7 cm de diâmetro e infiltradas com água, sob vácuo, durante 30 s. A seguir os discos foram colocados em tubo de RMN de 10 mm de diâmetro interno e mantidos em condições aeróbias por intermédio de um sistema de circulação de líquido, mantendo um fluxo de 6,0 ml/min. Os espectros foram obtidos em espectrômetro Bruker CXP 300, a 25^o C, na frequência de 121,49 MHz para fósforo e na frequência de 75,46 MHz para carbono, com desacoplamento de prótons. As acumulações foram feitas durante 30 min, com tempo de irradiação de 6 μs e intervalo entre os pulsos de 0,6 s. Os desvios químicos foram obtidos em relação a referência externa de ácido metileno difosfônico 0,5 M para fósforo e de metanol para carbono.

3.2.2. Análise de compostos de ^{31}P em extratos.

Folhas de pepino e tomate foram utilizadas para preparo de extratos, de acordo com metodologia descrita por RICARDO & SANTOS (1990). Foram utilizadas 2,5 g de folhas, as quais foram congeladas com N_2 líquido e desintegradas, em almofariz, com ácido perclórico a 70% (v/v). A mistura foi mantida em banho de gelo, durante 10 min. A seguir foi centrifugada a 10.000xg, durante 10 min, a 4^o C. O precipitado (P₁) foi descartado e o sobrenadante (S₁) foi neutralizado com KOH 5 M até pH 7,8, em banho de gelo. A seguir foi centrifugado a 10.000xg, por 10 min, a 4^o C. O precipitado (P₂) foi descartado e o sobrenadante (S₂) foi liofilizado. Para o preparo de extratos também foram utilizados 2,5 g de cotilédones e 10, 5 e 2,5 g de folhas aos 5, 10 e 15 dias após a inoculação com VMAA e VMP.

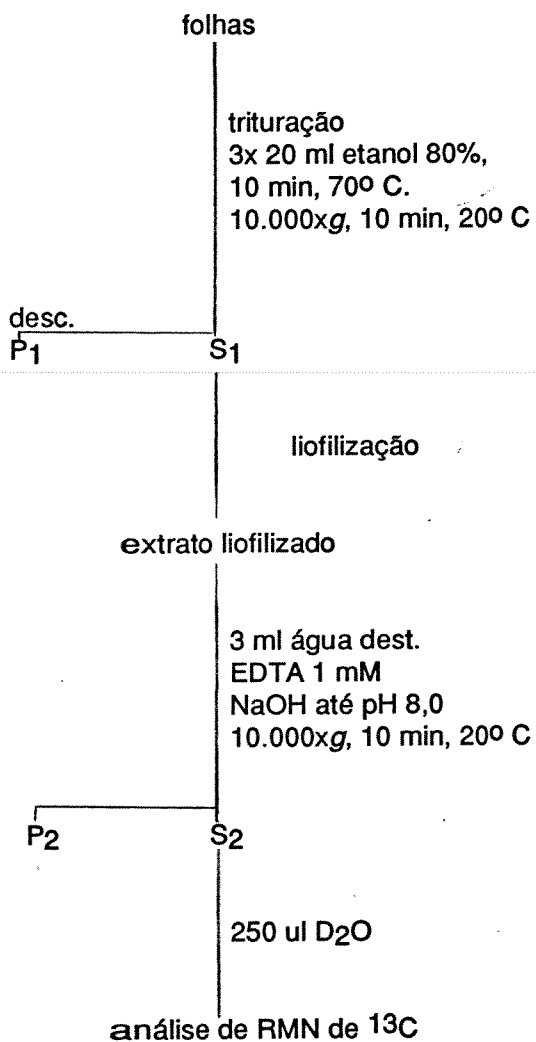
Para análise por RMN, o extrato liofilizado foi dissolvido em 3 ml de água destilada, contendo EDTA 10 mM (concentração final). O pH foi elevado para 8,0 com pequenas quantidades de NaOH e a seguir centrifugado a 10.000xg, por 10 min, a 4º C. O precipitado (P3) foi descartado e o sobrenadante (S3) foi transferido par tubo de RMN de 10 mm e adicionado 250 ul de água deuterada. Os espectros de ^{31}P foram obtidos em espectrômetro Brucker CXP 300, na frequência de 121,49 MHz, a temperatura de 25º C, com pulso de irradiação de 5 us e intervalo entre os pulsos de 1,5 s, num total de 5000 acumulações. Os desvios químicos foram obtidos utilizando como referência externa o ácido metileno difosfônico 0,5 M (Esquema 12).

Esquema 12. Preparo de extratos para análise de RMN de compostos de ^{31}P .

3.2.3. Análise de compostos de ^{13}C em extratos.

Os extratos de compostos de carbono de pepino e tomate foram preparados segundo descrito por LINES *et al.* (1989). Foram preparados extratos com 5 g de folhas, as quais foram maceradas por três vezes em etanol a 80% (v/v), a 70° C e centrifugadas a 10.000xg, por 10 min, a 20° C. O precipitado (P₁) foi descartado e o sobrenadante (S₂) foi liofilizado.

Para determinações de RMN o extrato liofilizado foi dissolvido em 3 ml de água destilada sob agitação por 30 min. A seguir foi adicionado EDTA na concentração final de 1 mM. O pH foi ajustado para 8,0 com pequenas quantidades de NaOH. O extrato dissolvido foi centrifugado a 10.000xg, por 10 min, a 20° C. O precipitado (P₂) foi descartado e o sobrenadante (S₂) foi transferido para tubos de RMN de 10 mm e adicionado 250 ul de água deuterada. Os espectros de carbono foram obtidos em espectrômetro Bruker CXP 300, a 27° C, na frequência de 75,46 MHz com desacoplamento de prótons. As acumulações (10.000) foram feitas utilizando pulso de irradiação de 10 us e intervalo entre os pulsos de 0,6 s. Os desvios químicos foram determinados em relação ao metanol, como referência externa (Esquema 13).

Esquema 13. Preparo de extratos para análise de compostos de ^{13}C .

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.Análise de proteínas

Alterações específicas no padrão proteico de folhas de várias plantas, infectadas por diferentes patógenos, têm sido relatadas por diversos autores (VAN LOON, 1985; BOWLES, 1990). O sistema mais estudado é o de fumo infectado com TMV e outros patógenos que provocam lesões necróticas localizadas como resposta típica do hospedeiro. Nesse caso são produzidas novas proteínas, características da espécie de fumo (GIANINAZZI *et al.*, 1969; VAN LOON & VAN KAMMEN, 1970). Essas proteínas foram chamadas de proteínas relacionadas ao processo de patogênese (proteínas PR) ou proteínas *b* (ANTONIW *et al.*, 1980) e a quantidade de proteína sintetizada tem sido correlacionada com a intensidade da resposta do hospedeiro (GIANINAZZI *et al.*, 1980). A função das proteínas é ainda desconhecida (JOOSTEN *et al.*, 1990; KAUFFMAN *et al.*, 1990).

Outro sistema bem estudado, ao nível de proteínas sintetizadas em resposta à infecção, é o de folhas e cotilédones de pepino, onde a proteína E é acumulada após a infecção com vírus, bactérias e fungos (TAS & PETERS, 1977; ANDEBRHAN *et al.*, 1980). A síntese dessa proteína é uma resposta geral das plantas e comum a todas as variedades testadas por GESSLER & KÚC (1982).

Em tomate foi descrito o aparecimento da proteína P₁₄, específica do hospedeiro, como a principal alteração no padrão proteico de folhas infectadas com viróides, VMP e *Cladosporium fulvum* (CAMACHO-HENRIQUEZ *et al.*, 1982 a; b).

No presente trabalho foi detectado aparecimento de proteína com PM 39.000 Da na fração de proteínas totais de folhas de pepino com VMAA e de tomate com VMP aos 5 dias após a inoculação. Essas proteínas não foram detectadas nos controles sadios (Fig. 1).

O padrão eletroforético de proteínas totais de cotilédones de pepino e tomate não evidenciou diferenças entre plantas sadias e infectadas (Fig. 2).

Figura 1. Padrão eletroforético de proteínas totais de folhas de pepino (PE) e tomate (TO) sadios (S) e infectados com os vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA) e do mosaico do pepino (VMP) mostrando o aparecimento da proteína de 39.000 Da.

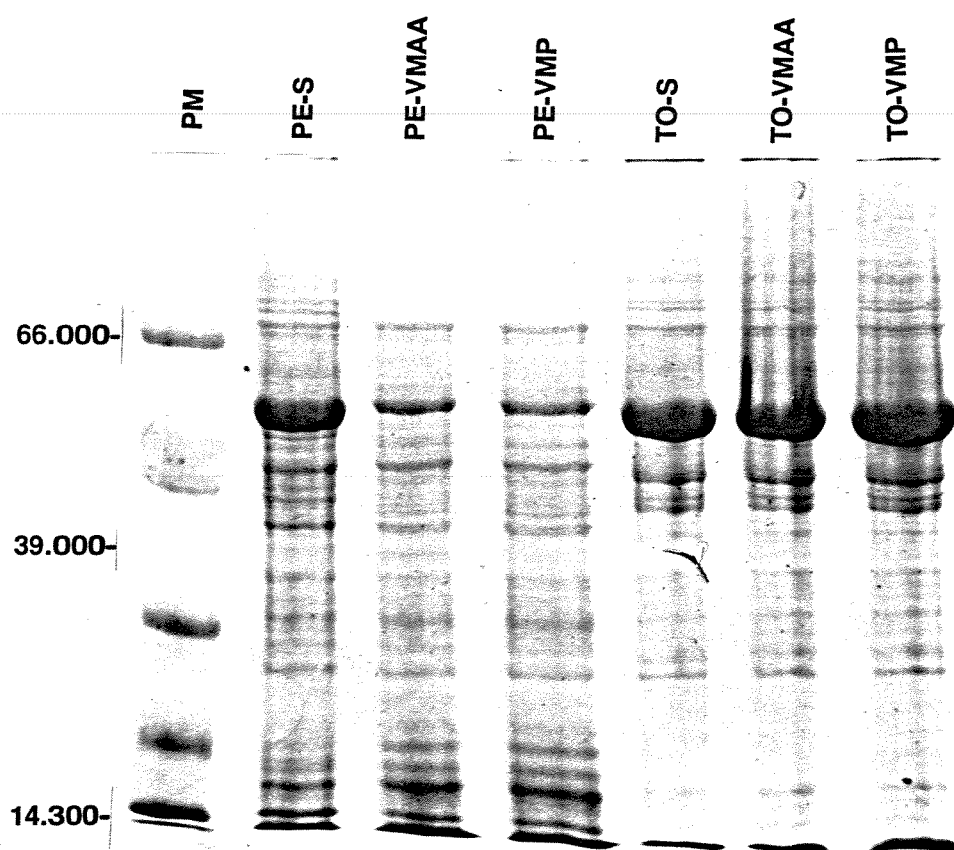
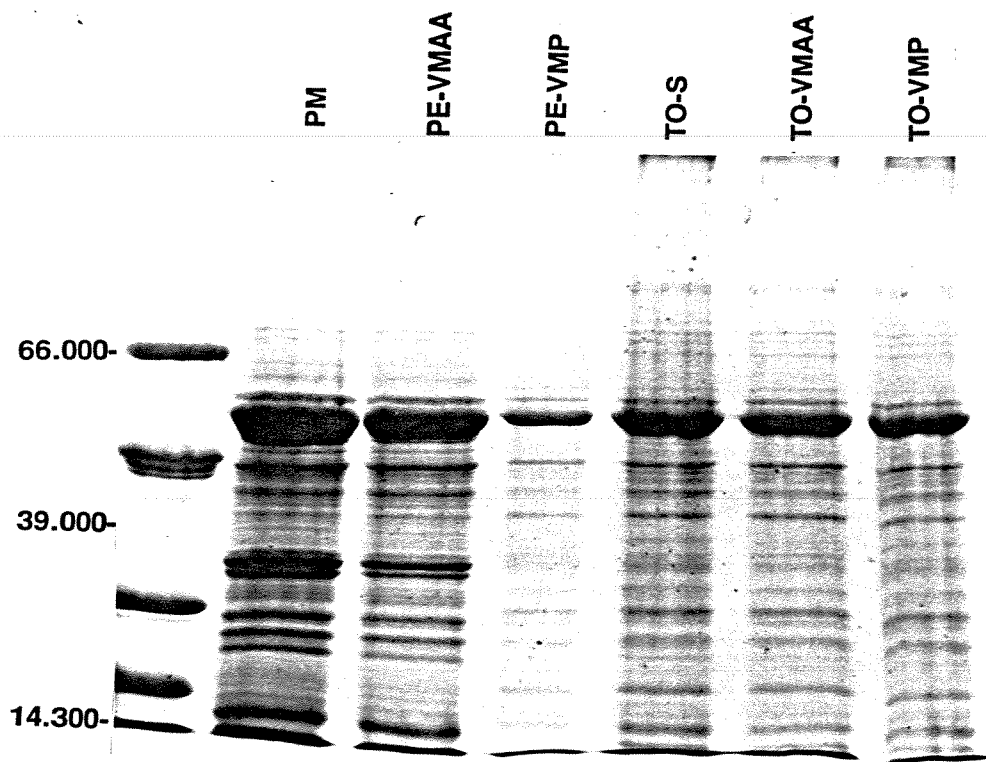


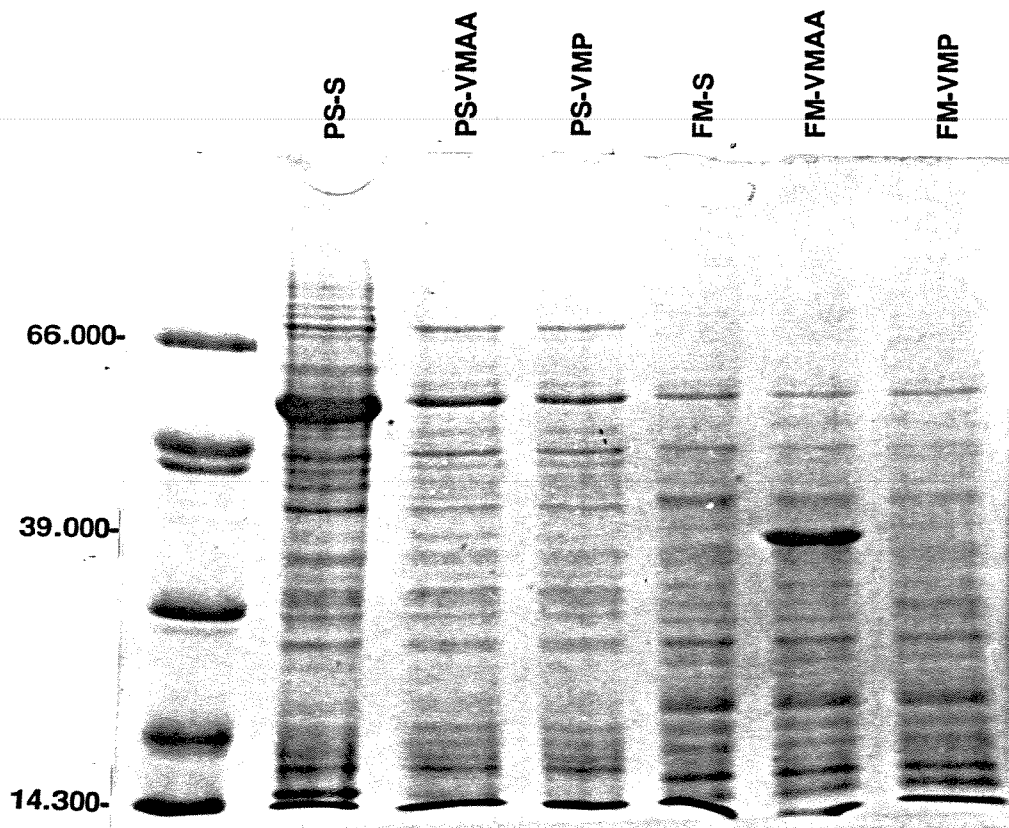
Figura 2. Padrão eletroforético de proteínas totais de cotilédones de pepino (PE) e tomate (TO) saudáveis (s) e infectados com os vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA) e do mosaico do pepino (VMP) mostrando que não houve diferenças entre plantas saudáveis e infectadas.



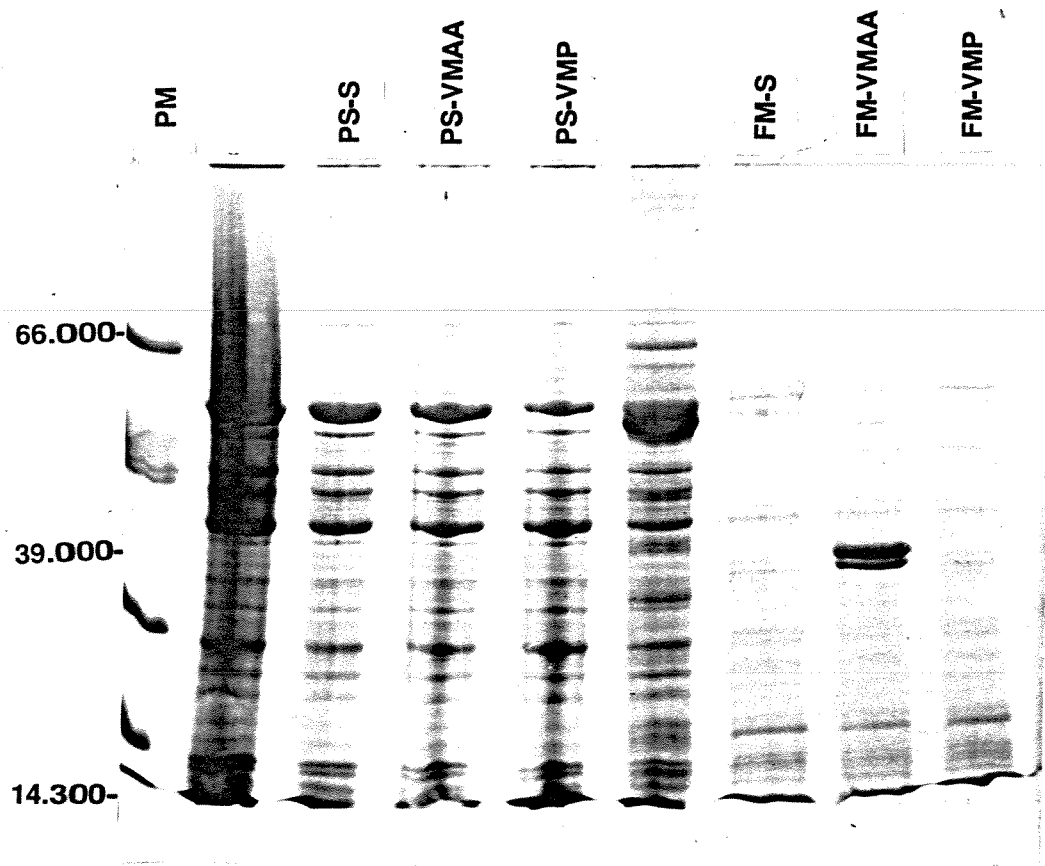
Após a detecção do aparecimento de proteínas nas folhas foram feitas extrações de proteínas solúveis e da fração microssomal e obtidos os perfis eletroforéticos (Fig. 3 a 5).

A fração solúvel não apresentou diferenças entre os padrões proteicos de plantas sadias e infectadas. Na fração microssomal foi detectado aparecimento de proteína com PM 39.000 Da em pepino com VMAA e em tomate com VMP. Essa proteína foi detectada 48 h após a inoculação e o padrão eletroforético manteve-se constante ao longo do tempo.

Figura 3. Padrão eletroforético de proteínas solúveis (PS) e da fração microssomal (FM) de folhas de pepino (PE) sadio (S) e Infectado com os vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA) e do mosaico do pepino (VMP) mostrando o aparecimento da proteína de 39.000 Da. Proteínas extraídas aos 5 (A) e 10 (B) dias após a inoculação.

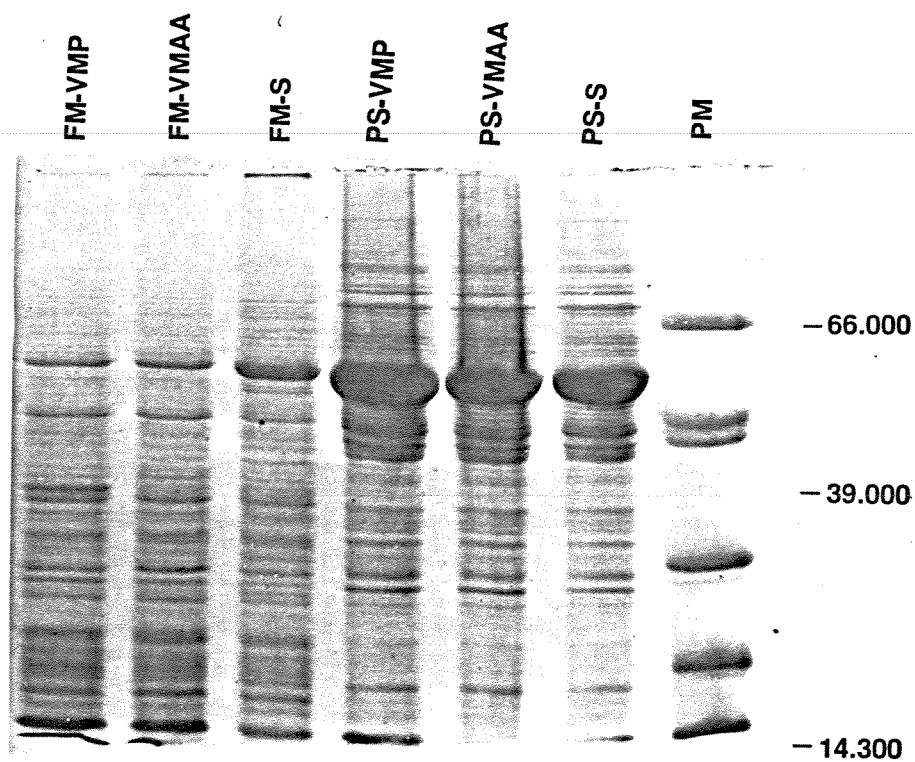


A

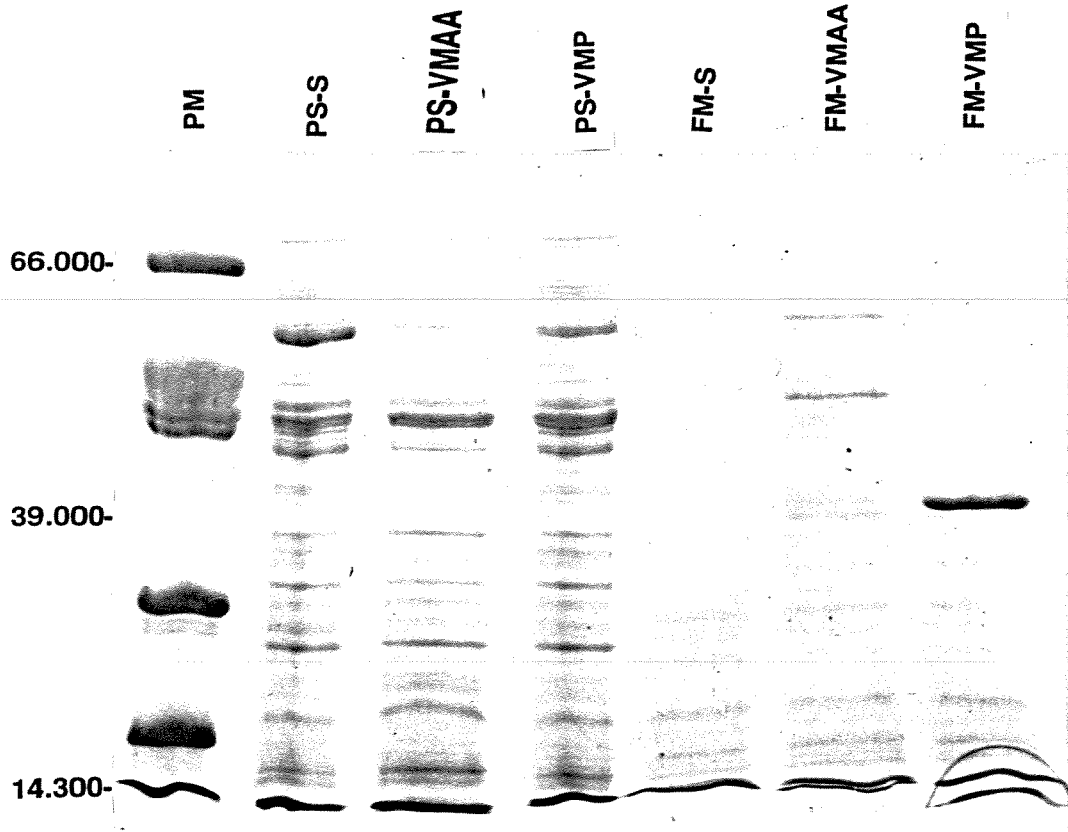


B

Figura 4. Padrão eletroforético de proteínas solúveis (PS) e da fração microsomal (FM) de folhas de tomate (TO) sadio (S) e infectado com os vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA) e do mosaico do pepino (VMP) mostrando o aparecimento da proteína de 39.000 Da. Proteínas extraídas aos 5 (A) e 10 (B) dias após a inoculação.

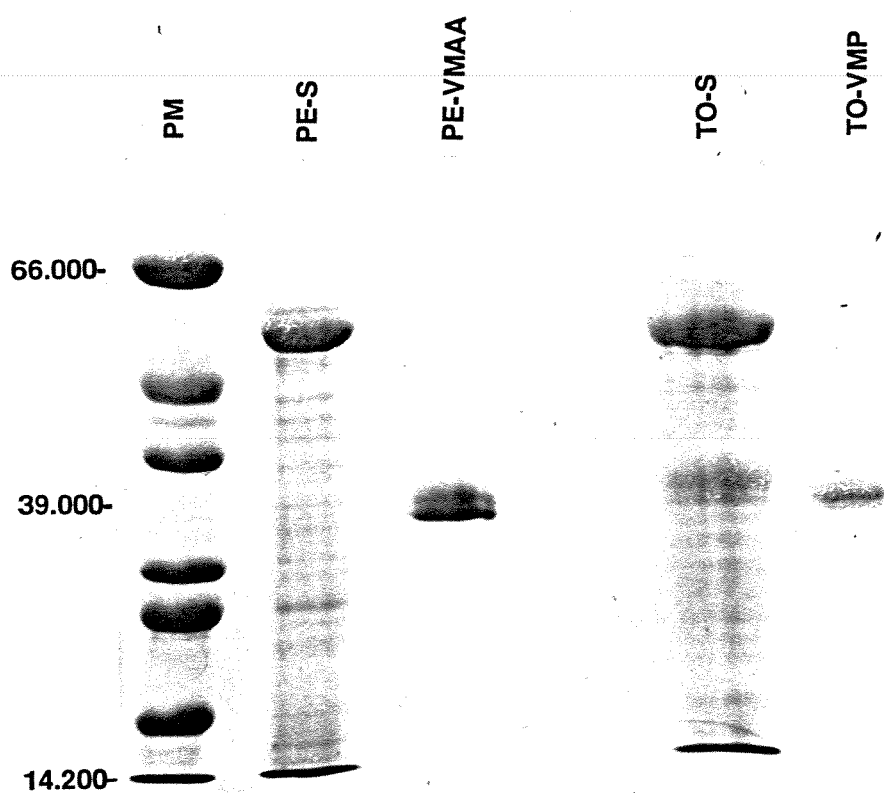


A

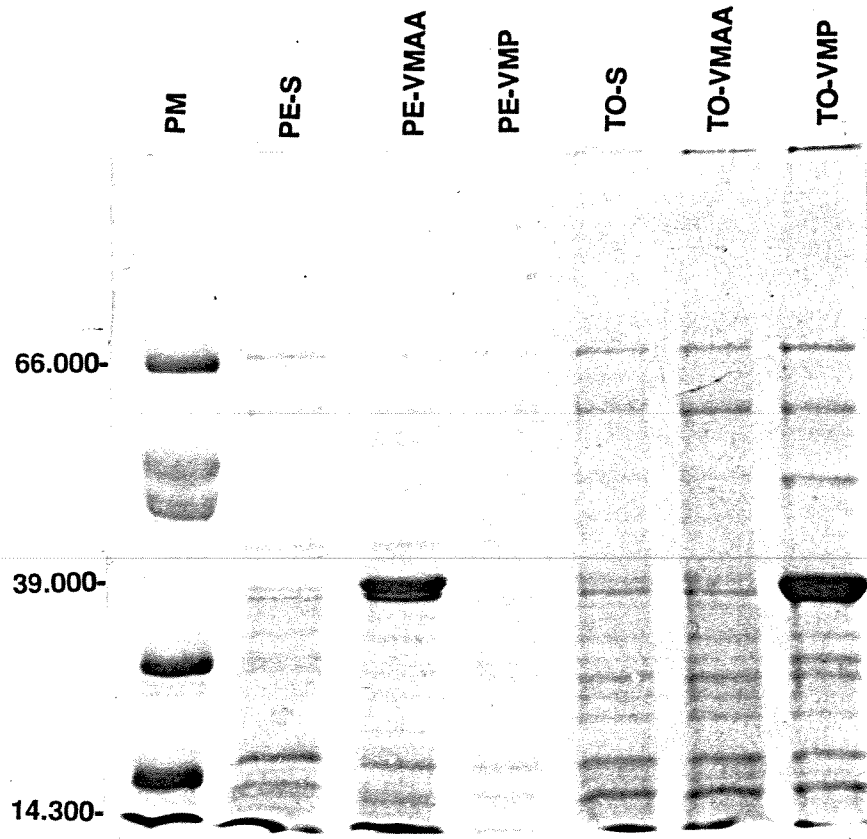


B

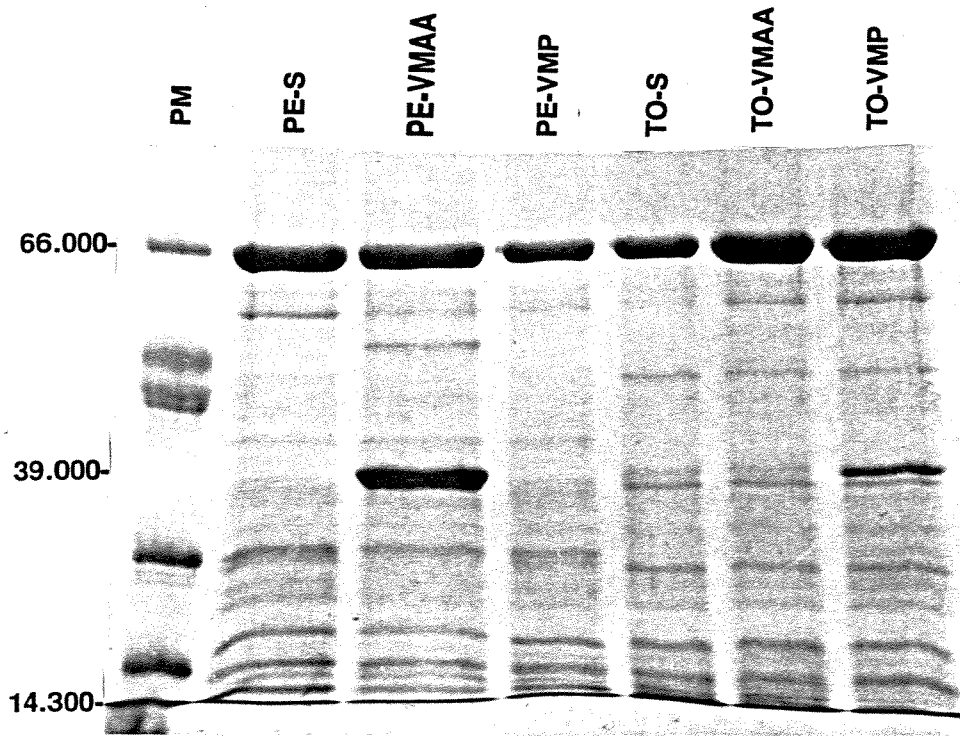
Figura 5. Padrão eletroforético de proteínas da fração microssomal de folhas de pepino (PE) e tomate (TO) sadios (S) e infectados com os vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA) e do mosaico do pepino (VMP) mostrando o aparecimento da proteína de 39.000 Da. Proteínas extraídas 48 h (A), 15 (B) e 20 (C) dias após a inoculação.



A



B



C

Nas plantas de pepino e tomate infectadas por TMV o perfil proteico da fração microsomal não apresentou diferenças entre plantas infectadas e sadias. Na fração solúvel foi verificado aparecimento de proteínas com PM 31.500, 42.500 e 50.500 Da em pepino e com PM 43.500 e 10.300 Da em tomate (Fig. 6 e 7).

Esses resultados indicam que o aparecimento da proteína de PM 39.000 Da em pepino com VMAA e em tomate com VMP está relacionado ao processo de patogênese. O aparecimento dessa proteína não parece ser uma resposta geral ao processo infeccioso, uma vez que o mesmo não foi observado em plantas com TMV.

Figura 6. Padrão eletroforético de proteínas solúveis (PS) e da fração microssomal (FM) de folhas de pepino sadio (S) e infectado com os vírus do mosaico do fumo (TMV) e do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA) mostrando que a proteína de 39.000 Da não aparece nas plantas com TMV.

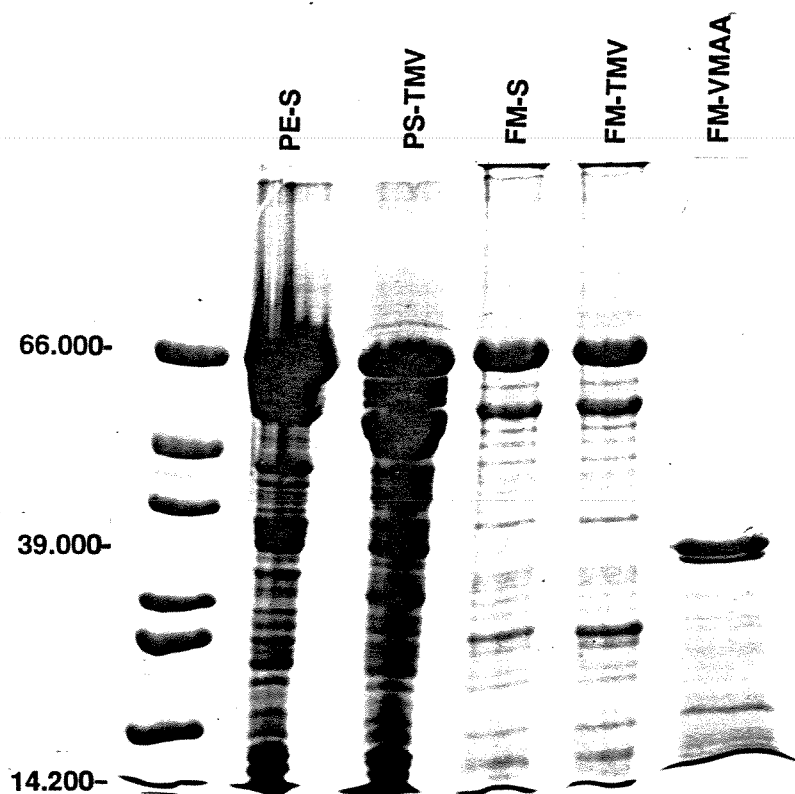
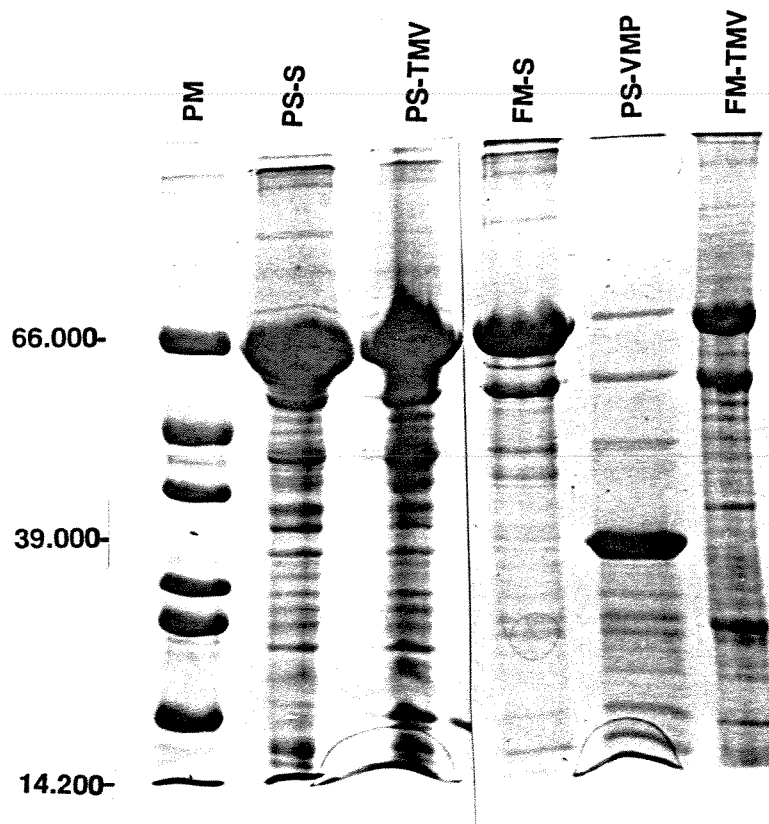


Figura 7. Padrão eletroforético de proteínas solúveis (PS) e da fração microssomal (FM) de folhas de tomate (TO) sadio (S) e infectado com os vírus do mosaico do fumo (TMV) e do mosaico do pepino (VMP) mostrando que a proteína de 39.000 Da não aparece nas plantas com TMV.

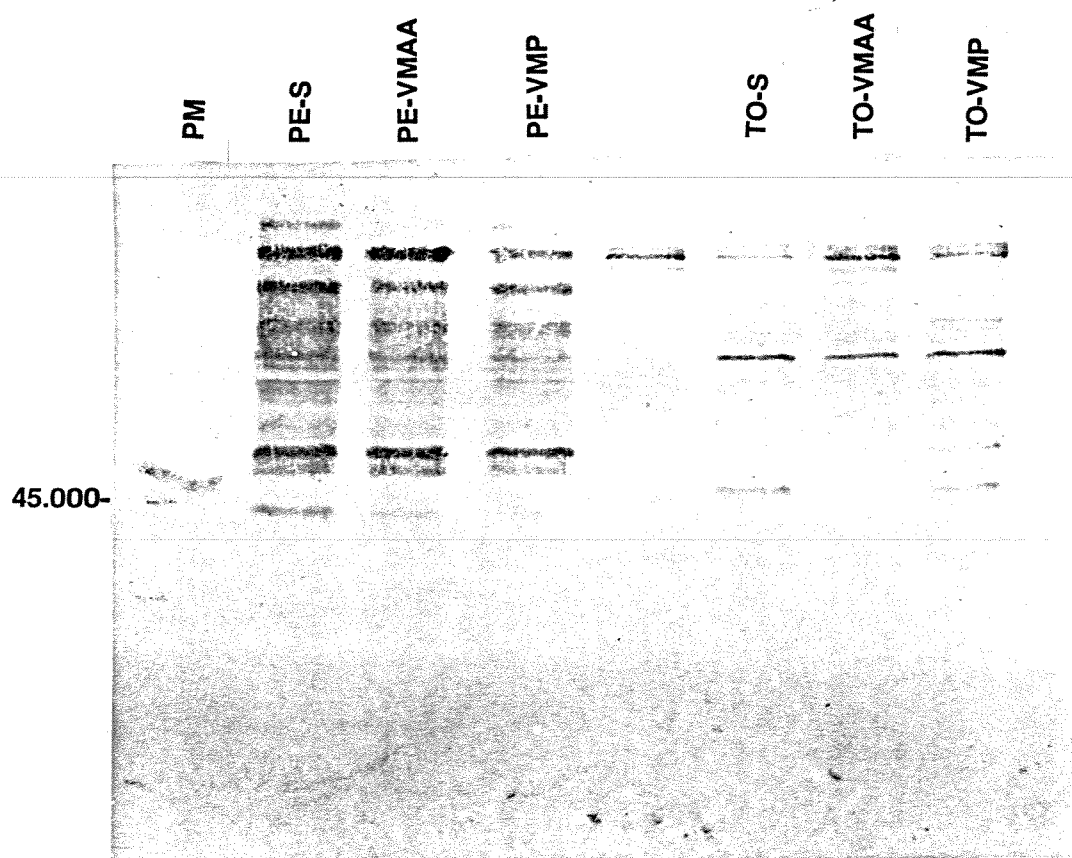


De acordo com a metodologia utilizada foi estabelecido que a proteína de 39.000 Da, que aparece nas plantas infectadas, é proveniente da fração microsomal. Assim, foram feitos alguns testes para uma caracterização preliminar das proteínas acumuladas em pepino com VMAA e em tomate com VMP.

É conhecido que as células vegetais contêm muitas proteínas glicosiladas presentes na membrana celular (GRIMES & BREIDENBACH, 1987), parede celular (CASSAB & VARNER, 1989; VARNER & LIN, 1989; BOWLES, 1990) e em várias organelas como o vacúolo (BOWLES, 1990). A expressão gênica de glicoproteínas da parede celular é regulada pelo desenvolvimento e responde a estímulos exógenos como injúria, infecção por patógeno e tratamentos com fitormônios (CHEN & VARNER, 1985; SHOWALTER *et al.*, 1985; CORBIN *et al.*, 1987; ECKER & DAVIS, 1987; HONG *et al.*, 1990). Assim verificou-se a possibilidade da proteína acumulada em pepino e tomate ser uma glicoproteína.

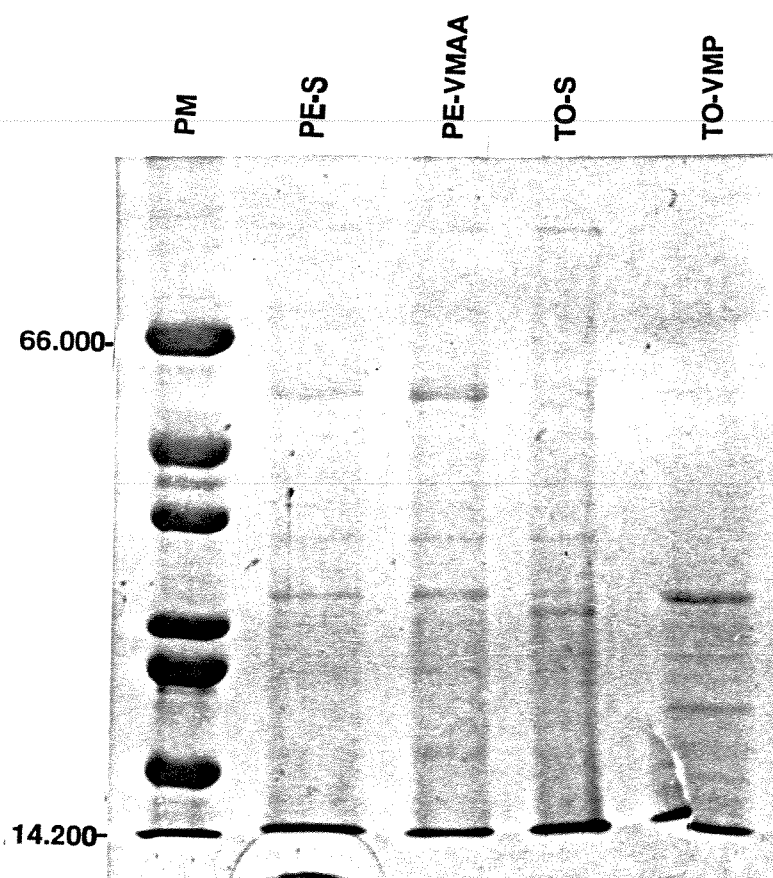
O método utilizado para detecção de glicoproteínas baseia-se na localização destas em membrana de nitrocelulose, depois de terem sido transferidas do gel de eletroforese. A detecção da cadeia de oligossacarídeos ligada a proteínas, após eletroforese, é normalmente feita com o uso de lectinas, sendo a Concanavalina-A (Con-A) a mais comumente usada. Através do procedimento usado, após a incubação sequencial da membrana com Con-A e peroxidase, as glicoproteínas são visualizadas como um produto de reação insolúvel da peroxidase. Segundo FAYE & CHRISPEELS (1985) esse método mostra alta sensibilidade (detecta 1,2 ug de proteína) e especificidade para glicoproteínas de plantas. Os resultados obtidos, com a metodologia utilizada, mostraram que na fração microsomal de pepino e tomate sadios e infectados com VMAA e VMP apenas as proteínas com PM acima de 45.000 Da apresentam reação para glicoproteínas. Sendo assim é provável que a proteína de PM 39.000 Da que aparece nas plantas infectadas não seja glicosilada (Fig. 8).

Figura 8. Glicoproteínas da fração microssomal de folhas de pepino (PE) e tomate (TO) sadios (S) e infectados com os vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA) e do mosaico do pepino (VMP).



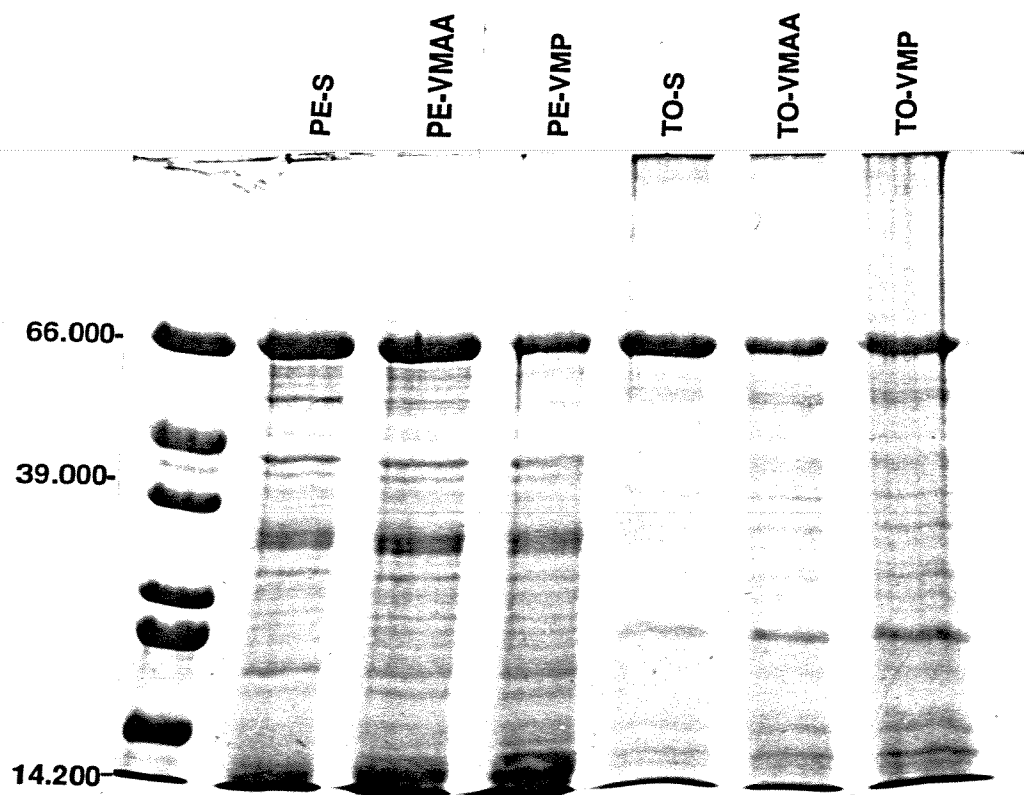
Outra hipótese testada foi da proteína acumulada estar presente no fluido intercelular, uma vez que o apoplasto representa o local comum de ataque da planta por vários patógenos (PARENT & ASSELIN, 1984; HOLDEN & ROHRINGER, 1985; ROGGERO & PENNAZIO, 1989; BOWLES, 1990). As substâncias do espaço intercelular das folhas têm sido alvo de estudo em vários campos da biologia vegetal, especialmente para pesquisar a atividade de síntese da parede celular e as interações compatíveis e incompatíveis entre patógenos foliares e o hospedeiro (ROHRINGER *et al.*, 1983). As substâncias dissolvidas na água livre nesses espaços ou aquelas ligadas fracamente à parede celular podem ser obtidas em preparações do fluido intercelular, sem a contaminação de substâncias de outros compartimentos foliares. Os resultados obtidos mostram que a proteína acumulada em pepino com VMAA e em tomate com VMP não está no fluido intercelular (Fig. 9).

Figura 9. Padrão eletroforético de proteínas do fluido Intercelular de folhas de pepino (PE) sadio (S) e Infectado com o vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-molita (VMAA) e tomate (TO) sadio (S) e Infectado com o vírus do mosaico do pepino (VMP) mostrando que a proteína de 39.000 Da não está presente no fluido Intercelular.



A seguir foram analisadas as proteínas da parede celular (Fig. 10). Através do padrão proteico obtido não foram verificadas diferenças entre plantas sadias e infectadas. Não foi observado aparecimento da proteína de PM 39.000 Da. Assim pode-se inferir que a proteína acumulada em pepino com VMAA e em tomate com VMP não participa da formação, bem como não representa um produto de exportação da parede celular. Modificações proteicas na parede celular poderiam ter sido obtidas, pois alterações desta são os primeiros fenômenos que devem ocorrer na interação planta-patógeno e foi demonstrado que essas alterações ocorrem após indução de lesões locais (PARENT & ASSELIN, 1984) e estão relacionadas com a resposta de aquisição de resistência (HAMMERSCHMIDT *et al.*, 1985), além de seu provável papel na detenção de patógenos e na interação célula-célula (PEARCE & RIDE, 1980).

Figura 10. Padrão eletroforético de proteínas da parede celular de folhas de pepino (PE) e tomate (TO) saudáveis (S) e infectados com os vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA) e do mosaico do pepino (VMP) mostrando que a proteína de 39.000 Da não está nessa fração.



Através do fracionamento das proteínas da fração microsomal por KCl 1 M (Fig. 11) e por Triton X-114 (Fig. 12) foi verificado que a proteína de 39.000 Da, que aparece em pepino com VMAA e tomate com VMP é uma proteína externa das membranas microsomais, sendo provavelmente hidrofílica.

Figura 11. Padrão eletroforético de proteínas extraídas por KCl 1 M da fração microssomal de pepino (PE) e tomate (TO) sadios (S) e infectados com os vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA) e do mosaico do pepino (VMP).

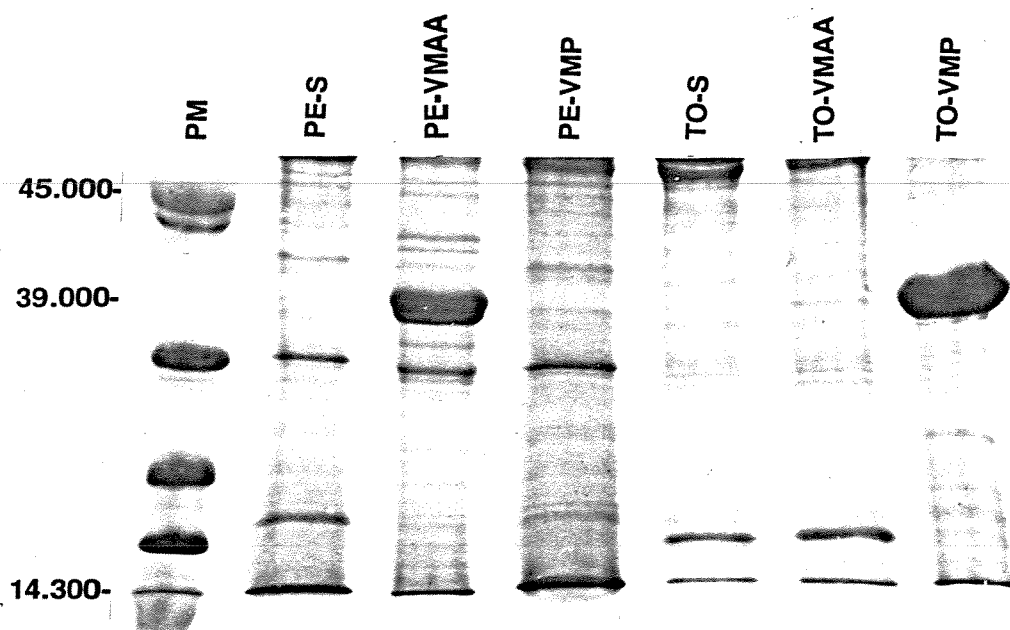
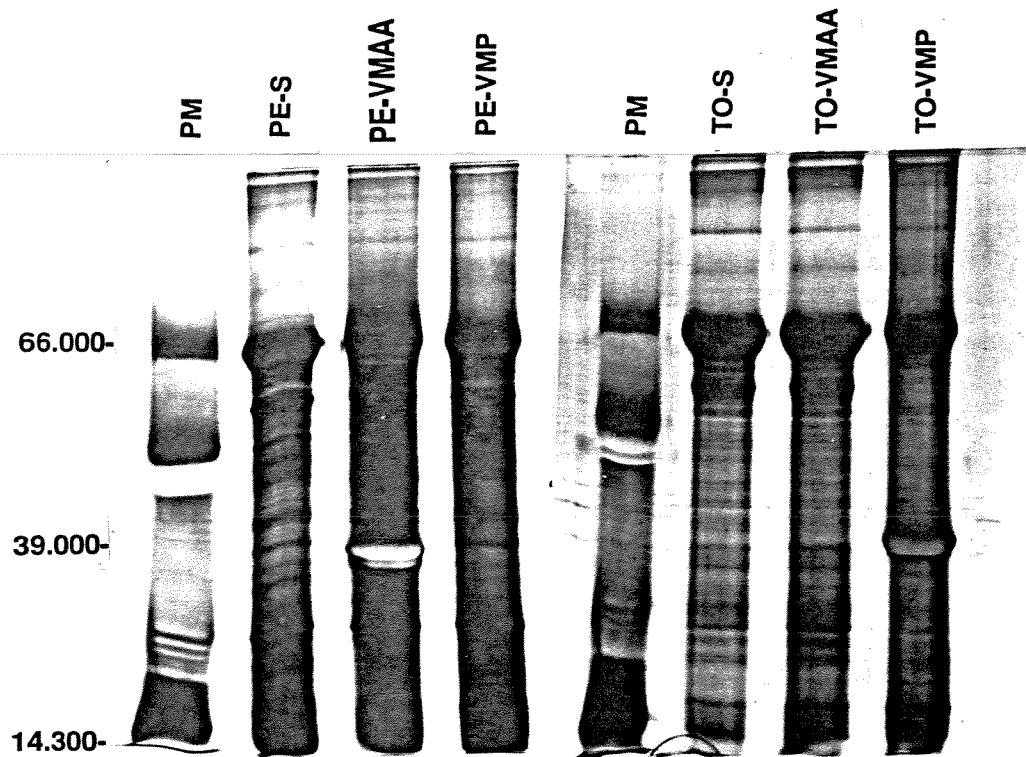


Figura 12. Padrão eletroforético de proteínas externas, obtidas por Triton X-114, da fração microssomal de folhas de pepino (PE) e tomate (TO) sadios (S) e infectados com os vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA) e do mosaico do pepino (VMP).



Verificou-se a possibilidade da proteína de PM 39.000 Da , que aparece na fração microsomal de pepino e tomate, ser uma peroxidase.

As peroxidases são enzimas que utilizam H_2O_2 e estão envolvidas em processos fisiológicos de oxidação. Têm sido muito estudadas em plantas superiores e sua atividade e padrão de isoenzimas estão correlacionados com vários processos de crescimento, desenvolvimento e defesa. Em relação aos mecanismos de defesa as peroxidases participam da depuração de H_2O_2 , síntese de suberina e lignina e formação de ligações intermoleculares. É provável que as peroxidases estejam também envolvidas em outros processos como a inativação de enzimas do hospedeiro e do patógeno , por oxidação de fenóis (VAN HUUSTEE, 1987; BOWLES, 1990).

As informações disponíveis sobre alterações da expressão dos genes da peroxidase são indiretas e envolvem alterações no padrão de isoenzimas. A abundância de isoenzimas específicas varia em infecções sistêmicas e locais e não está limitada ao local da infecção, mas pode ocorrer a distância, como no caso de batata com raízes infectadas por nematóides dos cistos. Nessas plantas muitas proteínas PR aparecem nas folhas e algumas foram identificadas como tendo atividade peroxidásica (PARENT *et al.*, 1985).

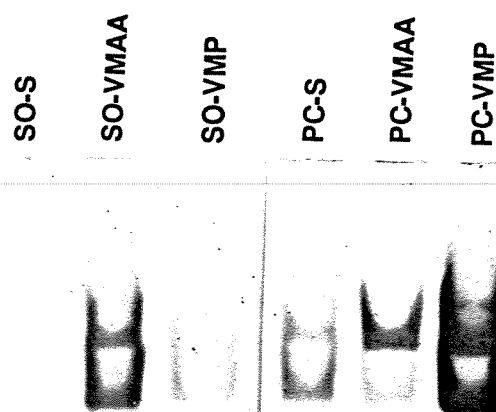
No presente trabalho foram analisadas, por eletroforese nativa, as peroxidases, de pepino e tomate, solúveis e da parede celular que utilizam guaiacol como substrato. O padrão eletroforético não mostrou isoenzimas diferentes (Fig. 13 e 14). Esses resultados mostram que provavelmente a proteína de 39.000 Da não é guaiacol peroxidase, pois se assim fosse, tanto pepino com VMAA como tomate com VMP deveriam apresentar uma ou mais isoenzimas diferentes dos controles

Foi observado, pela intensidade das bandas, que muito embora não tenham ocorrido isoenzimas diferentes, houve aumento de atividade de isoenzimas específicas tanto na fração solúvel como da parede celular em pepino e tomate infectados.

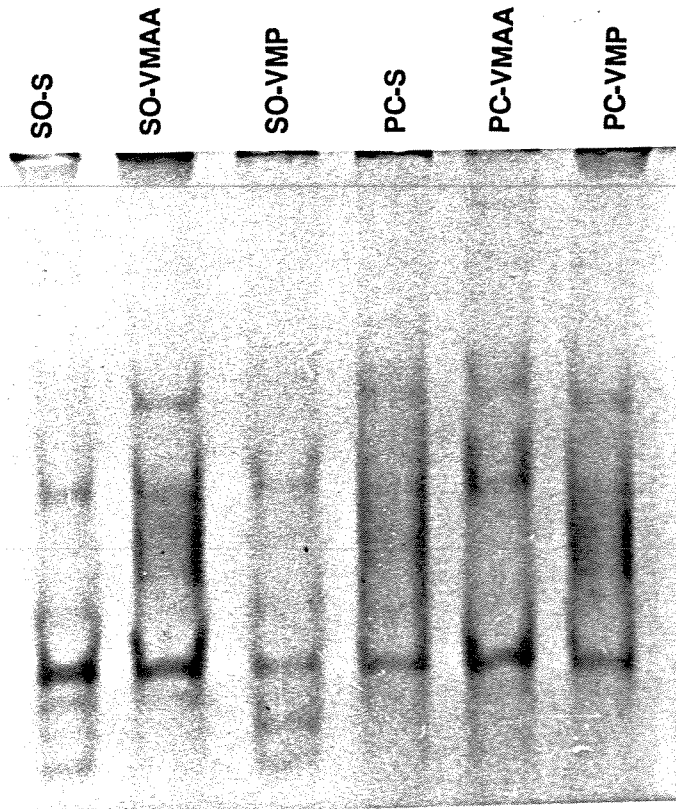
Aumento da atividade peroxidásica tem sido detectado em várias plantas infectadas com vírus, fungos e sob ação de hormônios vegetais (MATILE, 1980; ROHRINGER *et al.*, 1983; HAMMERSCHMIDT *et al.*, 1985; YAMAUCHE & MINAMIDE, 1985; LAGRIMINI & ROTHSTEIN, 1987; SMITH & HAMMERSCHMIDT, 1988). Nos processos patogênicos as peroxidases certamente são importantes para o reforço da parede celular após a penetração do patógeno, podendo atuar na contenção deste (LAGRIMINI & ROTHSTEIN, 1987). HAMMERSCHMIDT *et al.* (1985) apresentaram evidências da lignificação das células epidérmicas e aumento da atividade de peroxidases como resposta comum em cucurbitáceas infectadas por fungos. PARENT *et al.* (1985) também demonstraram o envolvimento das peroxidases no restabelecimento de lesões e na resistência do fumo a viroses.

No presente trabalho fica também evidenciado que as peroxidases estão sendo afetadas pelo processo patogênico. Assim é possível que o aumento da atividade peroxidásica da parede celular esteja envolvido com a penetração do patógeno e o aumento da atividade da fração solúvel pode estar envolvido no catabolismo de várias substâncias. Segundo alguns pesquisadores (MATILE, 1980; YAMAUCH & MINAMIDE, 1985; ABELES *et al.*, 1988) ocorre aumento da atividade das peroxidases nos processos de senescência e estas enzimas estão envolvidas nos processos de degradação da clorofila. É possível que as peroxidases participem do processo de clorose induzido nas plantas pelos vírus estudados. É também possível que essas enzimas participem da remoção de substâncias indesejáveis ou como oxidases gerais, catabolizando clorofilas e outros componentes celulares de modo não específico.

Figura 13. Padrão eletroforético de peroxidases solúveis (SO) e da parede celular (PC) de folhas de pepino sadio (S) e 15 dias após a inoculação com os vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA) e do mosaico do pepino (VMP).



14. Padrão eletroforético de peroxidases solúveis (SO) e da parede celular (PC) de folhas de tomate sadio (S) e 15 dias após a Inoculação com os vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA) do mosaico do pepino (VMP).



Com base nos resultados obtidos no presente trabalho fica excluída a possibilidade da proteína com PM 39.000 Da ser originada pela injúria da planta, pois esta proteína não foi detectada em plantas saudáveis, em plantas com TMV, em pepino com VMP e tomate com VMAA.

A hipótese de ser uma proteína viral também fica excluída, pois ocorre em pepino com VMAA e tomate com VMP, sendo portanto, induzidas por dois vírus diferentes. Esses vírus além de pertencerem a grupos distintos, apresentam forma e genoma diferentes e não são serologicamente relacionados. Além desses fatos, o anticorpo contra o VMAA não reagiu com a proteína de 39.000 Da que aparece em pepino e tomate, mas apresentou reação com o extrato de plantas infectadas por este vírus (Fig. 15). Nos testes realizados nesse trabalho, as proteínas induzidas em pepino com VMAA e em tomate com VMP apresentaram sempre as mesmas características e mais conclusivamente na eletroforese bidimensional (Fig. 16). Nesse caso foi demonstrado que ambas proteínas apresentam a mesma carga elétrica e o mesmo número de isoformas, aparecendo como uma mancha única, quando corridas no mesmo gel. Esses resultados indicam que as proteínas de pepino e tomate apresentam as mesmas características, muito embora pequenas variações possam ocorrer.

Figura 15. "Immunoblotting" das proteínas de 39.000 Da (39) e da fração microssomal de pepino (PE) e tomate (TO) infectados com o vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA) tratadas com anticorpo anti-VMAA.

PE-S
PE-VMAA
PE-39
TO-S
TO-39
TO-VMAA

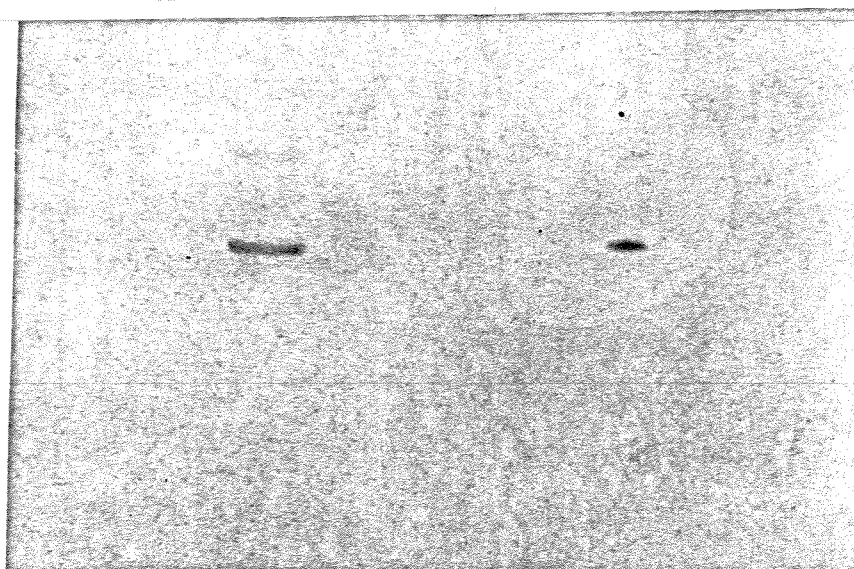
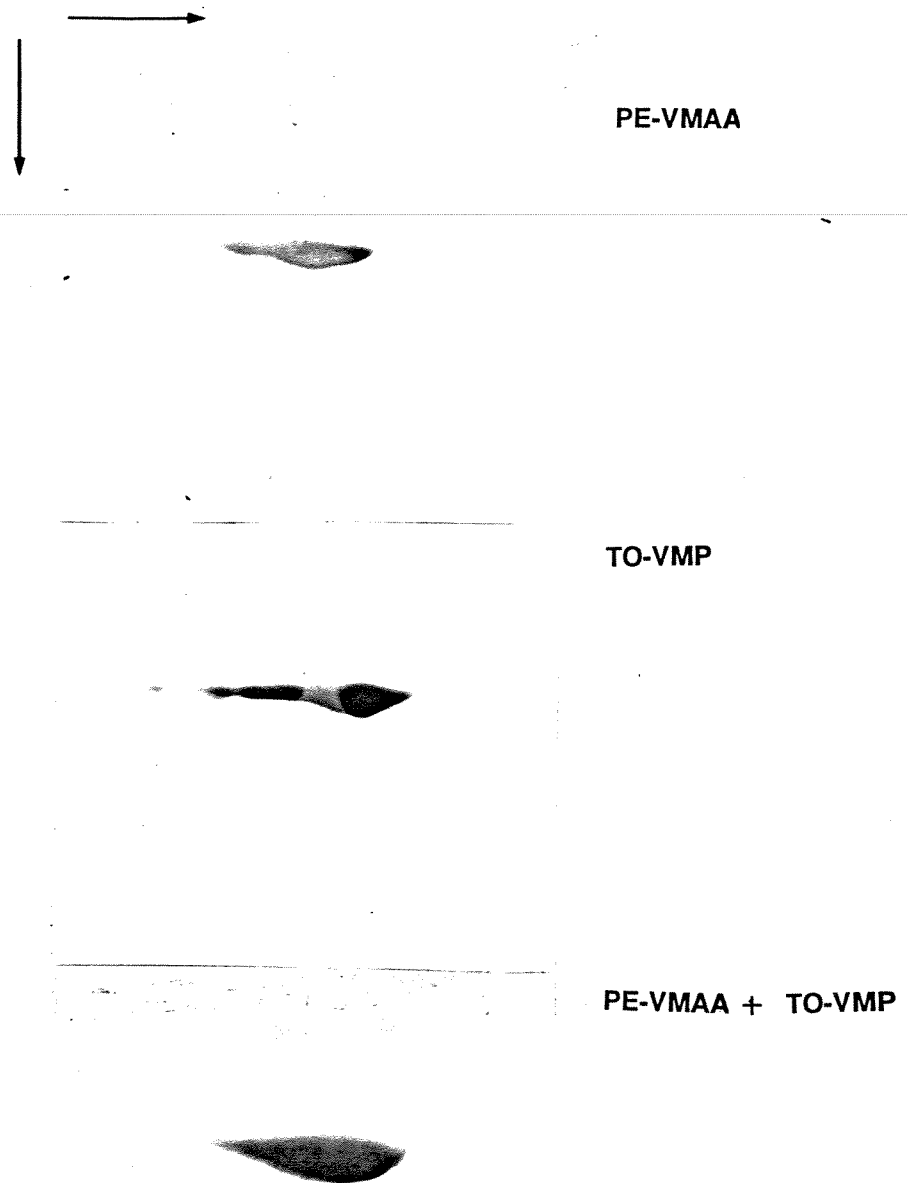


Figura 16. Padrão eletroforético bidimensional da proteína de PM 39.000 Da da fração microssomal de pepino com vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-molta (PE-VMAA) e tomate com vírus do mosaico do pepino (TO-VMP). A seta horizontal indica a primeira dimensão e a seta vertical indica a segunda dimensão.



Assim é provável que a proteína de PM 39.000 Da seja codificada pelo hospedeiro. Pode ser postulado que seu aparecimento em pepino com VMAA e em tomate com VMP seja uma reação geral da planta, baseada na ativação patogênica não-específica do gene que codifica esta proteína. Esse gene poderia estar sob controle estrito no tecido sadio. Resultados similares foram obtidos em vários trabalhos com o salicilato, um composto fenólico conhecido por induzir resistência em plantas contra infecção por vírus. As bases moleculares do fenômeno não são conhecidas. Em algumas plantas o salicilato induz o aparecimento de proteínas PR, como aquelas geralmente obtidas por infecções viróticas que causam necrose (HOOF VAN HUIJSDUIJNEN *et al.*, 1986; PENNAZIO *et al.*, 1987; VERA & CONEJERO, 1989), enquanto que em outras plantas as proteínas PR não são induzidas pelo salicilato (PENNAZIO & REDOLFI, 1980; CHRIST & MOSINGER, 1989; FISCHER *et al.*, 1989; ROGGERO & PENNAZIO, 1990).

A proteína de PM 39.000 Da pode ser um componente estrutural da célula hospedeira, na qual os sintomas da doença são expressos como aparecimento de proteína. Os processos infecciosos e de senescência são acompanhados por distúrbios da permeabilidade da parede celular e alterações de organelas celulares (WAHN *et al.*, 1980 a). Este fenômeno geral e o fato da proteína acumulada em pepino com VMAA e em tomate com VMP ser uma proteína da fração microssomal, indica que ela pode estar sendo liberada pelo microssoma, em função da alteração causada pelo processo infeccioso nessas organelas. As alterações pronunciadas da membrana de organelas e celular, detectadas pela análise citopatológica de vários tecidos infectados (WAHN *et al.*, 1980 a; b; ROSEMBERG DE GOMEZ *et al.*, 1982), dariam suporte a esta hipótese.

Finalmente é ainda possível que a proteína de PM 39.000 Da seja sintetizada "de novo" durante o desenvolvimento da doença, como uma resposta ativa da planta hospedeira à infecção, segundo proposto por GIANINAZZI & MARTIN (1975) e VAN LOON (1981).

Trabalhos posteriores como purificação, obtenção de anticorpos contra a proteína e sequenciamento serão necessários para estabelecer o local e o provável mecanismo pelo qual essas proteínas são acumuladas em pepino com VMAA e em tomate com VMP.

4.2. Ressonância magnética nuclear

Na literatura são encontradas referências sobre os valores dos desvios químicos em espectros de RMN ^{31}P , característicos de compostos contendo fósforo (Fig. 17). Os valores dos desvios químicos podem variar de acordo com as condições experimentais estabelecidas, porém, não ocorre variação em função do campo magnético aplicado.

A análise "in vivo" de folhas de pepino com 1,5 cm de comprimento permitiu detectar a presença de glicose-6-fosfato, açúcares fosfato, fosfato vacuolar e fosfato citoplasmático. Nas plantas infectadas com vírus ocorreu aparecimento de fosfato no vacúolo e no citoplasma. Houve diminuição do conteúdo de açúcares-fosfato, sobretudo nas plantas com VMP (Fig. 18). Não foi observado variação do pH intracelular, uma vez que os picos de fosfato citoplasmático e vacuolar apresentaram a mesma frequência de ressonância tanto nas plantas de pepino sadio como infectados com VMAA e VMP. Tendo em vista que os compartimentos celulares permanecem intactos durante a análise "in vivo", a distinção entre fosfato citoplasmático e vacuolar é possível devido à diferença de pH que ocorre naturalmente entre esses dois compartimentos celulares.

Os espectros de extratos de folhas de pepino preparados 5 dias após a inoculação dos vírus apresentaram alguns picos. Da mesma forma que a análise "in vivo", a análise de extratos revelou que ocorre aparecimento de fosfato e diminuição de açúcares-fosfato nas plantas infectadas (Fig. 19). A identificação dos picos foi feita com a utilização de compostos-padrão, os quais foram adicionados às amostras analisadas por RMN.

Figura 17. Alguns compostos presentes em espectros de RMN-³¹P.

COMPOSTOS	DESVIO QUÍMICO (ppm)
comp. contendo P	-5 a 20
comp. contendo ácido fosfônico	-10 a -30
açúcares fosfato	3 a 4
fosfodiéster	-0,6 a -0,4
ácido nucleico, fosfolipídeos	-0,5 a 0,5
pirofosfato	4,8
polifosfato	23

Figura 18. Espectro de RMN- ^{31}P "in vivo" de folhas de pepino (PE) sadio (S) e infectado com os vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA) e do mosaico do pepino (VMP). 1.glicose-6-fosfato; 2.açúcares fosfato; 3.fosfato citoplasmático; 4.fosfato vacuolar.

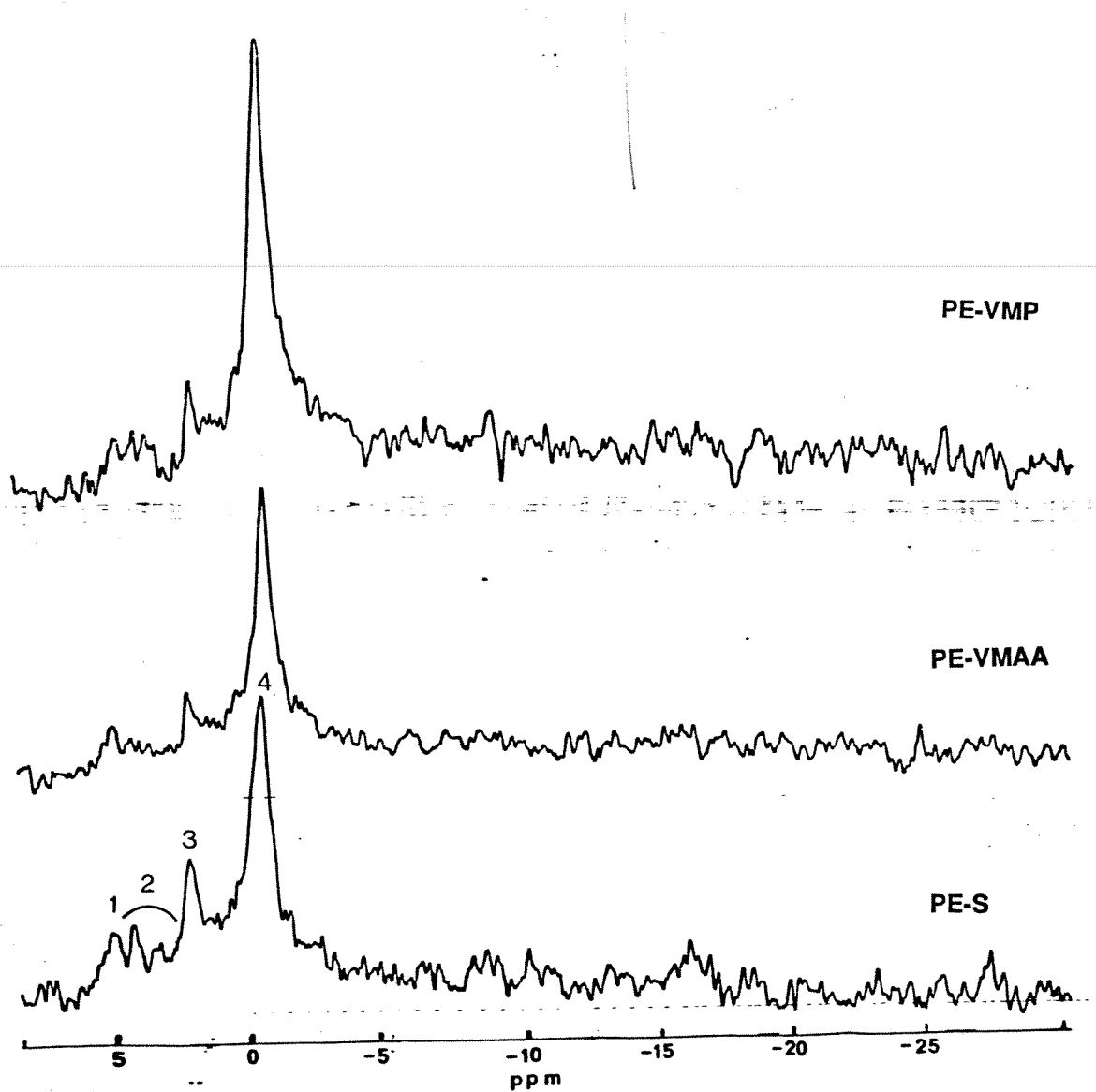
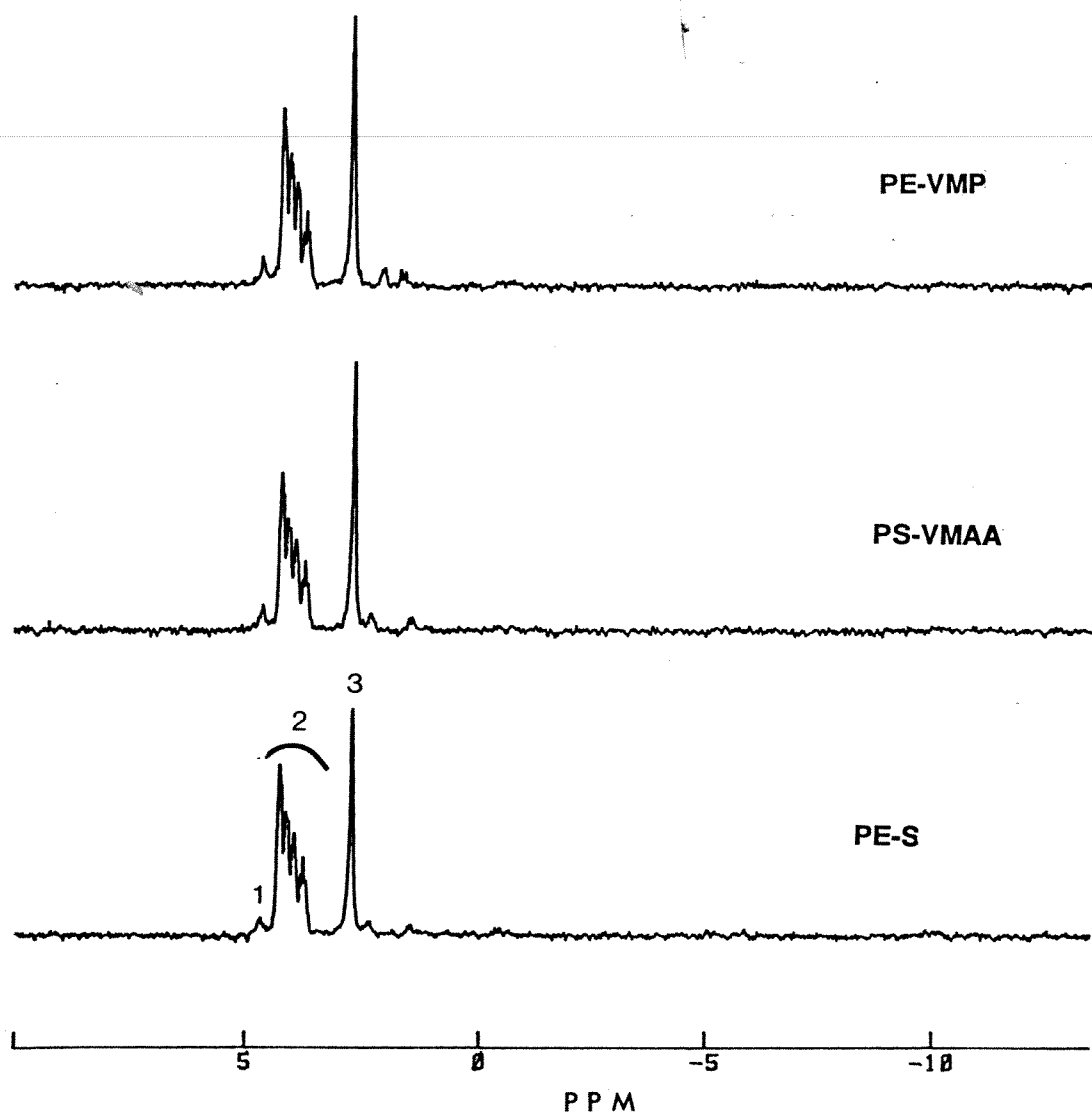
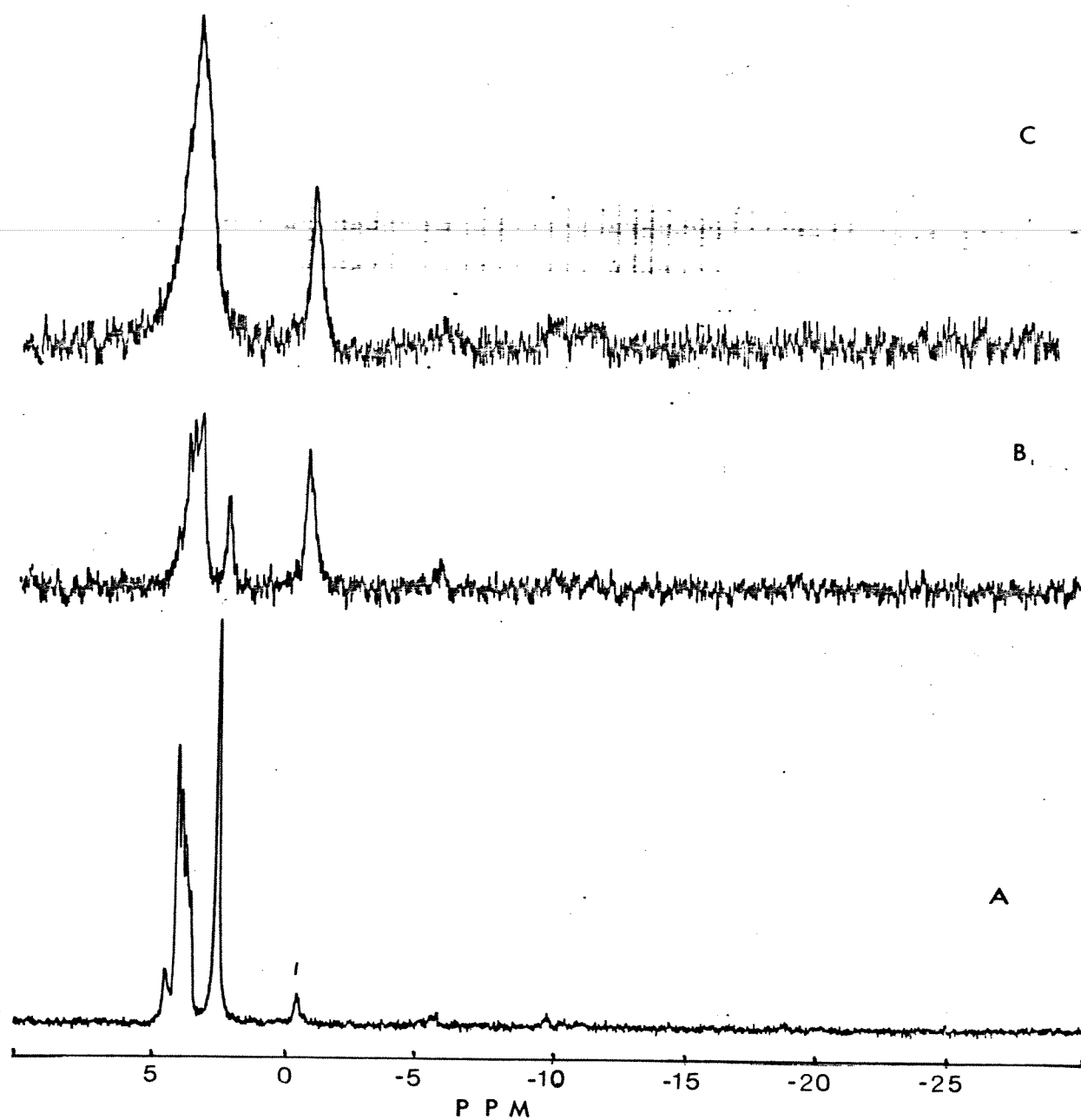


Figura 19. Espectro de RMN- ^{31}P de extratos de folhas de pepino (PE) sadio (S) e 5 dias após a inoculação com os vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA) e do mosaico do pepino (VMP). 1.glicose-6-fosfato; 2.açúcares fosfato; 3.fosfato inorgânico.



Foram obtidos espectros bem resolvidos apenas para extratos preparados com folhas e cotilédones de pepino aos 5 dias após a inoculação dos vírus. O espectro de extratos de folhas com 10 dias após a inoculação (Fig. 20) apresentou picos sobrepostos e alargados tendo sido determinados fosfomonoésteres, não observados nos extratos com 5 dias. Os espectros de extratos de folhas aos 15 dias após a inoculação apresentaram uma resolução muito ruim, tendo sido identificados apenas dois picos muito alargados a 3,67 ppm e -0,67 ppm (Fig. 20).

Figura 20. Espectro de RMN- ^{31}P de extratos de folhas de pepino aos 5 (A), 10 (B) e 15 (C) dias após a inoculação com o vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA).



Não foi possível fazer um estudo de RMN-³¹P ao longo do tempo, pois foram obtidos espectros bem resolvidos apenas com extratos de cotilédones e folhas de pepino e folhas de tomate aos 5 dias após a inoculação de VMAA e VMP. Também não foi possível obter espectros "in vivo" de folhas de tomate e de cotilédones de pepino e tomate. Nesses casos o espectro obtido continha um único sinal extremamente alargado. Esses resultados podem estar relacionados ao aparecimento de íons, os quais se comportam como espécies paramagnéticas, provocando alargamento dos picos.

Os efeitos de sobreposição e alargamento dos picos também foram observados quando o extrato foi preparado com quantidades maiores que 2,5 g de folha ou cotilédone (Fig. 21 e 22).

Figura 21. Espectros de RMN- ^{31}P de extratos preparados com 5g de cotilédones de pepino (PE) sadio (S) e aos 5 dias após a inoculação com os vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA) e do mosaico do pepino (VMP).

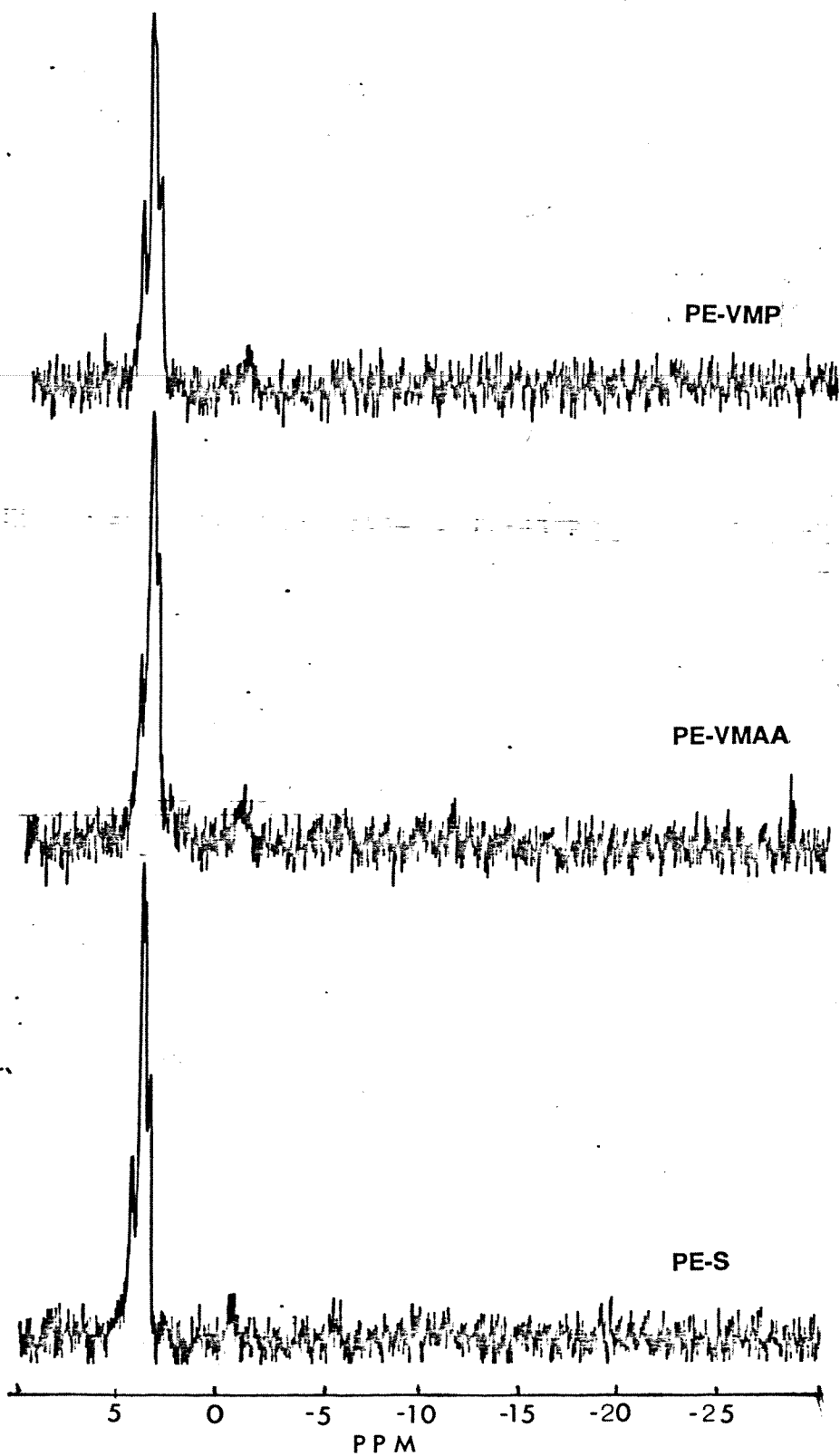
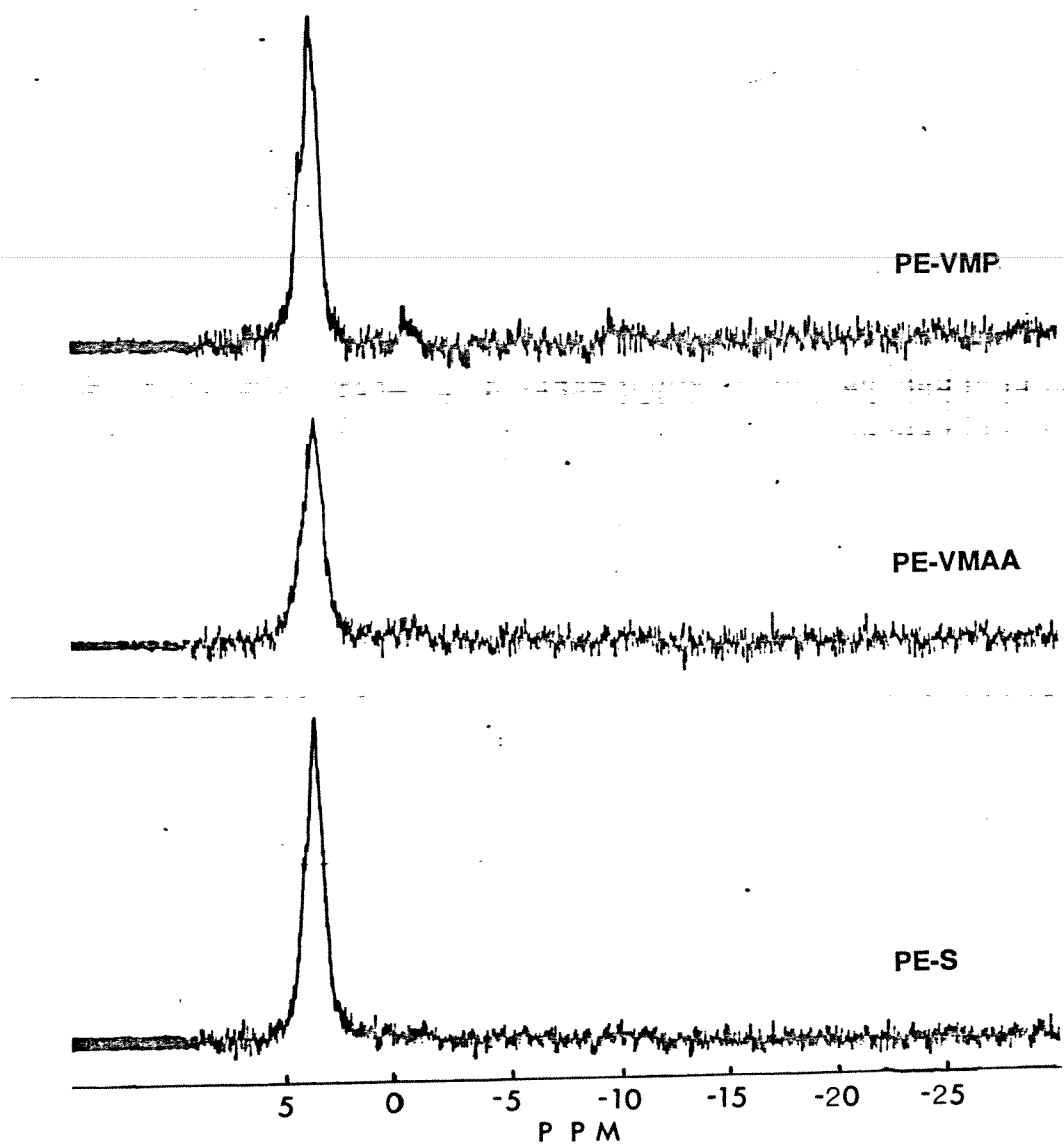


Figura 22. Espectros de RMN- ^{31}P de extratos preparados com 10g de cotilédones de pepino (PE) sadio (S) e aos 5 dias após a inoculação com os vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-molha (VMAA) e do mosaico do pepino (VMP).



As preparações com 2,5 g de folhas ou cotilédones de pepino resultaram em espectros bem resolvidos como mostrado na Fig. 19. Os espectros de extratos preparados com 5 g de cotilédones de pepino mostraram três regiões predominantes com frequências de ressonância de 4,40 ppm, 3,85 ppm e 3,51 ppm. Os espectros de extratos preparados com 10 g de cotilédones de pepino apresentaram-se muito alargados, sendo identificado um único pico com frequência de ressonância de 3,88 ppm.

Esses resultados podem estar relacionados com a quantidade de espécies paramagnéticas na amostra. Assim, tanto a idade da planta como a quantidade de tecido utilizado para o preparo do extrato são importantes para a obtenção de espectros bem resolvidos.

O espectro de cotilédones de pepino mostrou a presença de glicose-6-fosfato, açúcares fosfato, fosfato inorgânico e fosfodiésteres (Fig. 23). Os resultados mostram que nos cotilédones há menor teor de açúcar e a relação entre fosfato e açúcares é maior do que nas folhas. Nos cotilédones infectados também ocorre aparecimento de fosfato e diminuição dos açúcares-fosfato.

Nas preparações com 50 mM de EDTA foram obtidos picos com melhor resolução, porém, houve diminuição do teor de açúcares-fosfato e aumento de fosfato inorgânico (Fig. 24).

Figura 23. Espectro de RMN- ^{31}P de extratos de cotilédones de pepino (PE) sadio (S) e 5 dias após a inoculação com os vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA) e do mosaico do pepino (VMP). Os extratos contêm 10 mM de EDTA. 1.glicose-6-fosfato; 2.açúcares fosfato, 3.fosfato inorgânico; 4.fosfoliósteres.

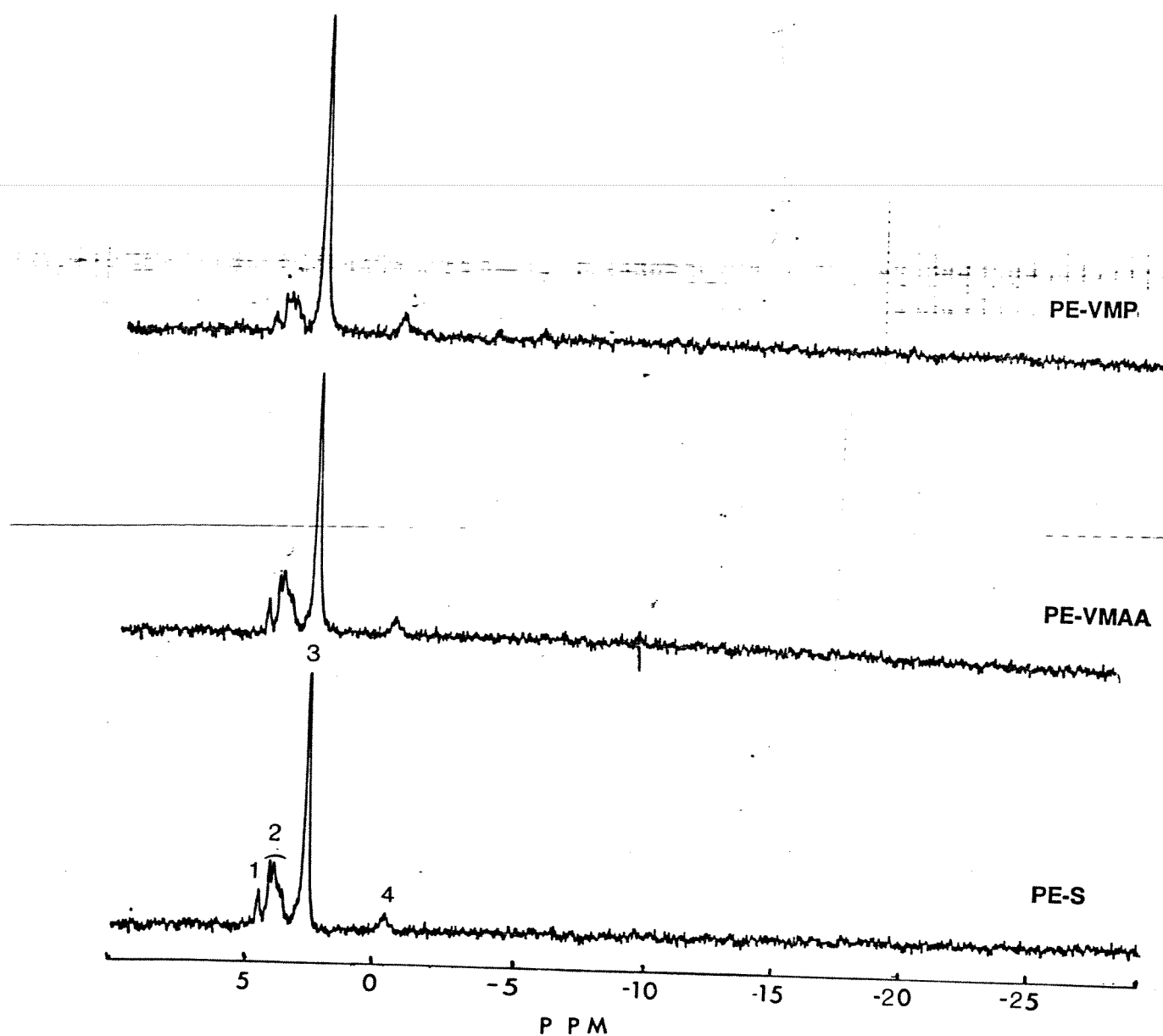
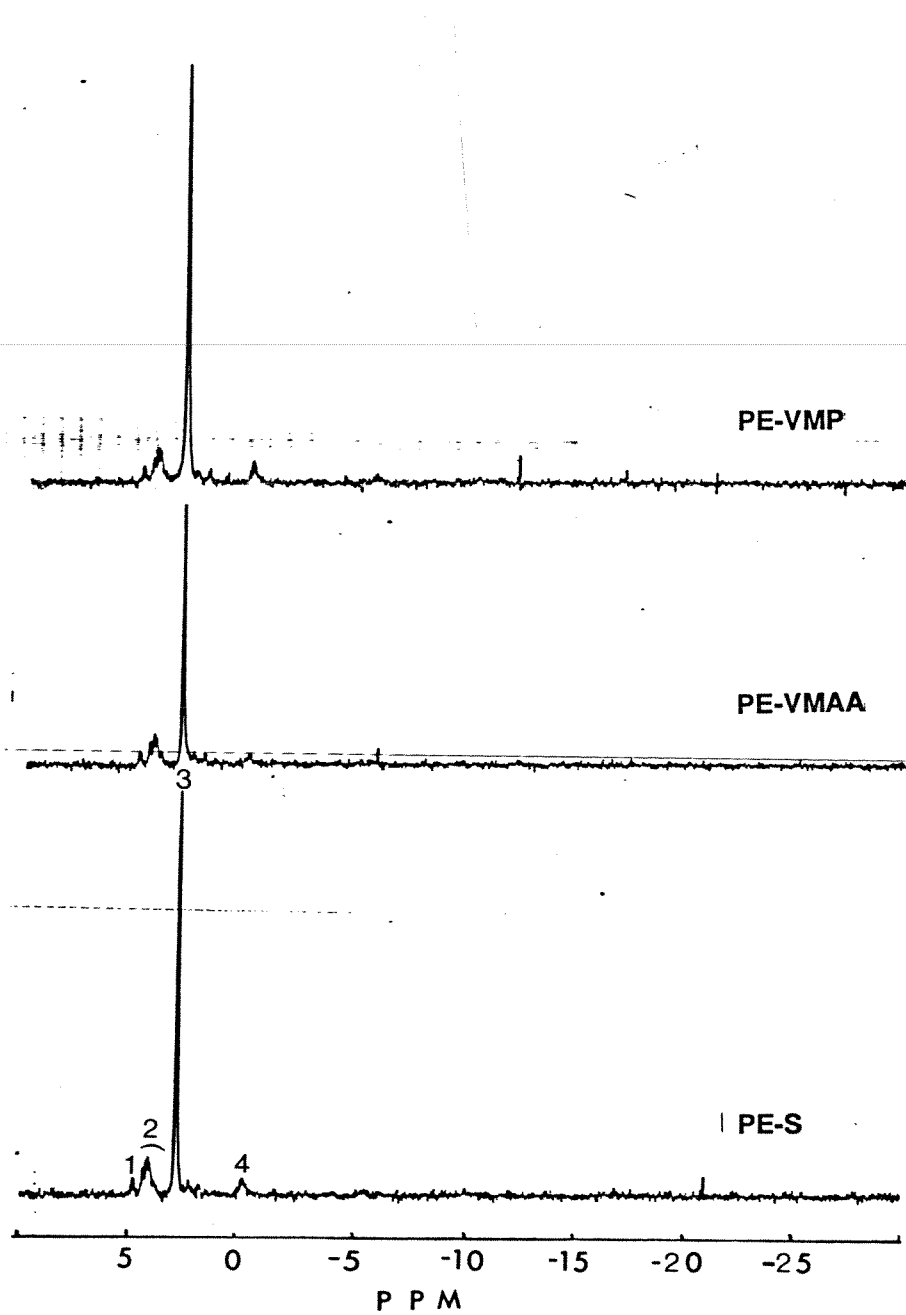


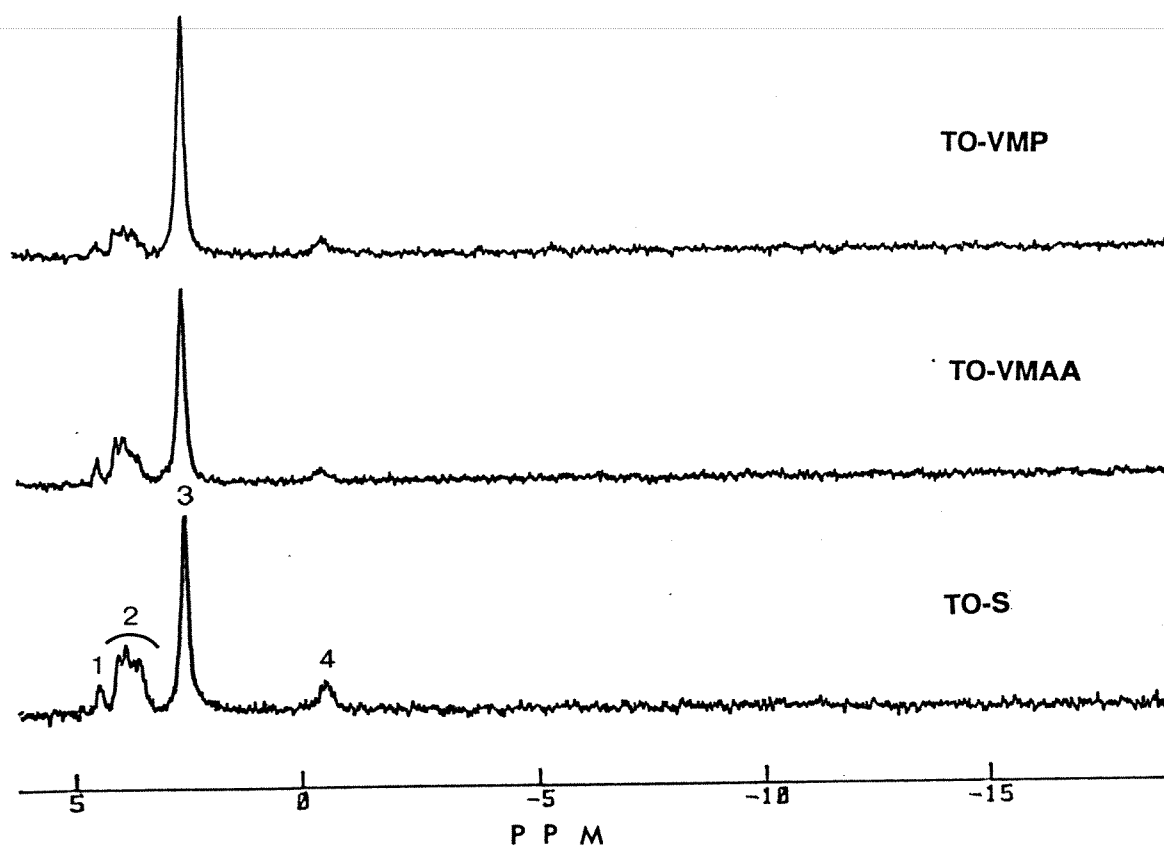
Figura 24. Espectro de RMN- ^{31}P de extratos de cotilédones de pepino (PE) sadio (S) e 5 dias após a inoculação com os vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA) e do mosaico do pepino (VMP). Os extratos contém 50 mM de EDTA. 1.glicose-6-fosfato; 2.açúcares fosfato; 3. fosfato inorgânico; 4.fosfoliésteres.



O efeito do EDTA, melhorando a resolução dos picos foi também observado por RICARDO & SANTOS (1990), em preparações de cotilédones de leguminosas. É provável que o efeito quelante do EDTA atue na remoção de íons em solução, contribuindo para melhorar a resolução do espectro.

A análise de extratos de folhas de tomate (Fig. 25) revelou as mesmas alterações observadas em folhas de pepino infectado com vírus. Assim, foi observado aparecimento de fosfato e diminuição de açúcares-fosfato nas plantas infectadas. No espectro de extrato de folhas de tomate foram identificados glicose-6-fosfato, açúcares fosfato, fosfato inorgânico e fosfodiésteres

Figura 25. Espectro de RMN- ^{31}P de extrato de folhas de tomate (TO) sadio (S) e 5 dias após a inoculação dos vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA) e do mosaico do pepino (VMP). 1.glicose-6-fosfato; 2.açúcares fosfato; 3.fosfato inorgânico; 4.fosfodiésteres).



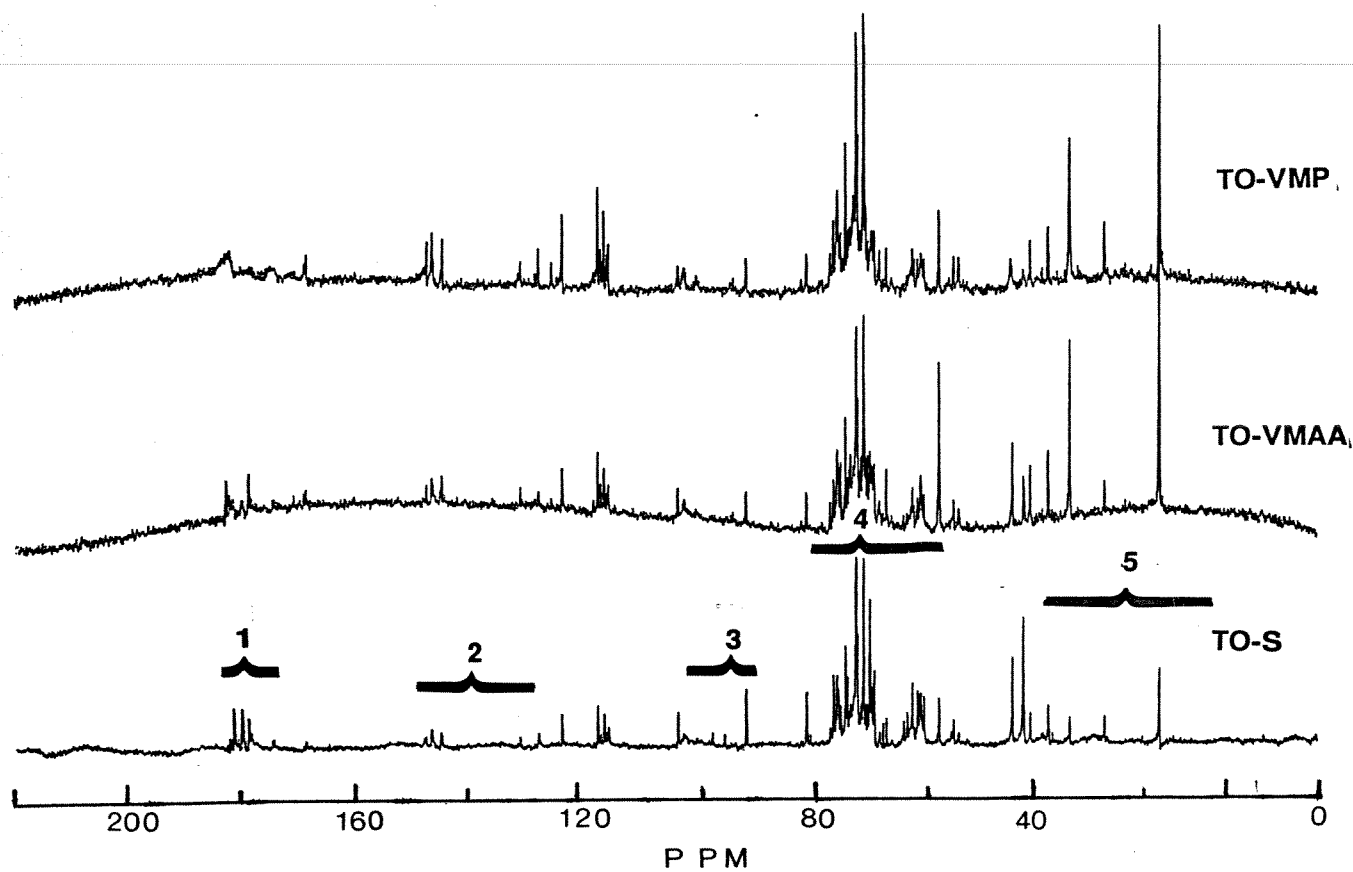
A análise de RMN-¹³C de extratos de folhas de pepino sadio e 5 dias após a inoculação com vírus revelou que as plantas infectadas apresentam maior número de sinais e aparecimento de alguns compostos (Fig. 26).

Nas plantas de pepino infectadas foi observado aumento de glicolato e acúmulo de sacarose. Além disso, os picos com ressonância de 92,53; 81,76; 74,30; 64,20; 44,59 e 42,42 ppm apresentaram aumento nas plantas infectadas e talvez possam ser considerados como indicadores de infecção. Não foi possível a identificação desses picos. O aumento de glicolato pode ter ocorrido por um aumento da atividade de oxigenase da enzima ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase-oxigenase.

O espectro de ^{13}C de extratos de folhas de tomate apresentou diminuição da intensidade e número de picos na região de carboxilatos (184,00 a 144,00 ppm). A região de compostos aromáticos (148,00 a 144,00 ppm) apresentou sinais mais intensos e aparecimento de açúcares (80,00 a 60,00 ppm) nas plantas com vírus (Fig. 27).

O aumento de compostos aromáticos tem sido verificado em várias plantas com fungos, bactérias, e outros patógenos (KOSUGE, 1969). Nas interações compatíveis e incompatíveis muitos compostos aromáticos, especialmente fenóis, são acumulados no vacúolo na forma de glicosídeos. A glicosilação mantém a reatividade baixa dos fenóis (BARUAH & SWAIN, 1959), confere maior solubilidade e conseqüente facilidade de translocação na planta (KENNEDY & MITTLER, 1953; ROBERTS, 1960), além de evitar que esses compostos permaneçam livres na célula (PRIDHAN, 1965). Os compostos aromáticos podem ser liberados para o meio celular por ação de enzimas oxidativas, tanto do patógeno quanto do hospedeiro, tornando as condições desfavoráveis para o desenvolvimento ou inibindo o crescimento do patógeno. Tais compostos estão diretamente envolvidos na proteção do hospedeiro (MACLEAN *et al.*, 1974). É possível que haja correlação entre aumento de compostos aromáticos e aumento da atividade peroxidásica nas plantas infectadas.

Figura 27. Espectro de RMN- ^{13}C de extratos de folhas de tomate (TO) sadio (S) e aos 5 dias após a inoculação com os vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA) e do mosaico do pepino (VMP). 1. ácidos carboxílicos; 2. aromáticos; 3. carbono anomérico; 4. açúcares; 5. aminoácidos e ácidos carboxílicos.



A diminuição da da glicose-6-fosfato pode ser atribuída a aceleração da glicólise, como observada classicamente durante a transição do estado aeróbio para anaeróbio (TURNER & TURNER, 1980). A fosfofrutoquinase e piruvato quinase são as principais enzimas reguladoras da glicólise e são fortemente inibidas por vários constituintes celulares, especialmente ATP. O controle dessas enzimas é dado pela razão ATP/ADP citossólico (TURNER & TURNER, 1980). Além disso, a concentração de ATP citossólico regula a distribuição do P_i celular. Quando a concentração de ATP citossólico é substancial, o fosfato inorgânico derivado do "pool" de glicose-6-fosfato é preferencialmente sequestrado pelo vacúolo (REBEILLÉ *et al.*, 1983). Quando a concentração de ATP é baixa, isto é, durante a transição das condições aeróbias para anaeróbias, o fosfato inorgânico derivado do "pool" de glicose-6-fosfato permanece no compartimento citossólico (MARTIN *et al.*, 1982).

Outra razão possível para a diminuição dos níveis de glicose-6-fosfato seria a estimulação da via das pentoses-fosfato. MAKOVCOVA *et al.* (1980) observaram aumento da atividade das desidrogenases da glicose-6-fosfato e do 6-fosfogluconato e aumento dos intermediários da via das pentoses. Esses autores demonstraram que o aumento da atividade enzimática ocorre em função da reprodução viral.

ROBY *et al.* (1987) observaram que após longo período de privação de sacarose, as células de sicômoro passaram a utilizar ácidos graxos para fins respiratórios. Eles demonstraram que a diminuição da sacarose intracelular é acompanhada pela diminuição de vários ácidos graxos esterificados e os peroxissomos apresentaram alta atividade enzimática. É possível que o aumento da atividade peroxidásica observado nas plantas infectadas, analisadas neste trabalho, esteja relacionado ao metabolismo de lipídeos. Considerando que a sacarose não está sendo catabolizada devidamente nas plantas doentes, o metabolismo de lipídeos poderia fornecer acetil CoA necessária para movimentar o ciclo de Krebs e em última instância a fosforilação oxidativa. Estudos posteriores para identificação de intermediários do metabolismo de lipídeos, das vias

das pentoses-fosfato e determinação dos níveis de ATP e ADP celulares serão necessários para determinar as interações metabólicas e o mecanismo responsável pela alteração do metabolismo de carboidratos observada nas plantas viróticas.

4.CONCLUSÕES

As condições experimentais definidas nesse trabalho permitiram concluir que:

1.Nas folhas de pepino infectado com VMAA e tomate com VMP ocorre aparecimento de uma proteína da fração microssomal, com PM 39.000 Da.

2.As proteínas de 39.000 Da induzidas em pepino e tomate não apresentaram reação para glicoproteínas, não estão presentes no fluido intercelular e na parede celular. Estas são proteínas externas das membranas microssomais e não são induzidas por TMV. As proteínas apresentam a mesma carga e número de isoformas.

4.Nas plantas doentes a atividade peroxidásica aumentou e não houve indução do aparecimento de novas isoenzimas, mas apenas aumento de atividade de isoenzimas específicas.

5.A virose levou a diminuição de açúcares fosfato, aumento de fosfato inorgânico e acúmulo de sacarose.

6.No pepino infectado ocorre acúmulo de glicolato, por um provável aumento de atividade de oxigenase da Rubisco e no tomate ocorre acúmulo de compostos aromáticos.

7.A infecção viral não modifica o pH intracelular.

8.Tanto a idade da planta como a quantidade de tecido e de EDTA utilizados no preparo de extratos interferem na resolução de espectros de RMN.

6. BIBLIOGRAFIA

- ABELES, F.B.; DUNN, L.J.; MORGENS, P.; CALLAHAN, A.; DINTERMAN, R.E.; SCHMIDT, J. (1988). Induction of 33-kD and 60-kD peroxidases during ethylene induced senescence of cucumber cotyledones. *Plant. Physiol.*, 87: 609-615.
- ABRAHAN, R.J.; FISCHER, J.; LOFTUS, P. (1988). *Introduction to NMR spectroscopy*. John Wiley & Sons, Ltd.
- AHL, P.; BENJAM, A.; SAMSON, r.; GIANINAZZI, S. (1981) New host proteins (*b*-proteins) induced together with resistance to a secondary infection following bacterial infection in tobacco. *Phytopathol. Z.*, 102: 201-212.
- AL-MUSA, A.M. (1989). Severe mosaic caused by zucchini yellow mosaic virus in cucurbits from Jordam. *Plant Pathol.*, 38: 541-546.
- ANDEBRHAN, T.; COUTTS, R.H.A.; WAGIH, E.E.; WOOD, R.K.S. (1980). Induced resistance and changes in soluble protein fraction of cucumber leaves locally infected with *Colletotrichum lagenarium* or tobacco necrosis virus. *Phytopathol. Z.*, 98: 47-52.
- ANTONIW, J.F. & PIERPOINT, W.S. (1978) The purification and properties of one of the *b* proteins from virus-infected tobacco plants. *J.Gen.Virol.*, 39: 343-350.
- ANTONIW, J.F.; RITTER, C.E.; PIERPOINT, W.S.; VAN LOON, L.C. (1980). Comparison of three pathogenesis related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *J.Gen.Virol.*, 47: 79-87.

- ASWORTH, D.L.; LEE, R.Y.; ADAMS, D.O. (1987). Characterization of acetate and pyruvate metabolism in suspension cultures of *Zea mays* by ^{13}C NMR spectroscopy. **Plant. Physiol.**, 85: 463-468.
- BARUAH, P. & SWAIN, T. (1959). The action of potato phenolase on flavonoid compounds. **J.Sci.Food Agric.**, 10: 125.
- BENNETT, J.P.C. (1982). Solubilization of membrane-bound enzymes and analysis of membrane protein concentration. In T.R HESKETH; H.L. KORNBERG; J.C. METCALFE; D.H. NORTHCOTE; C.I. POGSON; K.F. TIPTON eds. **Techniques in lipid and membrane biochemistry**, part 1, Vol B 408/1. Elsevier, North-Holland, p. 1-22.
- BLAKE, M.S.; JOHNSTON, K.H.; RUSSELL-JONES, G.J.; GOTSCHLICH, E.C. (1984). A rapid sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. **Anal. Biochem.**, 136: 175-179.
- BLUMM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 8: 93-99.
- BORDIER, C. (1981). Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. **J.Biol.Chem.**, 256: 1604-1607.
- BOWLES, D.J. (1990). Defense related proteins in higher plants. **Ann. Rev. Biochem.**, 59: 873-907.

CAMACHO-HENRIQUEZ, A. & SANGER, H.L. (1982). Analysis of acid-extractable tomato leaf proteins after infection with a viroid, two viruses and a fungus and partial purification of the "pathogenesis-related" protein P14. **Arch.Virol.**, **74**: 181-196.

CAMACHO-HENRIQUEZ, A & SANGER, H.L. (1982). Gel electrophoretic analysis of phenol-extractable leaf protein from different viroid-host combinations. **Arch.Virol.**, **74**: 167-180.

CARR, J.P.; DIXON, D.C.; NIKOLAU, B.J.; VOELKERDING, K.V.; KLESSIG, D.F. (1987). Synthesis and localization of pathogenesis-related proteins in tobacco. **Mol.Cell Biol.**, **7**: 1580-1583.

CASSAB, G.I. & VARNER, J.E. (1988). Cell wall proteins. **Ann. Rev.Plant Physiol.**, **349**: 321-353.

CHEN, J.A. & VARNER, J.E. (1985). An extracellular matrix protein in plants: characterization of a genomic clone for carrot extensin. **EMBO J.**, **4**: 2145-2151.

CHRIST, V. & MOSINGER, E. (1989). Pathogenesis-related proteins of tomato. 1. Induction by *Phytophthora infestans* and other biotic and abiotic inducers and correlations with resistance. **Physiol.Mol.Plant Pathol.**, **35**: 53-65.

CORBIN, D.R.; SAVER, N.; LAMB, C.J. (1987). Differential regulation of a hydroxyproline-rich glycoprotein gene family in wounded and infected plants. **Mol.Cell Biol.**, **7**: 4337-4344.

DAVIS, R.F. & MIZUKI, M.K. (1987). Detection of cucurbit virus in New Jersey. **Plant Dis.**, **71**: 40-44.

DOOLITTLE, S.P. (1916). Some studies of cucurbit mosaic. *Phytopathology*, **6**: 145-147.

DUSI, A.N., ZAMBOLIM, E.M.; GAMA, M.I.C.S.; AVILA, A.C.; GIORDANO, L.B.G.; SANTOS, J.R.M. (1992). Ocorrência e caracterização do vírus do mosaico do pepino (CMV) em ervilha. *Fitopatol.Bras.*, **17**: 286-291.

DWURAZMA, M.M. & WEINTRAUB, M. (1969). Respiration of tobacco leaves infected with different strains of potato virus X. *Can.J.Bot.*, **47**: 723-730.

ECKER, J.R. & DAVIS R.W. (1987). Plant defense genes are regulated by ethylene. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **84**: 5202-5206.

FAYE, L. & CHRISPEELS, M.J. (1985). Characterization of N-linked oligosaccharides by affino blotting with Concanavalin-A-peroxidase and treatment of the blots with glycosidases. *Anal.Bioch.*, **149**: 218-224.

FERREIRA, R.B. & SHAW, N.M. (1989). Effect of osmotic stress on protein turnover in *Lemna minor* fronds. *Planta*, **179**: 456-465.

FISCHER, R. BEHNKE, S.; APEL, K. (1989). The effect of chemical stress on the polypeptide composition of the intercellular fluid of barley leaves. *Planta*, **178**: 61-68.

FRANCKI, R.I.B.; MOSSOP, D.W.; HATTA, T. (1979). Cucumber mosaic virus. *CMI/AAB Description of Plant Viruses*, **213**.

FRASER, R.S.S. (1981). Evidence for the occurrence of the 'pathogenesis-related' proteins in leaves of healthy tobacco plants during flowering. *Physiol.Plant Pathol.*, **19**: 69-76.

GADIAN, D.G. (1982). **Nuclear magnetic resonance and its applications to living systems.**
Clarendon Press, Oxford, 1982.

GASPAR, J.O. (1987). **Vírus do mosaico angular do feijoeiro: purificação, peso molecular da proteína e ultraestrutura dos tecidos infectados.** Universidade de Campinas, SP
(Tese de doutorado), 55 p.

GESSLER, C. & KÚC, J. (1982). Appearance of a host protein in cucumber plants infected with viruses, bacteria and fungi. **J.Exp. Bot.**, **33**: 58-56.

GIANINAZZI, S. & KASSANIS, B. (1974). Virus resistance induced in plants by polyacrylic acid. **J.Gen.Virol.**, **23**: 1-9.

GIANINAZZI, S. & MARTIN, C. (1975). A naturally occurring active factor inducing resistance to virus infection in plants. **Phytopathol. Z.**, **83**: 23-26.

GIANINAZZI, S.; VALÉE, J.C.; MARTIN, C. (1969). Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana Xnathi*-NC. **Com.l'Acad.Sci.Paris, d 268**: 800-802.

GIANINAZZI, S.; MARTIN, C.; VALÉE, J.C. (1970). Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana Xanthi*-NC. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. **C.R.He.Seances Acad.Sci., ser D**, **270**: 2383-2386.

GIANINAZZI, S.; AHL, P.; CORNU, A.; SCALLA, R.; CASSINI, R. (1980). First report of host *b*-protein appearance in response to a fungal infection in tobacco. **Physiol.Plant Pathol.**, **16**: 337-342.

GOODMAN, N.R.; KIRALY, Z.; WOOD, K.R. (1986). **The biochemistry and physiology of plant disease**. University of Missouri Press, 433 p.

GREBER, R.S.; MCLEAN, G.D.; GRICE, M.S. (1987). Zucchini yellow mosaic virus in three states of Australia. **Austr.Plant Pathol.**, **16**: 19-21.

HAMMERSCHMIDT, R.; BONNEN, A.M.; BERGSTROM, G.C.; BAKER, K.K. (1985). Association of epidermal lignification with nonhost resistance of cucurbits to fungi. **Can.J.Bot.**, **63**: 2393-2398.

HARRIS, R.K. (1983). **Nuclear magnetic resonance spectroscopy**. Pitman Books LTD, Londres.

HOLDEN, D.W. & ROHRINGER, R. (1985). Proteins in the intercellular washing fluid from noninoculated and rust-affected leaves of wheat and barley. **Plant Physiol.**, **78**: 715-723.

HONG, J.C.; NAGAO, R.T.; KEY, J.L. (1990). Developmentally regulated expression of soybean proline-rich cell wall proteins genes. **Plant Cell**, **1**: 937-943.

HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN, R.A.M.; CORNELISSEN, B.J.C.; VAN LOON, L.C.; VAN BOOM, J.H.; TROMP, M.; BOL, J.F. (1985). Virus-induced synthesis of messenger RNAs for precursors of pathogenesis-related proteins in tobacco. **EMBO J.**, **4**: 2167-2171.

- HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN, R.A.M.; ALBLAS, S.W.; DERIJK, R.H.; BOL, J.F. (1986). Induction by salicylic acid of pathogenesis-related proteins and resistance to alfalfa mosaic virus in various plant species. **J.Gen.Virol.**, **67**: 2135-2143.
- HUANG, C.H.; HSEU, S.H.; TSAI, J.H. (1989). Purification, serology and properties of five zucchini yellow mosaic virus isolates. **Plant Pathol.**, **38**: 414-420.
- HURKMAN, W.J. & TANAKA, C.K. (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. **Plant Physiol.**, **81**: 802-806.
- HSEU, S.H.; WANG, H.L.; HUANG, C.H. (1985). Identification of zucchini yellow mosaic virus from *Cucumis sativus*. **J.Agric.Res.China**, **34**: 87-95.
- JACKSON, P. & RICARDO, C.P.P. (1992). Cytochrome C aided resolution of *Lupinus albus* isoperoxidases in a cathodal polyacrylamide gel electrophoresis system. **Anal.Bioch.**, **200**: 36-41.
- JOOSTEN, M.H.A.J.; BERGMANS, C.J.B.; MEULENHOF, E.J.S.; CORNELISSEN, B.J.C.; DEWIT, P.J.G.M. (1990). Purification and serological characterization of three basic 15-kilodalton pathogenesis-related proteins from tomato. **Plant Physiol.**, **94**: 585-591.
- KASSANIS, B.; GIANINAZZI, S.; WHITE, R.F. (1974). A possible explanation of the resistance of virus-infected tobacco plants to second infection. **J.Gen.Virol.**, **23**: 11-16.

- KAUFFMANN, S.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. (1990). Isolation and characterization of six pathogenesis-related (PR) proteins of Samsun NN tobacco. **Plant Mol.Biol.**, **14**: 381-390.
- KENNEDY, J.S. & MITTLER T.E. (1953). A method to obtaining phloem sap via a mouth parts of aphids. **Nature**, **171**: 528.
- KIME, M.J. & RATCLIFFE, R.G. (1982). The application of ^{31}P nuclear magnetic resonance to higher plant tissue. **J.Exp.Bot.**, **33**: 670-681.
-
- KIME, M.J. & RATCLIFFE, R.G.; WILLIAMS, R.J.P.; LOUGHMAN, B.C. (1982). The application of ^{31}P nuclear magnetic resonance to higher plant tissue. **J.Exp.Bot.**, **33**: 656-669.
- KITAJIMA, E.W. (1986). Lista de publicações sobre viroses e enfermidades correlatas de plantas no Brasil (1911 - 1985). **Fitopatol.Bras.**, suplemento especial.
- KJELLBON, P.; LARSSON, C.; ROCHESTER, C.P.; ANDERSSON, B. (1989). Integral and peripheral proteins of the spinach leaf plasma membrane. **Plant Physiol.Biochem.**, **27**: 169-174.
- KOSUGE, T. (1969). The role of phenolics in host response infection. **Ann.Rev.Phytopathol.**, **7**: 195-222.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. **Nature**, **227**: 680-685.

- LAGRIMINI, L.M. & ROTHSTEIN, S. (1987). Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. **Plant Physiol.**, **84**: 438-442.
- LEE, C.; LEVIN, A.; BRANTON, D. (1987). Copper staining: a five- minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. **Anal. Bioch.**, **166**: 308-312.
- LEE, R.B. & RATCLIFFE, R.G. (1983). Phosphorus nutrition and the intracellular distribution of inorganic phosphate in pea root tips: a quantitative study using ^{31}P -NMR. **J.Exp.Bot.**, **34**: 1222-1244.
- LINES, C.E.M.; RATCLIFFE, R.G.; REES, T.A.V.; SOUTHON, T.E. (1989). A ^{13}C NMR study of photosynthate transport and metabolism in the lichen *Xanthoria calciola*. **New Phytol.**, **2**: 159-163.
- LISA, V.; BOCCARDO, G.; D'AGOSTINO, G.; DELLAVALLE, G.; D'AQUILIO, M. (1981). Characterization of a potyvirus that causes zucchini yellow mosaic. **Phytopathology**, **71**: 667-672.
- LISA, V. & LECOQ, H. (1984). Zucchini yellow mosaic virus. **CMI/AAB descriptions of plant viruses**, **282**.
- MAKOVCOVA, O.; SINDELAR, L.; HANUSOVA, M. (1980). Metabolismus sacharózy V listech okurky infikované virem mozaiky okurky ve vztahu vynosum. **Ochrana Rostlin**, **16**: 263-269, 1980.

MARTELLI, G.P. (1980). Ultrastructural aspects of possible defence reactions in virus-infected plant cells. *Microbiologica*, **3**: 369-391.

MATILE, P. (1980). Catabolism of chlorophyll: involvement of peroxidase? *Z. Pflanzenphysiol.*, **99**: 475-478.

MARTIN, J.B.; BLIGNY, R.; REBEILLE, F.; DOUCE, R.; LEGUAY, J.J.; MATHIEU, Y.; GUERN, J. (1982). A ^{31}P nuclear magnetic resonance study of intracellular pH of plant cells cultivated in liquid medium. *Plant Physiol.*, **70**: 1156-1161.

MISAGHI, I.J. (1982). *Physiology and biochemistry of plant-pathogen interactions*. Plenum Press, Nova Iorque, 287 p.

NEEMAN, M.; AVIV, D.; DEGANI, H.; GALUN, E. (1985). Glucose and glycine metabolism in regenerating tobacco protoplasts. *Plant Physiol.*, **77**: 374-378.

O'FARRELL, P.H. (1985). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J.Biol.Chem.*, **250**: 4007-4021.

O'FARRELL, P.Z.; GOODMAN, H.M.; O'FARRELL, P.H. (1977) High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell*, **12**: 1133-1142.

PARENT, J.G. & ASSELIN, A. (1984) Detection of pathogenesis-related proteins (PR or *b*) and the other proteins in the intercellular fluid of hypersensitive plants infected with tobacco mosaic virus. *Can.J.Bot.*, **62**: 564-569.

PEARCE, R.B. & RIDE, J.P. (1978). Elicitors of the lignification process in wheat. **Ann.Appl.Biol.**, 89: 306.

PENNAZIO, S.; COLARICCIO, D.; ROGGERO, P.; LENZI, R. (1987). Effect of salicylate stress on the hypersensitive reaction of asparagus beat to tobacco necrosis virus. **Physiol.Mol.Plant Pathol.**, 30: 347-357.

PENNAZIO, S. & REDOLFI, P. (1980). Resistance to tomato bushy virus localized reaction induced in *Gomphrena globosa* by acetyl salicylic acid. **Microbiologica**, 3: 475-479.

PRIDHAM, J.B. (1965). Low molecular weight phenols in higher plants. **Ann.Rev.Plant Physiol.**, 16: 13-36.

PROVIDENTI, R.; GONSALVES, D.; HUMAYDAN, H.S. (1984). Occurrence of zucchini yellow mosaic virus in cucurbits from Connecticut, New York, Florida and California. **Plant Dis.**, 68: 443-446.

RATCLIFFE, R.G. (1987). Application of nuclear magnetic resonance methods to plant tissues. **Meth.Enzimol.**, 148: 683-700.

REDOLFI, P. & CANTISSANI, A. (1984). Preliminary characterization of new soluble proteins in *Phaseolus vulgaris* cv. Saxa reacting hypersensitively to viral infection. **Physiol.Plant Pathol.**, 125: 9-19.

RICARDO, C.P.P. & SANTOS, H. (1990). Application of ^{31}P NMR to monitor phosphorus compounds and their changes during germination of legume seeds. **J.Exp.Bot.**, 41: 79-87.

ROBERTS, E.A.H. (1960). Effect of glucosilation on the enzymic oxidation and translocation of the flavonoids. *Nature*, **185**: 536-537.

ROBERTS, J.K.M. (1984). Study of plant metabolism in vivo using NMR spectroscopy. *Ann.Rev.Plant Physiol.*, **35**: 375-386.

ROBERTS, J.K.M. & JARDETZKY, O. (1981). Monitoring of cellular metabolism by NMR. *Biochem.Biophys, Acta*, **639**: 53-76.

ROBERTS, J.K.M.; JARDETZKY, N.W.; JARDETZKY, O. (1981). Intracellular pH measurements by ³¹P nuclear magnetic resonance. Influence of factors other than pH on ³¹P chemical shifts. *Biochemistry*, **20**: 5389-5394,.

ROBERTS, J.K.M.; WEMMER, D. RAY, P.M.A; JARDETZKY, O. (1982). Regulation of cytoplasmic and vacuolar pH in maize root tips under different experimental conditions. *Plant Physiol.*, **69**: 1344-1347.

ROBY, C.; MARTIN, J.B.; BLIGNY, R.; DOUCE, R. (1987) Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells. *J.Biol.Chem.*, **262**: 5000-5007, 1987.

ROGGERO, P. & PENNAZIO, S. (1991). Salicylate does not induce resistance to plant viruses, or stimulate pathogenesis-related proteins production in soybean. *Microbiologica*, **14**: 65-69.

ROGGERO, P. & PENNAZIO, S. (1989). The extracellular acidic and basic pathogenesis-related proteins of soybean induced by viral infection. *J.Phytopathol.*, **127**: 274-280.

- ROGGERO, P. & PENNAZIO, S. (1990). Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of extracellular soybean pathogenesis-related proteins using PhastSystem. **Electrophoresis**, **11**: 86-90.
- ROHRINGER, R.; EBRAHIM,-NESBAT, F; WOLF, (1983). G. Proteins in intracellular washing fluids from leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.). **J.Exp.Bot.**, **34**: 1589-1605, 1983.
- ROSEMBERG DE GOMEZ, F.; WAHN, K.; SANGER, H.L. (1985). Cytopathologie von viroid-infizierten Pflanzengewebe. II.Licht-und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Blattgewebe von *Chrysanthemum morifolium* der Sorte "Mistletoe" nach Infektion mit dem Viroid der Stauchekrankheit der Chrysantheme (CSV). **Phytopathol. Z.**, **114**., 41-68, 1985.
- SCHAEFER, J.; STEJSKAL, E.O.; BEARD, C.F. (1975). Carbon-13 nuclear magnetic resonance. Analysis of metabolism of soybeans labelled by $^{13}\text{CO}_2$. **Plant Physiol.**, **55**: 1048-1053.
- SHOWALTER, A.M.; BELL, J.M.; CRAMER, C.L.; BAILEY, J.A.; VARNER, J.E. (1985). Accumulation of hydroxyproline-rich glycoprotein mRNAs in response to fungal elicitor and infection. **Proc.Nat.Acad.Sci.USA**, **82**: 6551-6555.
- SKOKUT, T.A.; VARNER, J.E.; SCHAEFER, J.; STEJSKAL, E.O.; MACKAY, R.A. (1982). ^{15}N and ^{13}C NMR determination of utilization of glycine for synthesis of storage protein in the presence of glutamine in developing cotyledons of soybean. **Plant Physiol.**, **69**: 314-316.
- SKOKUT, T.A.; VARNER, J.E.; SCHAEFER, J.; STEJSKAL, E.O.; MACKAY, R.A. (1982). ^{15}N NMR determination of asparagine and glutamine nitrogen utilization for synthesis of

storage protein in developing cotyledons of soybean in culture. *Plant Physiol.*, **69**: 308-313.

SMITH, J.A. & HAMMERSCHMIDT, R. (1899). Comparative study of acidic peroxidases associated with induced resistance in cucumber, muskmelon and watermelon. *Physiol.Mol.Plant Pathol.*, **33**: 255-261, 1988.

STIDHAM, M.A.; MORELAND, D.E.; SIEDOW, J.N. (1983). ¹³C nuclear magnetic resonance studies of crassulacean acid metabolism in intact leaves of *Kalanchoe tubiflora*. *Plant Physiol.*, **73**: 517-520, 1983.

SWERDLOW, P.S.; FINLEY, D.; VARSHAVSKY, A. (1986). Enhancement of immunoblot sensitivity by heating of hydrated filters. *Anal. Biochem.*, **156**: 147-153.

TAS, P.W.L. & PETERS, D. (1977). The occurrence of a soluble protein (E1) in cucumber cotyledones infected with plant viruses. *Neth.J.Plant Pathol.*, **83**: 5-12.

TURNER, J.F. & TURNER, D.H. (1980). Metabolism and respiration. In D.D. DAVIES ed. *The biochemistry of plants*, Vol 2. Academic Press., p.279-316.

VAN HUUSTEE, R.B. (1987). Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Ann.Rev.Plant Physiol.*, **38**: 205-219.

VAN LOON, L.C. (1977). Induction by 2-chloroethylphosphonic acid of viral-like lesions, associated proteins, and systemic resistance in tobacco. *Virology.*, **80**: 417-420.

VAN LOON, L.C. (1985). Pathogenesis-related proteins. *Plant Mol.Biol.*, **4**: 111-116.

VAN LOON, L.C. (1981). The induction of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco and bean plants. **Vth International Congress of Virology**, Strasbourg, França.

VAN LOON, L.C. & VAN KAMMEN, A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II.Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. **Virology**, **30**: 199-211.

VARNER, J.E. & LIN, L.S. (1989). Plant cell architecture. **Cell**, **56**: 231-239.

VEGA, J.; REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A.; NAGAI, H. (1992). Vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (VMAA) em melancia proveniente de Votuporanga, SP. **Fitopatol.Bras.:** **17**: 188.

VERA, P. & CONEJERO, V. (1988). Pathogenesis related (PR) proteins of tomato. P69 as an alkaline endoproteinase. **Plant Physiol.**, **87**: 58-63.

VERA, P. & CONEJERO, V. (1989). The induction and accumulation of the pathogenesis-related protein P69 proteinase in tomato during citrus exocortis viroid infection and in response to chemical treatment. **Physiol.Mol.Plant Pathol.**, **34**: 323-334.

VIOLA, R.; DAVIES, H.V.; CHUDECK, A.R. (1991). Pathways of starch and sucrose biosynthesis in developing tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.) and seeds of faba bean (*Vicia faba* L.). **Planta**, **183**: 202-208.

WAHN, N.; ROSENBERG DE GOMEZ, F.; SANGER, H.L. (1980). Cytopathologie von viroid-infiziertem Pflanzengewebe. I.Veränderungen des Plasmalemmas und der Zellwand bei

Gynura aurantiaca nach Infektion mit dem Viroid der Citrus Exocortis Krankheit (CEV).
Phytopathol. Z., 98: 1-18.

WATERTON, J.C.; BRIDGES, I.G.; IRVING, M.P. (1983). Intracellular compartmentation detected by ^{31}P -NMR in intact photosynthetic wheat-leaf tissue.
Biochem.Biophys.Acta, 763: 315-320.

WATERWORTH. H.E.; KAPER, J.M.; TOUSIGNANT, M.E. (1979). CARNA 5, the small cucumber mosaic virus dependent replicating RNA, regulates disease expression.
Science, 204: 845-847.

WHITE, J.L.; KAPER, J.M. Absence of lethal stem necrosis in select *Lycopersicon* spp infected by cucumber mosaic virus strain D and its necrogenic satellite CARNA 5.
Phytopathology, 77: 808-811.

WHITE, R.F. (1979). Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. **Virology**, 99: 410-412.

WRAY, V.; SCHIEL, O.; BERLIN, J. (1983). High field phosphorus-31 nuclear magnetic resonance investigation of the phosphate metabolites in cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. **Z.Pflanzenphysiol.**, 112: 215-220.

YAMAUCH, N. & MINAMIDE, T. (1985). Chlorophyll degradation by peroxidase in parsley leaves.
J.Jpn.Soc.Hortic.Sci., 54: 265-271.