

117.100.000.000.000
Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida por Jorge Vega e aprovada pela Comissão Julgadora.

7/3/85

lit

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

(h.t.b.)
ASSOCIAÇÃO ENTRE PEROXISOMAS E INCLUSÕES CITOPLASMÁTICAS INDUZIDAS PELO VÍRUS DO MOSAICO COMUM DA SOJA

JORGE VEGA *h.t.*

Orientador: ALVARO S. COSTA *h.t. S. de*

1985

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

a Irene, Diego,
Lucas e Tomás.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. ÁLVARO SANTOS COSTA, pela sua orientação e pelas produtivas discussões durante a execução deste trabalho.

Aos colegas e funcionários da Seção de Virologia do Instituto Agrônomico de Campinas, pelo apoio brindado, particularmente a JOSÉ OSMAR GASPAR pelo estímulo e pela luta compartilhada na pesquisa em microscopia eletrônica, e a MARIA DO CARMO SARUBI DA COSTA pela boa vontade na tarefa de dar forma final a esta tese.

Aos Professores MARY ANNE HEIDI DOLDER, AVELINO RODRIGUES DE OLIVEIRA e IRINEU JOSÉ B. DE CAMARGO, pela revisão dos originais e pelas sugestões e críticas apresentadas.

À FINEP pelo apoio recebido para a execução de parte das pesquisas que compõem esta tese.

Ao CNPq pelo apoio recebido na forma de bolsa de pesquisa e auxílio para o desenvolvimento das pesquisas.

ÍNDICE

	pág.
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	3
1. <u>Inclusões citoplasmáticas induzidas pelos potyvirus</u>	3
1.1. <u>Morfologia</u>	3
1.2. <u>Composição das inclusões lamelares</u>	6
1.3. <u>Origem das inclusões lamelares</u>	6
1.4. <u>Significação fisiopatológica das inclusões lamelares</u>	9
2. <u>Associação entre vírus e organelas celulares</u> ...	11
3. <u>Peroxisomas e infecção viral</u>	12
III. MATERIAIS E MÉTODOS	15
IV. RESULTADOS	23
1. <u>Alterações da estrutura celular</u>	23
1.1. <u>Contato das inclusões com organelas celulares</u>	25
1.2. <u>Identificação citoquímica das organelas associadas às inclusões lamelares</u>	25
1.3. <u>Aspectos da associação entre peroxisomas e inclusões lamelares</u>	27
1.4. <u>Efeito da infecção viral na distribuição e quantidade dos peroxisomas</u>	32
2. <u>Atividades enzimáticas em homogenados de folhas.</u>	34

2.1. <u>Atividade enzimática na folha inoculada.</u>	38
2.2. <u>Atividade enzimática em folhas de diferentes idades na fase de sintomas sistêmicos</u>	39
a. Catalase	39
b. Peroxidase.....	44
V. DISCUSSÃO	46
Hipótese geral.....	50
VI. CONCLUSÕES.....	53
VII. RESUMO.....	55
VIII. SUMMARY	57
IX. BIBLIOGRAFIA	59

I. INTRODUÇÃO

O grupo dos potyvirus é um dos maiores grupos de vírus fitopatogênicos, contando com 60 vírus caracterizados, 32 vírus considerados estirpes diferenciadas e 8 possíveis membros, capazes de infectar espécies vegetais de 56 famílias diferentes (HOLLINGS & BRUNT, 1981). A denominação do grupo deriva do nome do vírus tipo, o vírus Y da batata, na língua inglesa: "potato Y virus". Entre as características compartilhadas pelos potyvirus se destaca a morfologia e tamanho da partícula viral: ela é alongada, flexuosa e seu comprimento varia entre 720 e 800 nanômetros (nm) (HARRISON et al., 1971). O genoma dos potyvirus é formado por uma única molécula de RNA de cadeia simples, com um peso molecular entre $3,0 \times 10^6$ e $3,5 \times 10^6$, que representa cerca de 5% do peso da partícula viral. A molécula de RNA, disposta em forma helicoidal, é coberta por uma capa protéica formada por mais de 2.000 subunidades de um único tipo de proteína com peso molecular de 30.000 a 33.000 (30K a 33K) (HOLLINGS & BRUNT, 1981). Muitos potyvirus causam sérios problemas à agricultura. Como exemplo pode ser citado o vírus do mosaico da cana, que na década 1920-30 provocou severas perdas na produção de açúcar em todo o hemisfério

ocidental (MATSUOKA, 1982). O próprio vírus tipo do grupo, o vírus Y da batata, encontra-se espalhado em todas as regiões produtoras de batata do mundo, causando em alguns países perdas significativas por degenerescência da batata destinada a "semente". A cultura do mamoeiro nas regiões produtoras do sul e centro do Brasil, tem sido limitada pela presença de um potyvirus, o causador do mosaico do mamoeiro ("papaya ringspot virus").

O vírus do mosaico comum da soja ("soybean mosaic virus"), utilizado como modelo no presente estudo, é um representante típico dos potyvirus que se encontra espalhado em todo o mundo graças à transmissão pela semente. Embora as perdas causadas pelo vírus do mosaico comum da soja (VMCS) não sejam consideradas preocupantes, este vírus é uma ameaça potencial para a cultura da soja (Glycine max (L.) Merr.), particularmente para Estados Unidos e Brasil, os dois países que concentram atualmente a produção mundial (IRWIN & GOODMAN, 1981).

II. REVISÃO DE LITERATURA

1. Inclusões citoplasmáticas induzidas pelos potyvirus

1.1. Morfologia

Os potyvirus induzem a formação de diversos tipos de inclusões citoplasmáticas e, menos frequentemente, intranucleares. As inclusões citoplasmáticas lamelares (IL) são comuns a todos os membros do grupo (EDWARDSON, 1974). Estas inclusões, também denominadas inclusões cilíndricas ou inclusões citoplasmáticas (HOLLINGS & BRUNT, 1981), são formadas por uma lamela básica, que pode adotar diferentes disposições originando três tipos de inclusões: a) rolos que são visíveis nas seções transversais como tais, e como tubos nas longitudinais (Fig.1-A); b) cataventos ou "pinwheels" na língua inglesa, que consistem em várias lamelas geralmente curvadas que convergem num eixo ou região central (Fig. 1-B); e c) agregados laminados, geralmente de aspecto rígido, formados por várias camadas da lamela básica (Fig. 1-C). Podem também ocorrer combinações destas três configurações, aparecendo às vezes cataventos formados por lamelas que formam parte de agregados laminados, ou rolos cuja lamela continua num agregado laminado. Cada uma das configurações das

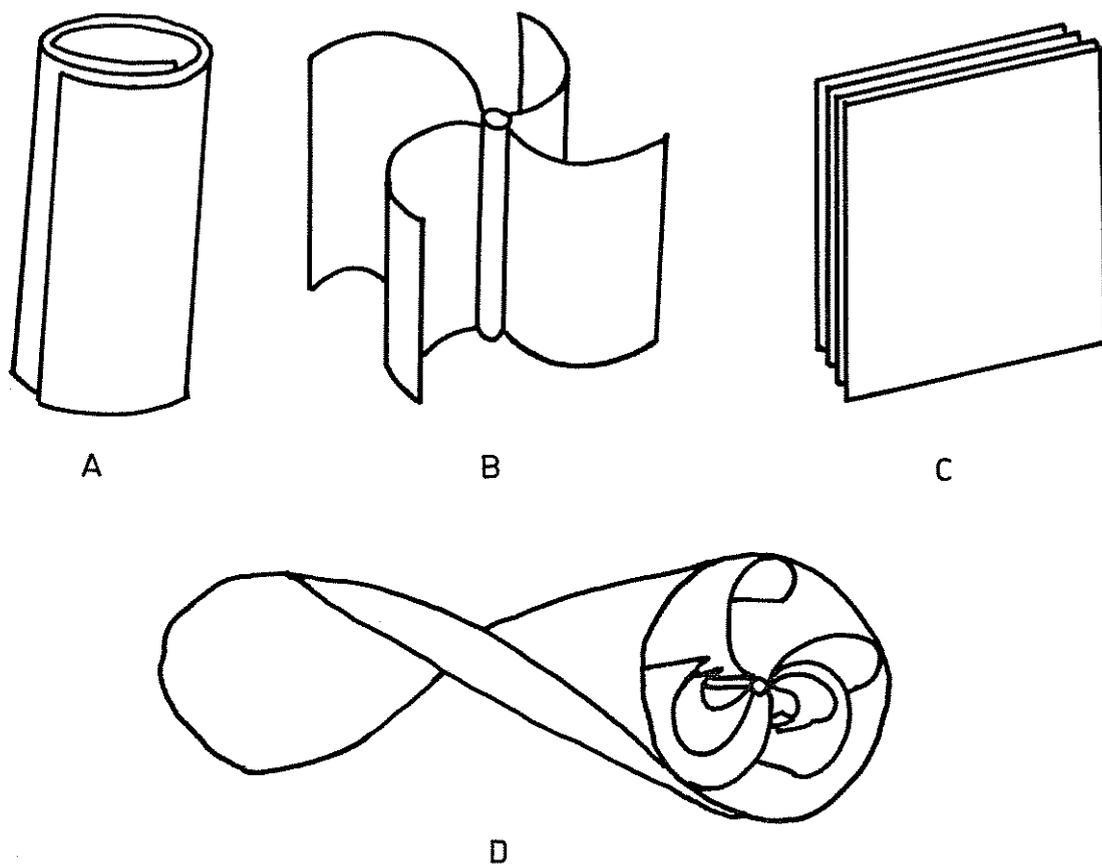


Fig. 1. Diferentes tipos de inclusões lamelares formadas por distintas disposições da lamela básica. A. tubos ou rolos, B. catavento, C. inclusão laminada. D. Modelo de inclusão tipo catavento em forma de ampulheta, que geometricamente corresponde a uma superfície hiperboloide elíptica (redesenhado de MERNAUGH et al., 1980).

inclusões lamelares tem formas que correspondem a diferentes corpos geométricos. Assim as inclusões laminadas seriam prismas de reduzida altura e base triangular ou quadrangular, semelhantes a placas triangulares ou quadrangulares, ao passo que os rolos ou tubos seriam aproximadamente cilíndricos. Os cataventos seriam cônicos segundo estudos de cortes seriados (RUBIO-HUERTOS y LOPEZ-ABELLA, 1966; EDWARDSON, 1966). Mais recentemente MERNAUGH et al., (1980) aplicaram geometria analítica com auxílio de computador para interpretar cortes seriados de cataventos, com variação no ângulo de exame ao microscópio eletrônico. Estes autores concluem que a forma tridimensional dos cataventos não é exatamente cônica, correspondendo mais a uma superfície hiperboloide-elíptica, semelhante à forma de uma ampulheta (Fig. 1-D).

As três formas de inclusões lamelares mencionadas não são induzidas simultaneamente por todos os membros deste grupo de vírus. Esta variação na estrutura das inclusões, considerada uma característica específica do vírus, levou a EDWARDSON (1974) a classificar os potyvirus em três subdivisões de acordo com a presença das seguintes estruturas nas inclusões lamelares: Subdivisão I, rolos e tubos; Subdivisão II, inclusões laminadas e Subdivisão III com rolos e inclusões laminadas juntas. O vírus do mosaico comum da soja pertence à subdivisão III pois induz rolos ou tubos e inclusões laminadas (EDWARDSON, 1974).

1.2. Composição das inclusões lamelares

A composição das IL tem sido estudada através de citocquímica em microscopia óptica (RUBIO-HUERTOS, 1950) e eletrônica (SHEPARD, 1968; WEINTRAUB & RAGETLI, 1968; HOEFFERT, 1969) e também por purificação parcial (HIEBERT & Mc DONALD, 1973). Estes estudos demonstram que as inclusões são principalmente protéicas, pois são susceptíveis à digestão com tripsina, pepsina ou subtilisina. São formadas por uma única proteína com peso molecular entre 67K e 70K, ou seja mais do dobro do peso molecular da proteína da capa viral. As moléculas protéicas estão disposta na lamela das inclusões formando fileiras, visíveis em preparações aplicando a técnica de criogravura ("freeze etching") (McDONALD & HIEBERT, 1974). As fileiras de moléculas proteicas corresponderiam às estrias com periodicidade de 5 nm que são observadas nas inclusões contrastadas negativamente (EDWARDSON, 1974).

1.3. Origem das inclusões lamelares

A associação das inclusões lamelares com a infecção por vírus é um fato conhecido praticamente desde as primeiras observações destas estruturas ao microscópio eletrônico (DAVID-FERREIRA e BORGES, 1958 in EDWARDSON, 1974). Numerosos trabalhos tem abordado diferentes aspectos destas inclusões, fornecendo diversos tipos de evidências de que a formação das inclusões lamelares está associada à

infecção por potyvirus. Algumas destas evidências são: 1. A proteína das IL, embora diferente serologicamente da proteína do capsídeo, é diferente para vírus diferentes (SHEPARD et al., 1974, HIEBERT et al., 1971, PURCIFULL, et al., 1973); 2. As inclusões induzidas por um mesmo vírus em diferentes hospedeiras tem a mesma morfologia (EDWARDSON, 1974), são serologicamente idênticas e sem relação serológica com as proteínas da hospedeira (PURCIFULL et al., 1973); KNUHTSEN et al., 1974); 3. os vírus cujas proteínas capsidiais são relacionadas imunologicamente induzem inclusões que podem ter relação serológica (PURCIFULL et al., 1973). Em resumo, estes resultados indicam que as características das inclusões lamelares são controladas pelo genoma viral, como seria posteriormente demonstrado de maneira direta (DOUGHERTY & HIEBERT, 1980b). Contrariando estes pontos de vista, alguns trabalhos têm atribuído a formação das inclusões lamelares a fatores hormonais (WILSON et al., 1974, WILSON, et al., 1976). Estes trabalhos foram realizados com células de cenoura considerada sadia, cultivada in vitro. As estruturas tipo inclusão lamelar foram observadas quando células cultivadas no meio de White são induzidas para crescimento morfogênético por tratamento com zeatina e in dol acético. A interpretação dada foi que as inclusões lamelares seriam configurações assumidas por proteínas estocadas na célula, quando colocada em determinadas condições de cultura. Posteriormente foi admitido que estruturas tipo catavento podem ser formadas

tanto por infecção viral como por tratamento com substâncias promotoras do crescimento em cultura in vitro, não sendo possível estabelecer se existe alguma relação entre as estruturas originadas pelos dois tipos diferentes de fatores (ISRAEL & WILSON, 1977).

Trabalhos posteriores demonstram, através da técnica de tradução do RNA viral in vitro, que a proteína das inclusões é um dos produtos da tradução do genoma dos potyvirus (DOUGHERTY & HIELBERT, 1980a, b e c; HELLMAN et al., 1980). As proteínas das inclusões lamelares e das inclusões intranucleares, por exemplo, do vírus do "etch" do fumo ("tobacco etch virus", TEV), são os principais produtos da tradução in vitro, junto à proteína do capsídeo. Aparentemente o genoma dos potyvirus é traduzido in vitro, tanto no sistema do germe de trigo ou de lisado de reticulócitos de coelho, como se fosse um único cistron, originando assim uma poli-proteína que posteriormente é processada, liberando as frações correspondentes a cada uma das proteínas codificadas no RNA viral (DOUGHERTY & HIEBERT, 1980; VANCE & BEACHY, 1984). Os estudos in vitro demonstram claras diferenças com outros vírus cujo genoma é também formado pela fita positiva do RNA. Muitos destes vírus têm parte de seu genoma "fechado" à tradução, como é por exemplo o caso do vírus do mosaico do fumo ("tobacco mosaic virus, TMV") cujo RNA intacto traduzido in vitro não produz a proteína do capsídeo (EFROM & MARCUS, 1973). Na planta infectada com TMV a proteína capsidial é produzida em

grande quantidade (SINGER, 1971), a partir de fragmentos sub-genômicos de RNA que contem unicamente o cístion correspondente à proteína viral (BRUENING et al., 1976; HIGGINS et al., 1976). Este tipo de estratégia do genoma viral, onde diferentes proteínas são produzidas pela tradução de fragmentos sub-genômicos de RNA, é comum a vários grupos de vírus vegetais (DAVIES & HULL, 1982). Não existe informação sobre diferenças entre as situações in vivo e in vitro, como ocorre com o TMV, para os potyvirus.

1.4. Significação fisiopatológica das inclusões lamelares

A função das inclusões lamelares no contexto dos processos que ocorrem na célula infectada por vírus, ou seja na sua fisiopatologia, é o aspecto menos conhecido destas estruturas. Não existe até hoje nenhum relato de demonstração experimental direta da função das inclusões lamelares. Diversas hipóteses têm sido propostas, algumas incompatíveis com o conhecimento atual sobre a origem destas inclusões. Por exemplo os trabalhos de LAWSON et al. (1971) e de ANDREWS e SHALLA (1974) sugerem que as inclusões lamelares seriam formadas na membrana plasmática, em associação com os plasmodesmas, podendo demorar a distribuição sistêmica de víriões. Nesta mesma linha encontra-se a interpretação dada por CHAMBERLAIN (1974, 1975) à correlação negativa observada entre intensidade dos sintomas e quantidade e tamanho das inclusões induzidas por "ryegrass mosaic virus"

em diferentes linhagens de Lolium multiflorum. Considera esta autora que as inclusões seriam produzidas pela planta em resposta à infecção viral, como parte do seu mecanismo de tolerância. Estas interpretações levam implícito o conceito de que as inclusões dificultam o estabelecimento do vírus na hospedeira, o que não concorda com o fato mais recentemente demonstrado, de serem as inclusões formadas por proteína codificada pelo próprio vírus. (DOUGHERTY & HIEBERT, 1980b).

Outra possível função das inclusões lamelares foi sugerida por MATTHEWS (1981) que considera que seriam reservatórios de proteína do capsídeo viral, de uma forma que precisa ainda ser processada antes da montagem do vírus. Segundo esta hipótese a proteína das inclusões lamelares, com peso molecular de 68-70K, conteria um fragmento de 30K com a sequência da proteína do capsídeo, embora oculta para o reconhecimento serológico. Este fragmento correspondente à proteína capsidial seria liberado pela ação de alguma enzima proteolítica, para sua utilização na montagem das partículas virais. Até o presente não existem evidências que dêem suporte à hipótese de MATTHEWS.

Qualquer que seja a função das inclusões lamelares, deve ser bastante importante para o vírus já que em alguns potyvirus, como o TEV, 50% do genoma é dedicado à informação referente às inclusões citoplasmática e intranucleares (DOUGHERTY & HIEBERT, 1980c).

2, Associação entre vírus e organelas celulares

Diversos vírus vegetais aparecem na célula infectada em estreita associação com organelas celulares. Por exemplo o vírus do anel do pimentão (VAP, Tobravirus), de morfologia alongada e partículas de dois tamanhos (200 nm e 50 nm), ocorre dentro da célula em agregados onde os vírions têm uma ou as duas extremidades em contato com a membrana externa de mitocôndrias (KITAJIMA & COSTA, 1969). Os tymovirus, cuja partícula é isométrica de ca. 30 nm de diâmetro, têm seu genoma sintetizado no cloroplasto e as partículas são montadas na superfície desta organela (MATTHEWS, 1981).

As partículas dos potyvírus podem ser vistas alinhadas na superfície do tonoplasto (HOLLINGS & BRUNT, 1981), ou aderidas à membrana externa das mitocôndrias no caso de Datura infectada pelo "henbane mosaic virus" (KITAJIMA & LOVISOLO, 1972). As inclusões lamelares induzidas pelos potyvirus têm sido descritas associadas ao retículo endoplasmático, aparentemente envolvido na formação destas inclusões (HOOPER & WIESE, 1972), e também em contato com a membrana plasmática, geralmente nas proximidades de uma área de plasmodesmas (ANDREWS & SHALLA, 1974). As inclusões induzidas pelo potyvírus causador do mosaico da cenoura foram observadas em contato com vesículas provavelmente derivadas do Golgi por CAMARGO et al. (1971).

3. Peroxisomas e infecção viral

Os peroxisomas são organelas citoplasmáticas morfológicamente definidas como microcorpos, que se caracterizam por possuir catalase e pelo menos uma oxidase produtora de peróxido de hidrogênio (água oxigenada, H_2O_2). Estes microcorpos têm sido observados em praticamente todos os tipos de células vegetais, são limitados por uma membrana simples, e seu diâmetro varia entre 0,2 e 1,5 μm (MOLLENHAUER et al., 1966). Os peroxisomas foliares, característicos do parênquima do mesófilo, são especialmente conspicuos pelo maior tamanho, e também pela abundância desta organela (HUANG et al., 1983). Um tipo particular de peroxisoma são os glioxisomas, comumente encontrados em tecidos de sementes ricos em lipídios, que têm um importante papel na mobilização das reservas seminais (BEVERERS, 1979). Embora todos os tipos de peroxisomas possuam algumas enzimas básicas comuns (catalase mais alguma oxidase), em alguns tecidos contêm enzimas adicionais que participam em metabolismos específicos. Um claro exemplo disto é a especialização para a síntese de alantoina, que ocorre nos peroxisomas de células dos nódulos da raiz em algumas leguminosas (HUANG et al., 1983).

A função dos peroxisomas foliares não está ainda totalmente caracterizada, embora sejam junto aos glioxisomas, os microcorpos melhor conhecidos (TOLBERT & ESSNER, 1981). Não há dúvidas de que os peroxisomas estão envolvidos no fenômeno da fotorrespiração, um processo que consome uma parte significativa da energia capturada

através da fotossíntese, mas não pode ser considerada a organela da fotorrespiração, pois neste processo intervem também cloroplastos, mitocondrias e citoplasma (ou citosol). As enzimas presentes no interior do peroxisoma estão, em geral, relacionadas com o metabolismo do glicolato, e visariam à reutilização deste composto cuja formação parece ser uma consequência inevitável da fotossíntese numa atmosfera com 21% de oxigênio. Embora com consumo de energia, o peroxisoma permite através das suas enzimas, e em cooperação com a mitocôndria, a formação de glicerato utilizável no ciclo fotossintético (ciclo de Calvin), e dos aminoácidos serina e glicina (TOLBERT, 1980).

Uma das enzimas características do peroxisoma é a catalase, uma hemoproteína que é capaz de decompor o peróxido de hidrogênio (água oxigenada). Embora tenha sido bastante estudado o efeito das infecções virais sobre uma outra enzima de natureza hemínica não localizada no peroxisoma, a peroxidase (VEGETTI et al., 1975, SHEEN & DIACHUN, 1978), muito pouco existe na literatura sobre efeito da infecção viral sobre a catalase. De ZOETEN et al. (1973) citam resultados não publicados sobre um aumento da atividade catalásica em tecidos de ervilha infectados com "pea enation mosaic virus". Este vírus não aparece, na célula infectada, relacionado com os peroxisomas (PETERS, 1982).

Alterações dos peroxisomas por efeito da infecção viral foram descritas por KITAJIMA & COSTA (1974) para o vírus do mosaico da beringela, e por RUSSO et al. (1983) para o "Cymbidium ring spot virus". Para nenhum destes vírus foram estudadas alterações

de atividades enzimáticas localizadas no peroxisoma.

Segundo EDWARDSON (1974) os microcorpos podem aparecer como parte das massas formadas por mitocôndrias, retículo endoplasmático e outras organelas, junto às inclusões lamelares induzidas pelos potyvirus. Segundo este autor o número de microcorpos parece aumentar em resposta à infecção por alguns potyvirus.

No presente estudo é descrita a associação das inclusões lamelares induzidas pelo vírus do mosaico comum da soja, com peroxisomas foliares. A identificação desta organela é confirmada através do estudo citoquímico ao nível de microscopia eletrônica. É também analisado o efeito da infecção viral sobre o número de peroxisomas por célula e a formação de agregados destas organelas. A alteração na atividade de uma enzima peroxisomal, a catalase, é analisada em relação com a infecção viral e comparada com o comportamento de uma enzima não peroxisomal: a peroxidase.

III, MATERIAIS E MÉTODOS

1. Vírus e plantas hospedeiras

Foram utilizados no presente estudo vários isolados do vírus do mosaico comum da soja mantidos in vivo na coleção da Seção de Virologia do Instituto Agronômico de Campinas (IAC). A maior parte dos experimentos foi realizada utilizando o isolado SMV-10, caracterizado por induzir sintomas severos, e o isolado SMV-8 que induz sintomas suaves. A inoculação das plantas foi feita pelo método mecânico tradicional: polvilhamento com carborundo malha 450 e posterior aplicação manual do inóculo, obtido por maceração de folhas infectadas em almofariz, em tampão fosfato 20mM, pH 7,0, com igual molaridade de sulfito de sódio.

Duas variedades comerciais de soja foram utilizadas: Santa Rosa, uma variedade muito susceptível ao VMCS, e IAC-2, um cultivar (cv.) desenvolvido pelo Instituto Agronômico de Campinas que é medianamente tolerante ao VMCS. Normalmente as plantas foram inoculadas no estágio de duas folhas primárias e mantidas em condições de casa de vegetação durante todo o estudo. No experimento destinado a observar alterações na atividade enzimática da folha inoculada, a inoculação foi feita na primeira folha trifoliolada.

2. Microscopia eletrônica

2.1. Preparação de amostras para estudo morfológico

Amostras de folhas das diferentes combinações de cultivares de soja e de isolados de VMCF, ou sadias, foram processadas para o exame ao microscópio eletrônico, segundo o seguinte esquema:

1. Fixação em mistura de aldeídos, consistente em 2,5% de glutaraldeído e 4,0% de formaldeído (obtido por despolimerização de paraformaldeído) em tampão cacodilato 50 mM, pH 6,8 (KARNOVSKY, 1965), durante duas horas a 1-4°C.
2. Posfixação em tetróxido de ósmio (OsO_4) 1% em tampão cacodilato 50 mM, pH 6,8 durante 12-14 horas a 1-4°C.
3. Contrastação in bloco com acetato de uranila 2% em tampão Na-maleato 50 mM, pH 6,2 (pH final aproximado de 5), durante 4-5 h a 4°C e protegido da luz (KARNOVSKY, 1967).
4. Após lavagem em água destilada, o material foi desidratado numa série de soluções de acetona de concentrações crescentes, até acetona anidra, onde foram feitas três trocas.
5. Inclusão em resina epoxi, segundo a formulação proposta por MOLLENHAUER (1964) consistente numa mistura de Araldite 6005 e Epon 812.

Os cortes ultra-finos (cor de interferência prata ou levemente dourada) foram obtidos num ultramicrótomo Porter Blum MT-1

(Sorvall- Du Pont) e coletados em telinhas de cobre malha 100 com filme de Parlodium reforçado com carbono. Após contrastação com citrato de chumbo (VENABLE & COGGESHALL, 1965), os espécimes foram observados num microscópio eletrônico Elmiskop I (Siemens) operando a 80 KV.

Alguns experimentos foram realizados acrescentando na primeira fixação o aditivo DIECA (dietil-ditio-carbamato de sódio) 10 mM, que segundo LANGENBERG e SCHROEDER (1973) melhora a preservação das inclusões laminadas. Foi também utilizada a fixação simultânea em glutaraldeído 4% e Os\$4 1%, em tampão cacodilato 50 mM, pH 6,8 em condições de banho de gelo durante 2 h (GLAUERT, 1975), e posteriormente completado o processo anteriormente descrito a partir da contrastação com acetado de uranila.

2.2. Citoquímica

A localização intracelular da catalase foi feita utilizando 3,3'-diaminobenzina (DAB) (NOVIKOFF & GOLDFISHER, 1969), segundo o método de VIGIL (1969). O princípio do método é a atividade peroxidásica da catalase em condições de pH alto (ca. 9,0-10,0), que em lugar de liberar oxigênio, como o faz normalmente na função catalásica, oxida a DAB formando um composto insolúvel que se torna opaco aos elétrons durante a osmicação e pode ser identificado facilmente ao microscópio eletrônico. O esquema de processamento foi o seguinte.

1. Fixação em glutaraldeído purificado 3% em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 durante 90 minutos a 4°C e posterior lavagem no mesmo

- tampão por 2h.
2. Pre-incubação no meio de DAB sem H_2O_2 durante 20 min. a 37°C para facilitar a penetração da DAB.
 3. Incubação no meio de DAB completo, durante 45 min. a 37°C. O meio de DAB completo consiste em : DAB (tetra cloridrato) 5,5 mM, tampão propanediol (2-amino-2-metil-1,3-propanodiol) 50 mM, pH 9,0 e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 17 mM. Após a inoculação o material é lavado no mesmo tampão e tratado com ósmio 12-14 horas a 1-4°C.
 4. Desidratação e inclusão segundo o mesmo esquema utilizado para o estudo morfológico.

Os espécimes preparados para citoquímica foram examinados ao microscópio eletrônico sem nenhum tipo de contrastação, ou como indicado em algumas micrografias, contrastados na telinha com acetato de uranila 2% em água e citrato de chumbo segundo VENABLE e COGGESHALL (1965).

Para o estudo citoquímico ao microscópio óptico foram examinados cortes semi-finos, de ca. 1,5-2,0 μ m de espessura montados em lâmina de vidro. Estes espécimens foram examinados levemente contrastados com azul de toluídina, que facilita o reconhecimento dos diferentes tipos de tecidos.

3. Determinação de atividade enzimáticas

3.1. Preparação dos extratos

Foram realizados ensaios preliminares com diversos tampões e métodos de extração, procurando maximizar a atividade enzimática, especialmente da catalase que ocorre em níveis relativamente baixos e é afetada por diversos fatores. O método utilizado nos experimentos consistiu na homogenização em almofariz frio de 0,4 a 1,0 g de folha, em 2-3 ml de tampão Tris - HCl 50 mM, pH 7,7 e centrifugado a 5.000 r.p.m. por 20 min. e o sobrenadante foi diretamente utilizado na dosagem de atividade enzimática. Todo o processo de extração foi realizado a 4°C e os extratos mantidos em banho de gelo até o ensaio enzimático, que no caso da catalase foi executado no mesmo dia da extração e para a peroxidase no máximo até 48 horas após a extração. Foi comprovado em ensaios preliminares, que nestes períodos as atividades enzimáticas dos extratos não são alteradas.

Para o cálculo de atividade por matéria seca foi determinada a porcentagem de peso seco de uma alíquota de cada amostra, por secagem a 80°C durante 48 horas.

3.2. Ensaio da catalase (EC 1.11.1.6)

A catalase foi dosada pelo método espectrofotométrico (LÜCK, 1965) que consiste em monitorar a decomposição da água oxigenada a 240 nm (ultravioleta). O ensaio foi realizado em célula espectrofotométrica de sílica de 10 nm de espessura (caminho óptico), contendo 3 ml de tampão fosfato-citrato 65 mM, pH 7,0 com 50 µl do

do extrato cuja atividade catalásica deve ser dosada. A reação é iniciada acrescentando 40 μmol (40 μl de solução 1 M) de H_2O_2 por meio de bastão de vidro que permite agitar a mistura. As leituras da DO (densidade óptica) foram feitas a cada 20 segundos durante o primeiro minuto de reação, e a cada 30 segundos no segundo minuto. Para o cálculo da atividade catalásica foram utilizados os critérios definidos por LÜCK (1965), mas ajustando uma reta de regressão para o logaritmo natural da DO vs. tempo, a fim de utilizar no cálculo as cinco primeiras leituras de DO (primeiro minuto e meio de reação). Com este procedimento evita-se o erro que pode resultar da utilização da leitura inicial e final unicamente:

$$k = \frac{1}{\Delta t} (\ln DO_1 - \ln DO_2) \quad \text{ou} \quad k = \frac{1}{\Delta t} \ln \frac{DO_1}{DO_2}$$

onde Δt : intervalo de tempo entre as leituras

DO_1 : densidade óptica inicial

DO_2 : densidade óptica final

O valor k de atividade enzimática foi convertido em unidades de catalase, já que a reação catalizada por esta enzima deve ser considerada de primeira ordem. Uma unidade de catalase é a quantidade de enzima que decompõe a metade do peróxido de hidrogênio, de uma solução de qualquer concentração, em 100 segundos a 25°C (LÜCK, 1965). Neste caso uma unidade de catalase (UC) corresponde a:

$$k_u = \frac{1}{100 \text{ seg}} \ln 2 = \frac{0,693}{100 \text{ seg}} = 6,93 \cdot 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$$

O número de unidades de catalase presentes na amostra é obtido pela relação entre o k observado e o $k_u = 6,93 \cdot 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$

$$UC = \frac{k \text{ observado}}{6,93 \cdot 10^{-3}}$$

A atividade catalásica foi expressada em UC por g de peso fresco ou por mg de peso seco, considerando nos cálculos o volume de extrato obtido, o peso fresco de material extraído e a porcentagem de peso seco do mesmo.

3.3. Ensaio da peroxidase (EC 1.11.1.7)

A peroxidase foi dosada pelo método de FARKAS e STAHMANN (1966), que utiliza guaiacol como doador de eletrons, e cuja oxidação pode ser acompanhada espectrofotometricamente a 470 nm. O ensaio foi realizado em célula espectrofotométrica de 10 mm de espessura, num volume de 3 ml de tampão fosfato-citrato 65 mM, pH 7,0, com 9 μmol de guaiacol e 0,1 ml de extrato enzimático. A reação é iniciada pela adição de 20 μmol de substrato, água oxigenada, e após misturar foram feitas leituras da DO cada 20 segundos, no primeiro minuto, e cada 30 seg. no segundo. O valor da atividade enzimática foi obtido ajustando uma reta de regressão (método de mínimos quadrados) aos valores de DO obtidos no primeiro minuto e meio de reação. Neste período a resposta foi linear. A atividade peroxidá-

sica foi finalmente expressada em variação de DO por grama de peso seco e por minuto ($\Delta \text{DO. g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

3.4. Delineamento experimental

Para as determinações de atividade enzimática foi utilizado um lote de 36 plantas do cv. Santa Rosa e igual número do cv. IAC-2. Metade das plantas de cada variedade foi inoculada com VMCS, e as não inoculadas utilizadas como controle. Três blocos formados com seis plantas de cada um dos quatro tratamentos resultantes, foram dispostos na casa de vegetação na forma de blocos aleatorizados. Para cada amostragem foi retirado um folíolo de cada folha, juntado aos folíolos das folhas da mesma idade e tratamento, e processados separadamente para cada bloco. Desta maneira foram obtidas três determinações independentes da atividade enzimática para cada um dos quatro tratamentos e para cada idade de folha.

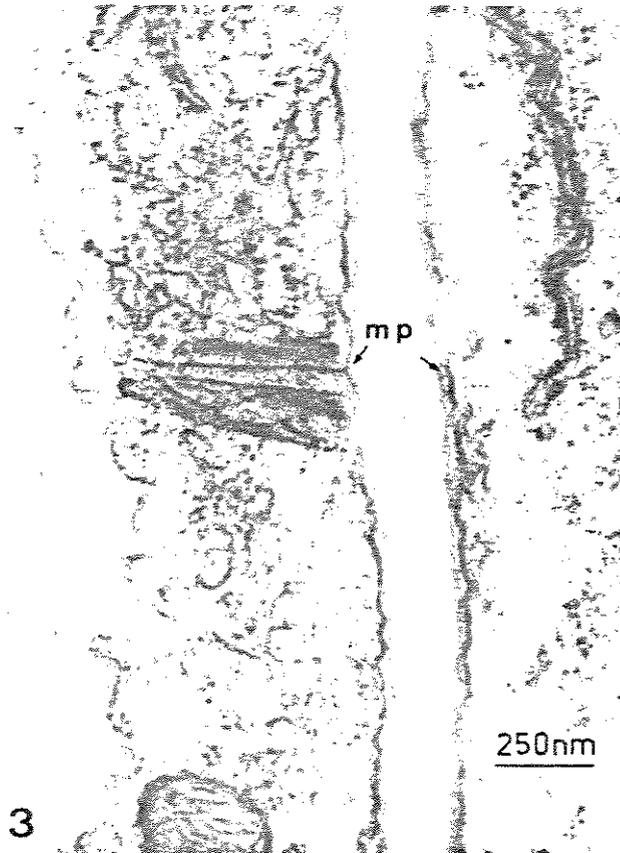
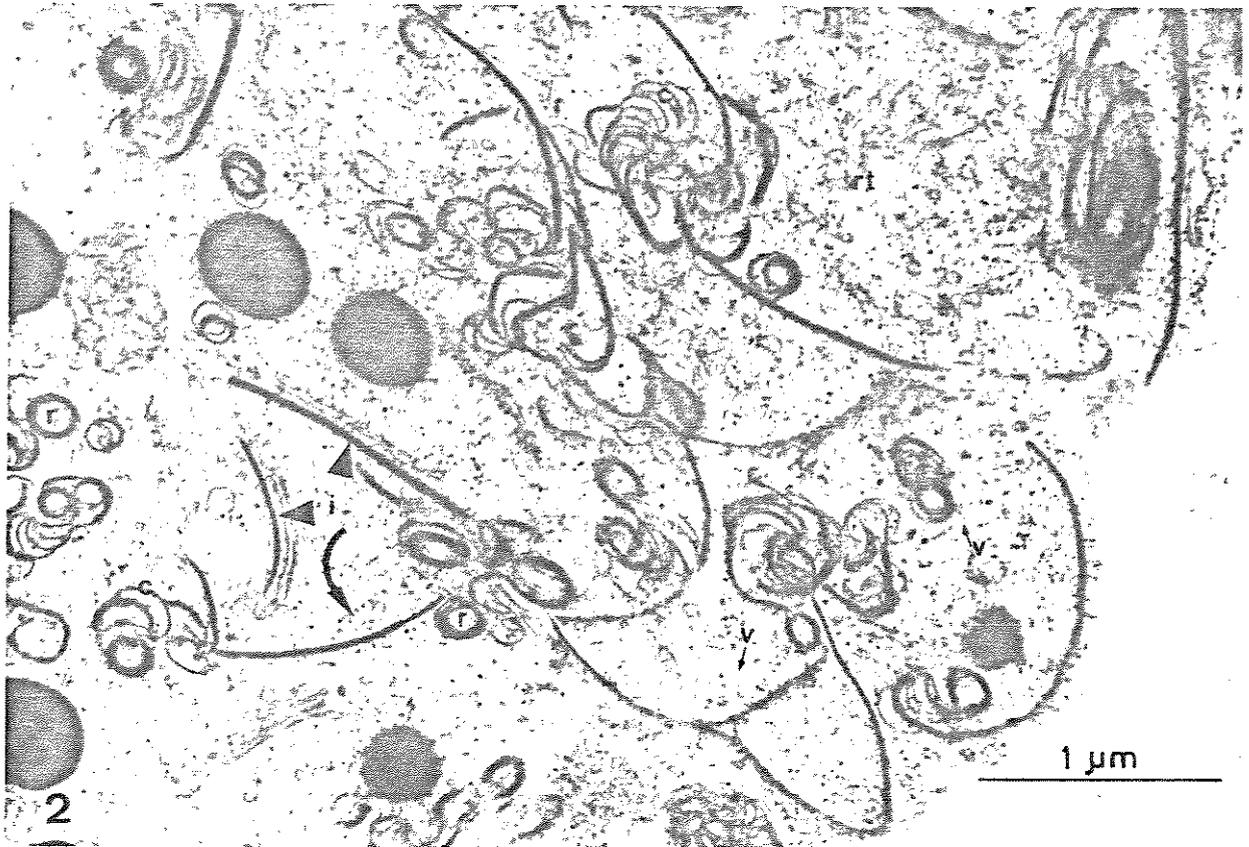
IV. RESULTADOS

1. Alterações da estrutura celular

O vírus do mosaico comum da soja, como todos os potyvirus, induz a formação de inclusões lamelares no citoplasma, principalmente nas células da epiderme e do parênquima fotossintetizante das folhas de soja. Estas inclusões são do tipo rolos e cataventos e também inclusões laminadas que embora menos comuns aparecem com certa frequência nas células epidérmicas (Fig. 2). Nas folhas que receberam a inoculação somente algumas células contêm inclusões lamelares, que ocorrem em escasso número e geralmente em contato com a membrana plasmática (Fig. 3,4). Nas folhas invadidas sistemicamente a maior parte das células do mesófilo e da epiderme contêm abundantes inclusões lamelares, geralmente formando grupos próximos ao núcleo celular (Fig. 6). Estes grupos atingem maior tamanho, e são formados por um número maior de inclusões, nas células epidérmicas (Fig. 2). Em alguns casos os grupos se formam em volta de uma região citoplasmática de acúmulo de membranas do retículo endoplasmático, formando túbulos e vesículas (Figs.2,5).

Fig. 2. Inclusões lamelares induzidas pelo isolado SMV-10 do VMCS numa célula epidérmica de soja Santa Rosa. Aparecem inclusão tipo rolo (r), cataventos (c) e laminadas (i) . v. partículas virais, rt: retículo endoplasmático tubular.

Figs. 3-4. Inclusões lamelares na folha inoculada (isolado SMV-10 no cv. Santa Rosa) próximas à membrana plasmática (mp) e a plasmodesmas (p).



1.1. Contato das inclusões lamelares com organelas celulares

Nas folhas invadidas sistemicamente é muito frequente observar nas células do mesófilo, que as inclusões lamelares aparecem em contato com organelas citoplasmáticas do tipo dos microcorpos (Figs. 5,7). Nas folhas que receberam a inoculação mecânica não foi observada a associação das inclusões lamelares com os microcorpos.

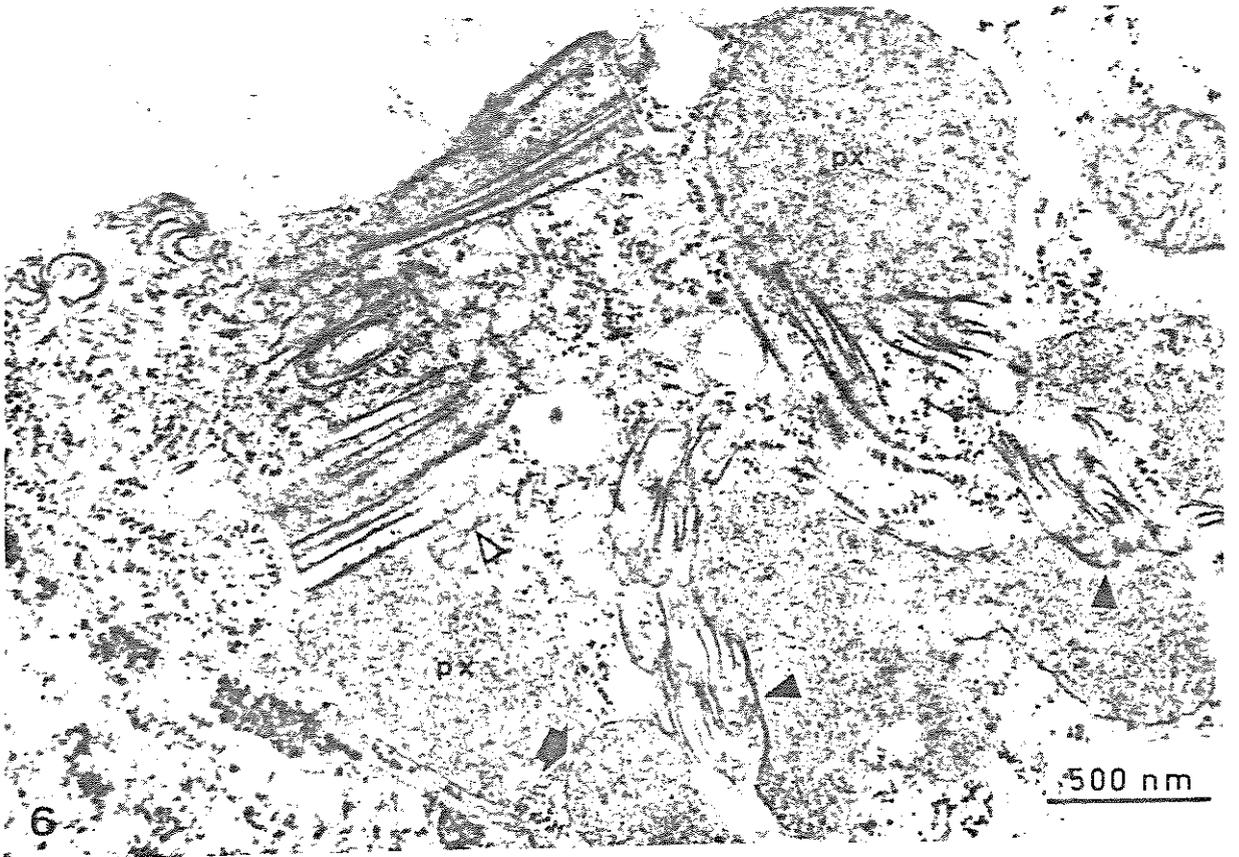
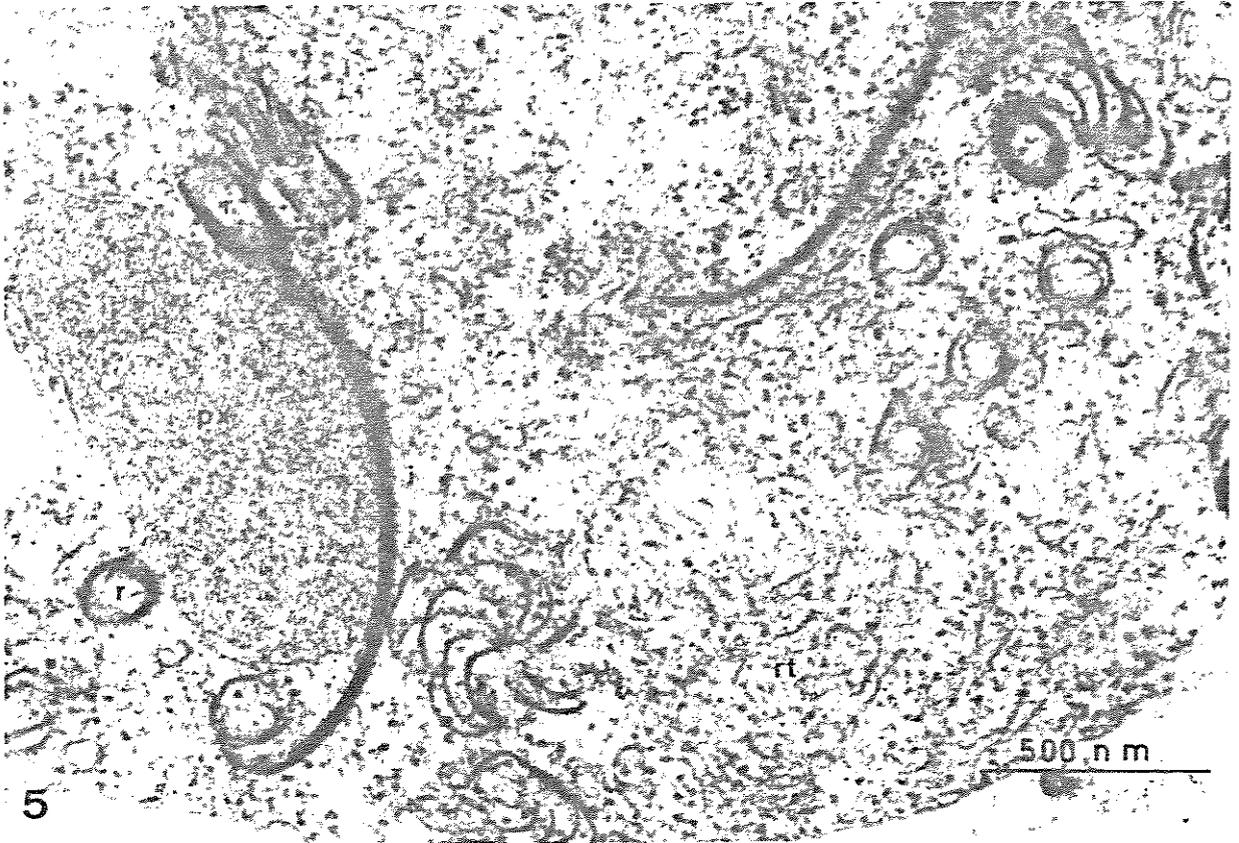
As organelas observadas em contato com as IL têm diâmetro entre 0,5 e 1,5 μm , são limitadas por uma membrana trilaminar simples e seu conteúdo, de aspecto finamente granular, apresenta em alguns casos uma região mais densa aos elétrons (Fig. 7). Estas organelas, caracterizadas morfológicamente como microcorpos, correspondem aos peroxissomas, como demonstrado mais adiante.

O contato das inclusões parece produzir deformação da organela, por invaginação da membrana, dando a impressão de que a IL "empurra" a membrana para o interior (Fig. 7). Em outras micrografias há sugestão de que a membrana externa da organela tende a acompanhar a superfície da inclusão (Fig. 6).

1.2. Identificação citoquímica das organelas associadas às inclusões lamelares

A localização da catalase ao nível ultraestrutural, através da reação com diaminobenzidina (DAB), demonstrou que as

Fig. 5. Inclusão tipo laminado (i) e rolos (r) em contato com um peroxisoma (px), rt: retículo endoplasmático tubular. Isolado SMV-10, cv. Santa Rosa. Fig. 6. Inclusões laminares induzidas pelo isolado SMV-8 no cv. Santa Rosa, em contato com peroxisomas (px). As pontas de setas cheias indicam pontos onde as inclusões parecem "empurrar" a membrana peroxisomal; a ponta vazia indica a membrana que parece acompanhar a inclusão. A seta maior indica um ponto de contato entre peroxisomas onde poderia ocorrer fusão.



organelas associadas às inclusões contêm esta enzima (Figs. 8-16). Esta característica confirma que essas organelas são peroxisomas.

A atividade catalásica localizada através da reação da DAB aparece unicamente nos peroxisomas, especialmente conspicuos no parênquima fotossintético. Não foi possível demonstrar atividade catalásica, e por conseguinte presença de peroxisomas, nas células da epiderme.

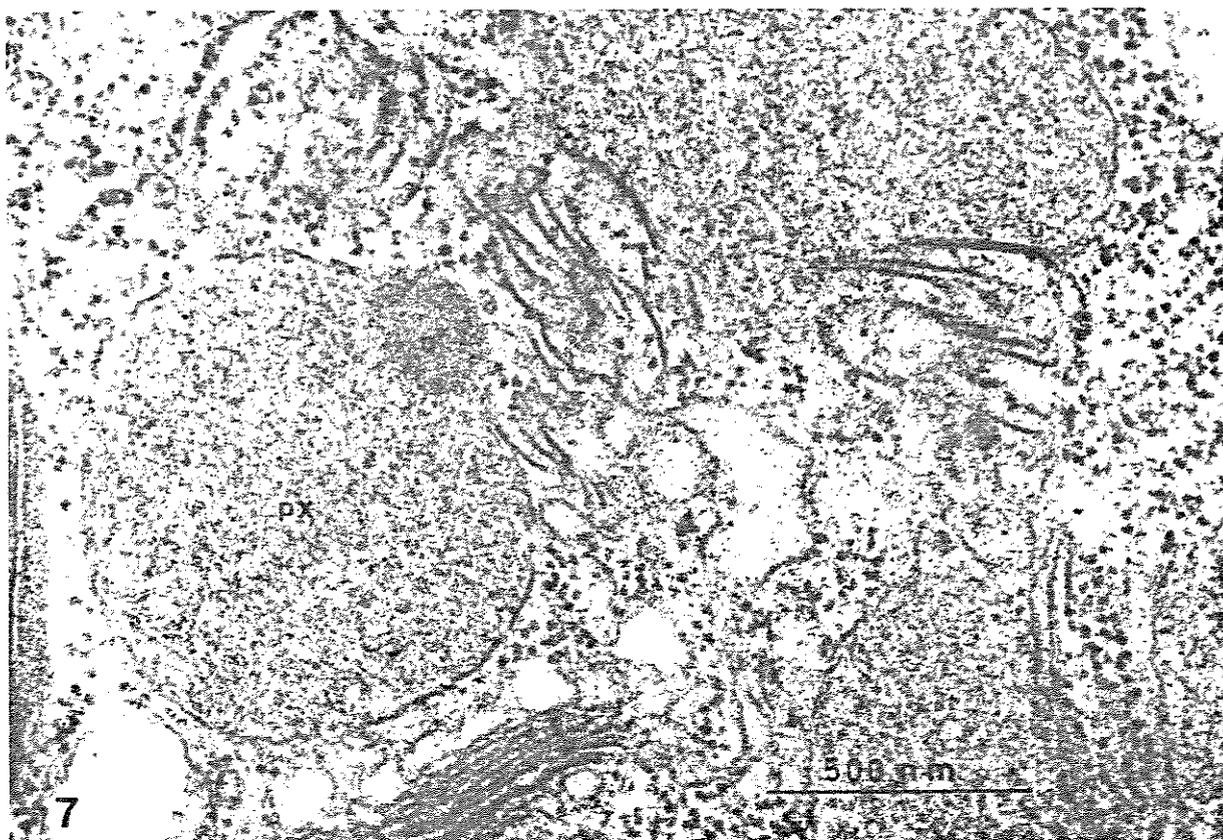
1.3. Aspectos da associação entre peroxisomas e inclusões lamelares

O fenômeno da associação entre IL e peroxisomas foi observado em diversas variedades, além das duas utilizadas no presente estudo: a Santa Rosa muito suscetível ao VMCS (Figs. 5-10), e a IAC-2 medianamente tolerante ao vírus (Figs. 11, 12, 16). Foi também verificado com diferentes isolados do VMCS, tanto nos severos como o SMV-10 (Figs. 5, 8-16), como nos que induzem sintomas fracos, como o SMV-8 (Figs. 6,7).

As inclusões podem aparecer em contato com peroxisomas que apresentam uma região mais densa, ou nucleóide, ou que carecem desta estrutura (Figs. 6,7). Também ocorre a associação entre inclusões lamelares de diferentes tipos com os peroxisomas (Figs. 5, 6).

Os métodos de fixação utilizados não afetaram a associação entre peroxisoma e IL. Assim o aditivo DIECA utilizado na primeira fixação com aldeídos não parece influenciar o fenômeno observado.

Fig. 7. Inclusões lamelares em contato com peroxisomas, um deles con-
tendo um nucléoide eletrodenso (n). Isolado SMV-8, cv. San-
ta Rosa. Figs. 8-9. Reação da DAB para localização da ati-
vidade catalásica, que aparece como depósito eletrodenso nos
peroxisomas. Observe-se a forte deformação que ocorre na
região de contato com as inclusões lamelares. Isolado SMV-
10, cv. Santa Rosa; c: cloroplasto.



Também o uso da fixação dupla simultânea com glutaraldeído e tetróxido de ósmio, que destroi rapidamente todo tipo de atividade enzimática, permite visualizar o contato entre IL e peroxisomas. Deve-se lembrar que o peroxisoma é uma organela relativamente frágil, cuja visualização clara depende de uma boa fixação.

A associação das IL com os peroxisomas só foi observada em folhas invadidas sistemicamente. Nas folhas inoculadas somente foi possível detectar escassas inclusões, geralmente em contato com a membrana plasmática, como mencionado acima (Figs. 3,4).

A localização da catalase através da DAB mostra que a distribuição desta enzima no interior do peroxisoma não é alterada pelo contato com as IL, mas a conformação da organela parece ser bastante afetada (Figs. 8, 10, 13,15). O efeito mais evidente é a deformação que sofre a organela pelo contato com as IL, particularmente em comparação com a forma esferoidal dos peroxisomas das plantas sadias (Fig. 14). O contato entre peroxisomas e IL é tão estreito que é frequente observar esta organela profundamente deformada por uma invaginação contendo uma inclusão, ficando no corte como uma ferradura em volta da IL (Fig.10). Em alguns casos foi observada a presença de inclusões no interior de peroxisomas, dando a impressão de que as IL seriam incorporadas à matriz da organela (Fig. 16). Em células desorganizadas, provavelmente por dano mecânico na extração da amostra, onde se mistura o conteúdo do vacúolo com o citoplasma é possível observar que peroxisomas e IL se mantêm juntos (Fig. 11). Isto sugere a existência

Fig. 10. Grupo de peroxisomas agregados por inclusões lamelares. A seta indica uma inclusão quase totalmente rodeada por um peroxisoma em forma de ferradura. Isolado SMV-10, cv. Santa Rosa. Fig. 11. Inclusões lamelares aparentemente aderidas aos peroxisomas numa célula desorganizada. Isolado SMV-10 no cv. IAC-2, reação da DAB. Fig. 12. Grupo de peroxisomas agregados em volta de uma inclusão lamelar bem desenvolvida. c: cloroplasto. Variedade IAC-2, isolado SMV-10, submetido à reação da DAB.

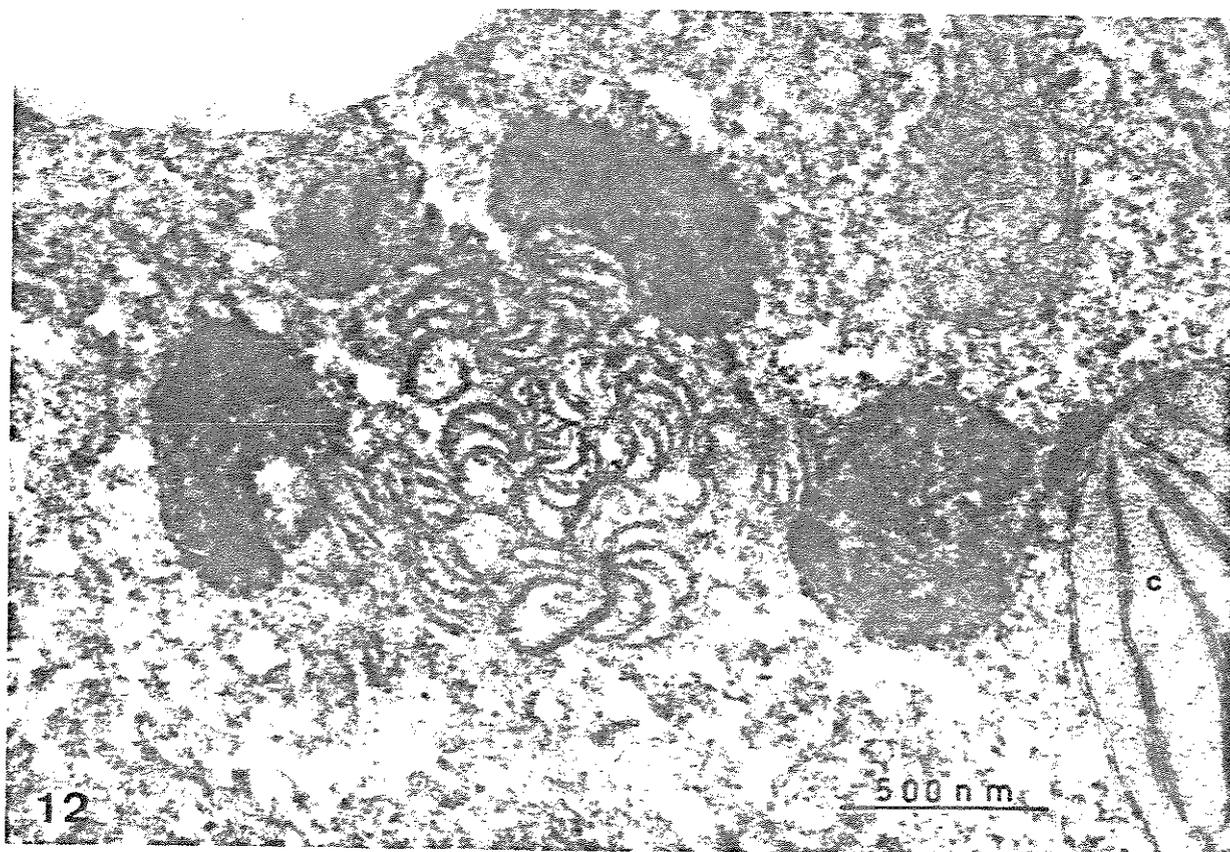
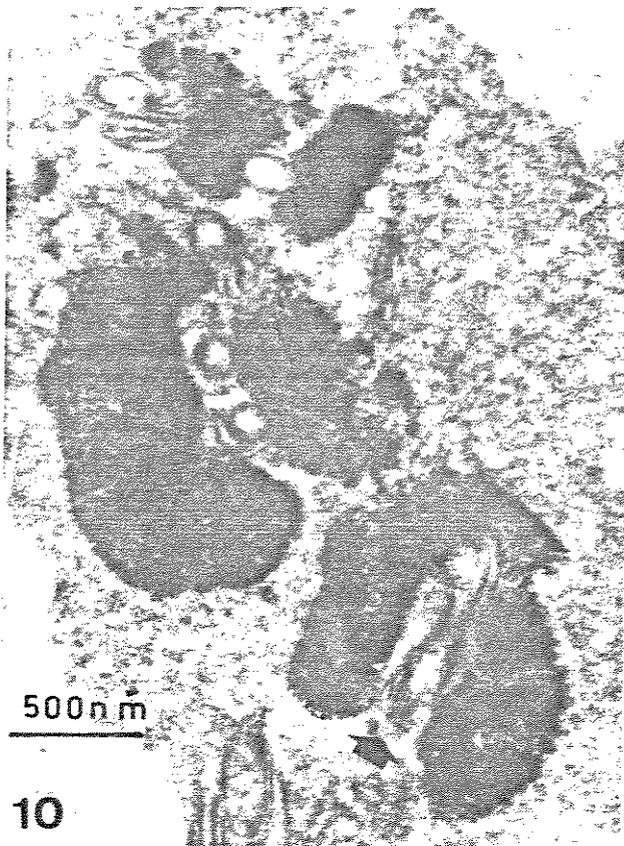
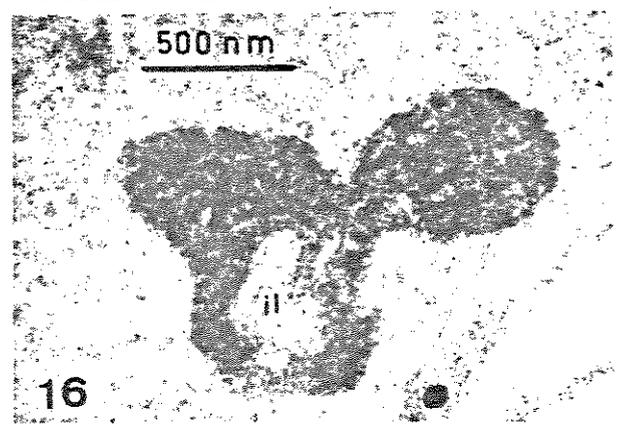
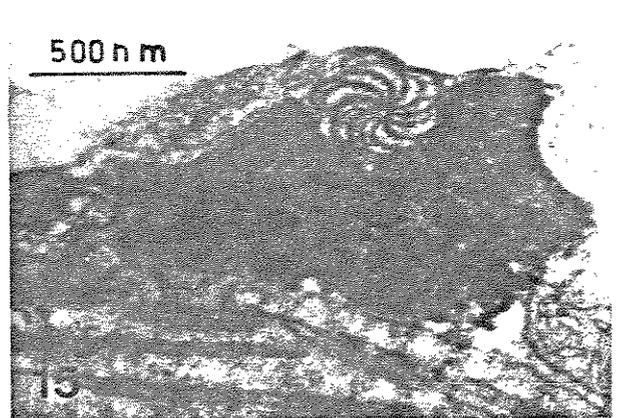
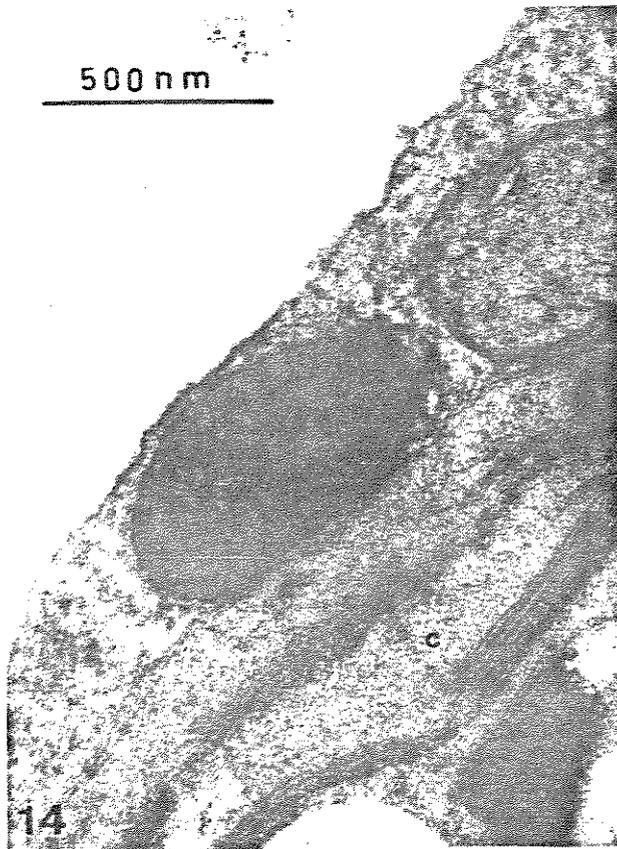
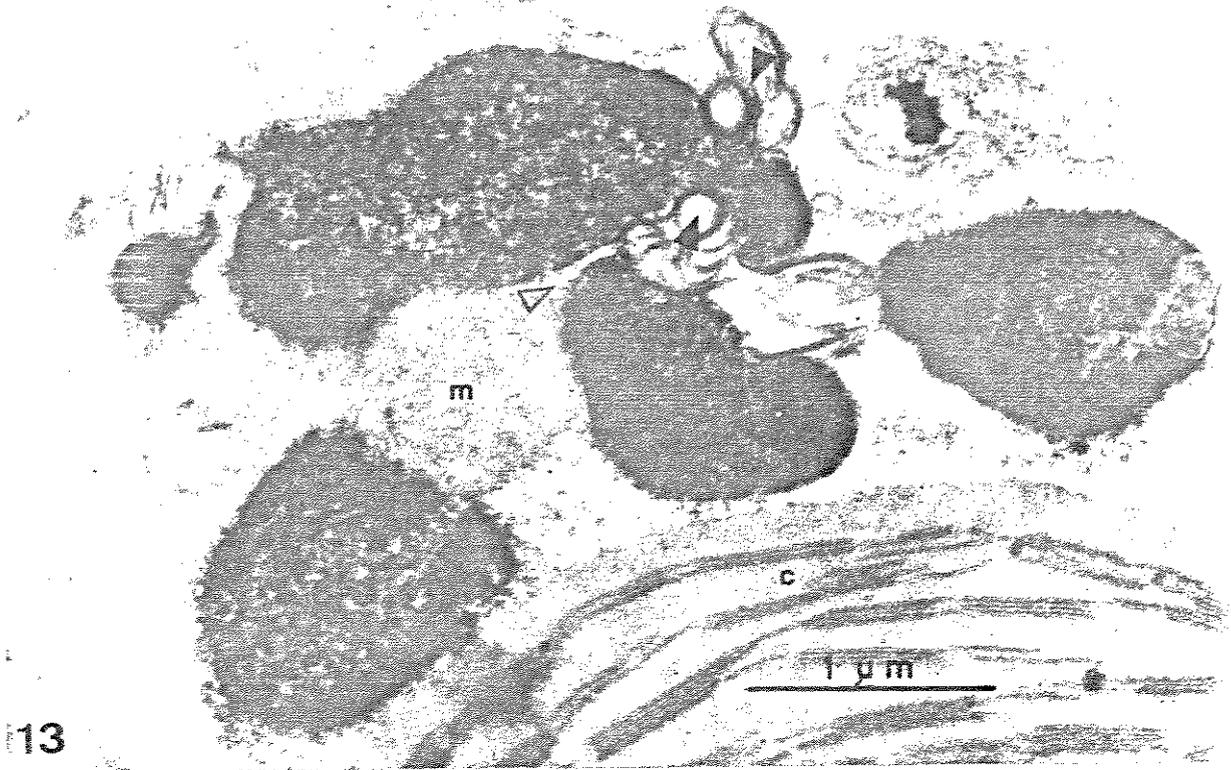


Fig. 13. Grupo de peroxisomas fortemente deformados pelas inclusões lamelares. As pontas de setas cheias indicam uma aparente fragmentação do peroxisoma por inclusões. A ponta da seta vazia indica uma região de possível contato de peroxisomas. Isolado SMV-10, cv. Santa Rosa, reação da DAB. Fig. 14. Peroxisoma de folha de planta controle, c: cloroplasto, variedade IAC-2, submetido à reação da DAB. Fig. 15. Inclusão tipo catavento parcialmente incluída num peroxisoma marcado pela reação da DAB. Cv. Santa Rosa com isolado SMV-10. Fig. 16. Inclusão lamelar (il) aparentemente incluída na matriz peroxisomal. Isolado SMV-10 em cv. IAC-2, reação de DAB.



de algum tipo de adesão entre a membrana da organela e as IL.

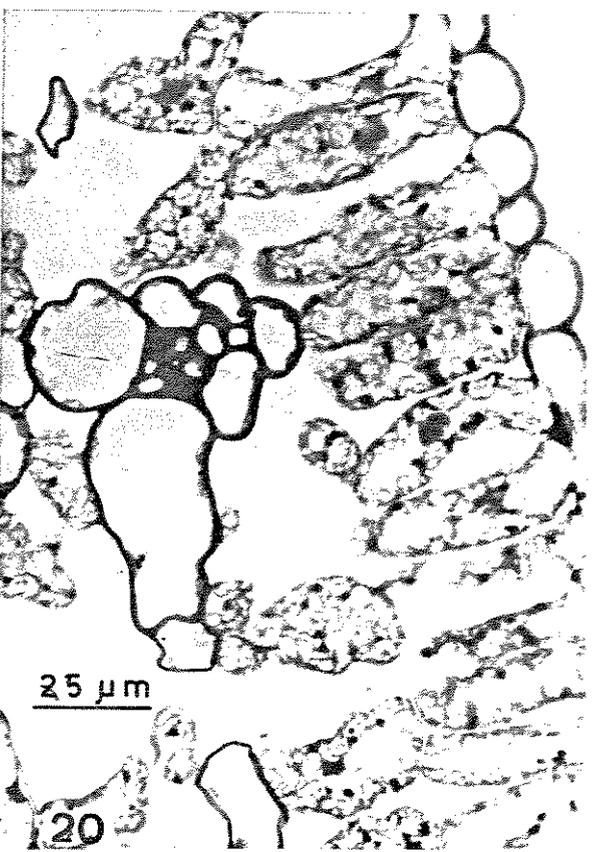
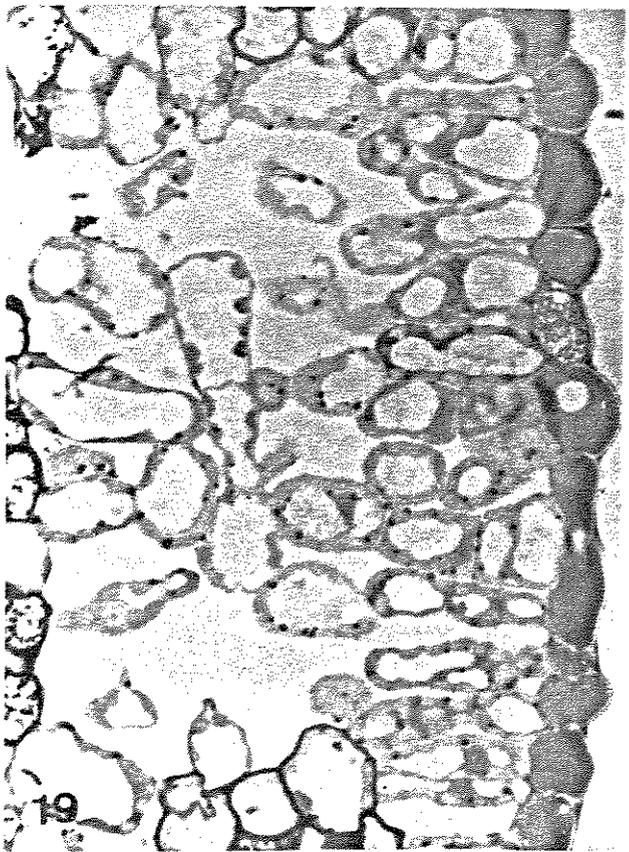
O depósito eletro-denso formado pela DAB oxidada pela catalase destaca claramente os peroxisomas, e nos tecidos infectados evidencia a formação de agregados destas organelas em volta das inclusões lamelares (Figs. 10, 12,13), que podem também ser visualizados no microscópio óptico (Fig. 18).

1.4. Efeito da infecção viral na distribuição e quantidade dos peroxisomas

A observação ao microscópio óptico de cortes semi-finos, de materiais submetidos à reação da DAB, permitiu visualizar claramente os peroxisomas. O nível de aumento desta técnica é adequado para avaliar a quantidade e distribuição dos peroxisomas num número bastante alto de células.

Na comparação entre materiais sadios e infectados por VMCS é evidente que a distribuição dos peroxisomas no interior de cada célula do mesófilo, é alterada pela infecção viral. Nas plantas sadias esta organela tem uma distribuição bastante uniforme no citoplasma (Figs. 17 e 19). Nos cortes de folhas infectadas os peroxisomas aparecem formando agregados que, em alguns casos, envolvem a maior parte dos peroxisomas visíveis no corte da célula (Figs. 18 e 20). A tendência à agregação dos peroxisomas é mais manifesta na variedade Santa Rosa do que na IAC-2.

Figs. 17-20. Fotomicrografias de cortes semifinos obtidos de materiais submetidos à reação da DAB, mostrando a distribuição dos peroxissomas nas células do parênquima fotossintetizante. O traço de referência é válido para as figuras 17-20. Fig. 17. Variedade Santa Rosa sadia. Fig. 18. Santa Rosa infectada com isolado SMV-10. Fig. 19. Variedade IAC-2 sadia. Fig. 20. Variedade IAC-2 infectada com isolado SMV-10.



Nos materiais infectados observa-se uma diminuição no número de peroxisomas visíveis em cada corte de célula do parênquima fotossintetizante. O resultado do estudo quantitativo efetuado sobre amostras aos 19 e 27 dias após a inoculação, são apresentados nas tabelas 1 e 2. Verifica-se que houve uma aparente diminuição no número de peroxisomas por corte de célula no cv. Santa Rosa, ao passo que esse valor não é alterado pela infecção viral no cv. IAC-2. Estes resultados devem ser interpretados com reservas pois a tendência à agregação dos peroxisomas, especialmente no cv. Santa Rosa, afeta a contagem desta organela de duas formas: 1. dificulta a identificação de peroxisomas individuais que formam grupos compactos, o que pode levar a considerar como uma organela a grupos delas e 2. em células onde o corte não passa através do único agregado de peroxisomas, a contagem é muito menor do que naquelas em que o agregado é parte do corte examinado.

2. Atividade enzimática em homogenados de folhas

Os estudos preliminares demonstraram que tanto a catalase (peroxisomal) como a peroxidase sofrem, por efeito da infecção viral, um significativo incremento, cuja magnitude depende de diversos fatores. Com a finalidade de identificar alguns destes fatores que afetam a reação foram utilizadas duas abordagens experimentais:

TABELA 1. Número de peroxisomas por corte de célula de folha (mesófilo) de soja cultivar Santa Rosa, determinados por microscopia óptica

Amostra (a)	Nº de células contadas	Média de peroxisomas por corte de célula \pm desvio padrão da amostra	Média geral
Controle			
1	38	4,9 \pm 2,6	4,2
2	99	3,8 \pm 1,7	
3	59	4,0 \pm 2,1	
4	41	5,2 \pm 2,5	
5	86	5,4 \pm 2,5	
6	54	3,3 \pm 1,6	
7	52	2,9 \pm 1,8	
Infectada			
1	52	2,9 \pm 1,8	3,1
2	20	2,6 \pm 1,5	
3	18	3,9 \pm 2,3	
4	31	3,7 \pm 1,8	
5	41	2,9 \pm 1,6	
6	47	3,1 \pm 1,7	
7	32	2,5 \pm 1,9	
t = 2,73 Significativo ao nível de 5% (b)			

a : Amostra 1-5 coletadas 19 dias após inoculação; amostras 6-7 coletadas 27 dias após inoculação.

b : O valor de "t" foi calculado considerando a média de cada amostra como uma determinação, sem levar em conta a variação interna desta.

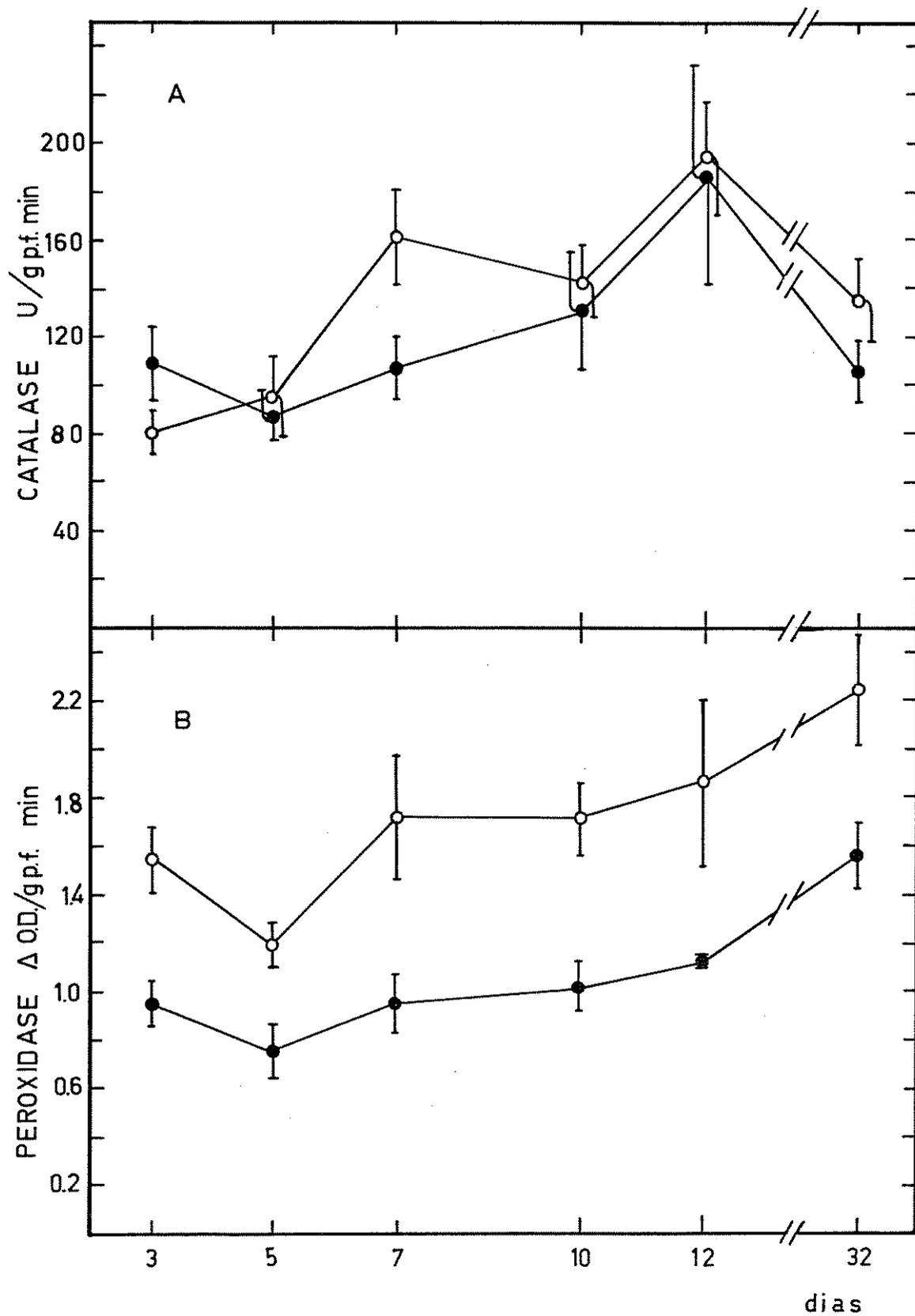
TABELA 2. Número de peroxissomas por corte de célula de folha (mesófilo) de soja cultivar IAC-2 determinado por microscopia óptica

Amostra (a)	Nº de células contadas	Média de peroxissomas por corte de célula ± desvio padrão da amostra	Média geral
Controle			
1	48	5,8 ± 2,5	4,8
2	71	4,8 ± 2,2	
3	64	3,6 ± 1,5	
Infectada			
1	32	4,6 ± 2,3	4,3
2	43	3,4 ± 1,7	
3	58	4,6 ± 2,0	
4	26	3,3 ± 1,5	
5	33	5,3 ± 2,3	
6	59	4,7 ± 2,4	
Valor de "t" : $t = 0,88$. Não significativo (b)			

a : Amostras controle 1-2 e infectada 1-3, coletadas 19 dias após a inoculação; amostras controle 3 e infectada 4-6, coletadas 27 dias após a inoculação.

b : O valor de "t" foi calculado utilizando cada média amostral como uma determinação, sem considerar a variação interna desta.

Fig. 21. Atividade catalásica (A) e peroxidásica (B) na folha inoculada (-o-) e no controle sadio (→), por grama de peso fresco. Cada ponto é a média de 4 ou 6 determinações in dependentes ± erro padrão.



1. Monitoração das atividades enzimáticas na fola inoculada no período imediatamente posterior à inoculação, visando determinar o envolvimento destas enzimas numa resposta local. 2. Dosagem de atividade enzimática em todas as folhas existentes em diferentes momentos da fase de manifestação de sintomas sistêmicos.

A análise dos resultados demonstrou que as duas variedades de soja estudadas não diferem na sua resposta à infecção viral, no que se refere à atividade das enzimas catalase e peroxidase. Por este motivo a análise estatística foi processada considerando cada variedade como uma repetição do experimento, elevando assim o número inicial de três repetições para seis. Isto tornou mais precisas as comparações entre materiais sadios e infectados, ao nível de cada uma das folhas.

2.1. Atividade enzimática na folha inoculada

A atividade da catalase na primeira folha trifoliolada, monitorada a partir do terceiro dia após a sua inoculação, não sofreu modificação significativa com relação à folha não inoculada (Fig. 21A). A partir do quinto dia a atividade desta enzima foi maior nas plantas inoculadas do que nas controle. Esta diferença, embora se tenha mantido até o fim do experimento, não atingiu uma magnitude significativa, mantendo-se abaixo de 20%.

A enzima peroxidase, ao contrário da catalase, foi bastante alterada pela inoculação do vírus já no terceiro dia após a inoculação. A partir desse dia se observou um aumento da atividade peroxidásica na folha inoculada da ordem de 50-70%, com relação à mesma folha da planta controle (Fig. 21B). A evolução da atividade ao longo do experimento foi igual para a folha inoculada e a controle: nas duas se verificou um aumento em função do tempo. Devido a este comportamento se manteve praticamente constante o diferencial entre as folhas sadia e inoculada, observado logo depois da inoculação.

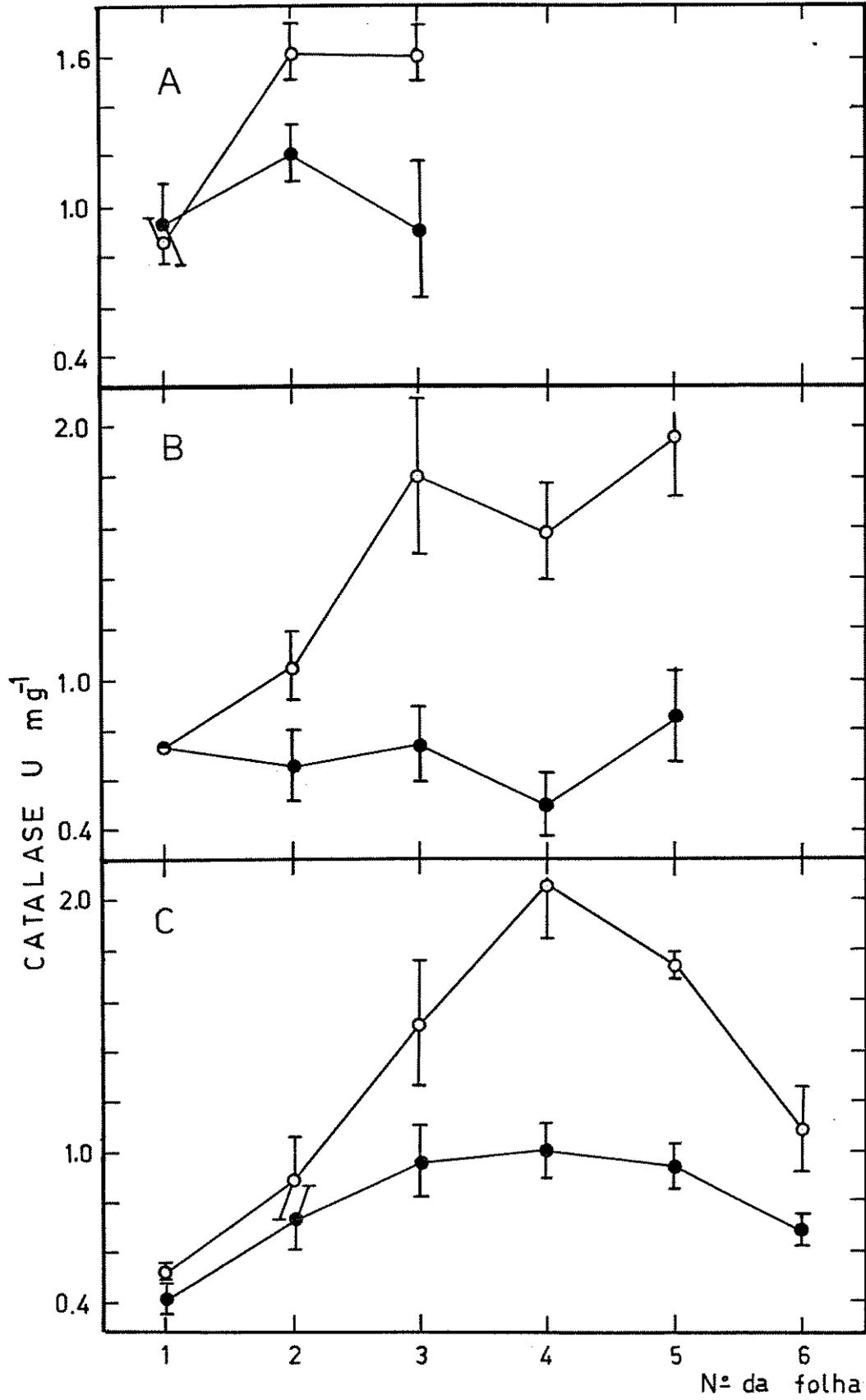
2.2. Atividade enzimática em folhas de diferentes idades na fase de sintomas sistêmicos

Os resultados destes experimentos podem ser analisados de duas maneiras: 1. Examinando a distribuição da atividade enzimática nas folhas de diferentes idades em cada uma das três amostragens; 2. Acompanhando a evolução da enzima em cada folha em função do tempo. Estes dois métodos serão aplicados à catalase e à peroxidase, determinadas na fase de sintomas sistêmicos.

a. Catalase

A atividade da catalase em cada uma das folhas presentes nas amostragens, efetuadas aos 14, 20 e 32 dias após a inoculação, está representada na figura 22. Ao longo das três amostragens observou-se que a infecção viral alterou a atividade catalásica, induzindo

Fig. 22. Atividade catalásica em folhas de soja sadia (-●-) e infectada com VMCS (-o-), em três amostragens: A- 14 dias após inoculação. B- 20 dias após inoculação. C- 32 dias após inoculação. A folha 1 recebeu a inoculação mecânica. A folha 3 foi a primeira a mostrar sintomas sistêmicos. Médias de seis determinações independentes \pm erro padrão. O valor da folha 1 aos 20 dias foi estimado por interpolação.



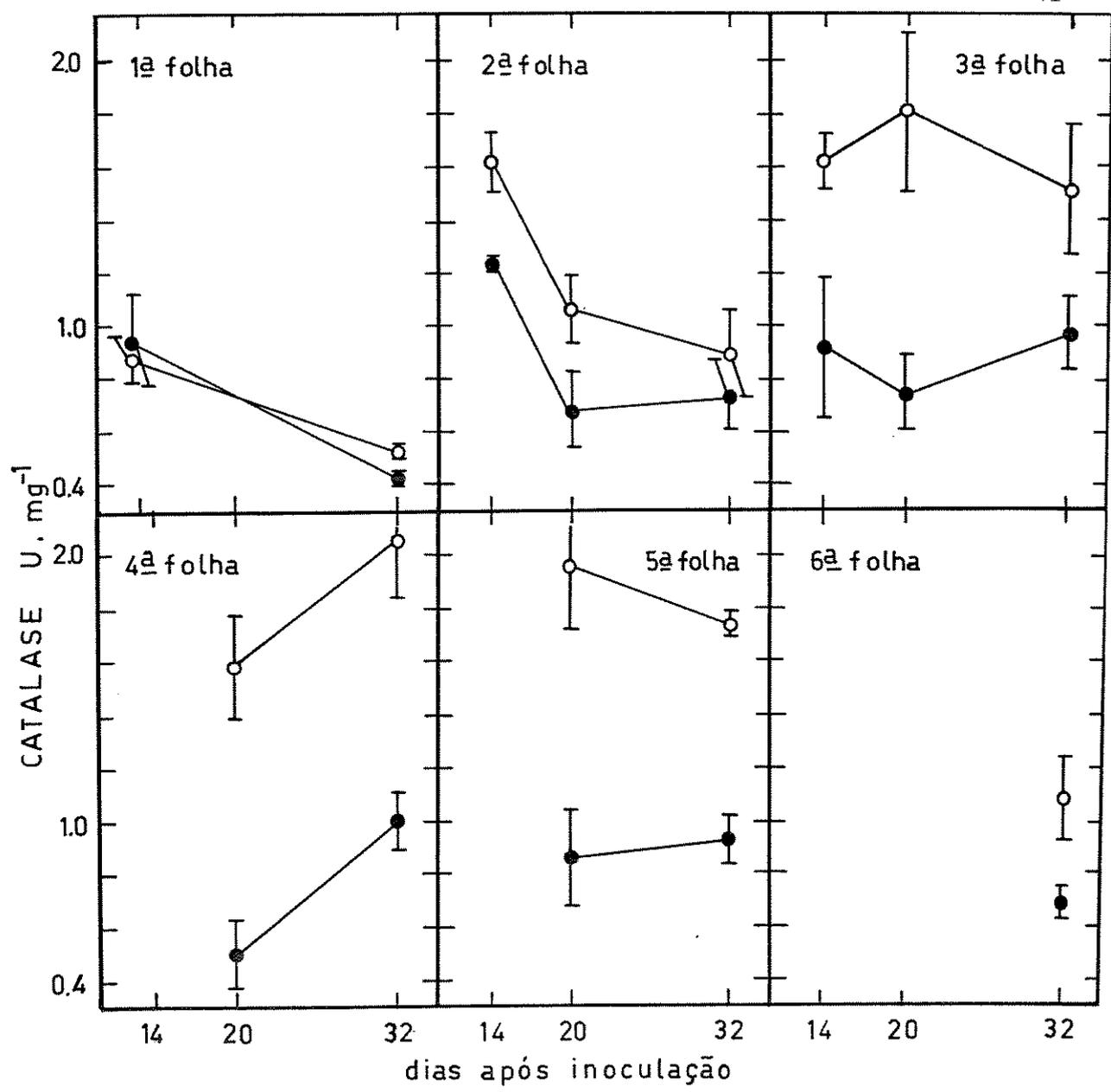


Fig. 23. Atividade catalásica em cada uma das folhas de soja sadia (-●-) e infectada pelo VMCS (-○-), em função do tempo. A 1a. folha recebeu a inoculação mecânica e a 3a. folha foi a primeira a apresentar sintomas sistêmicos. Médias de seis determinações independentes \pm erro padrão.

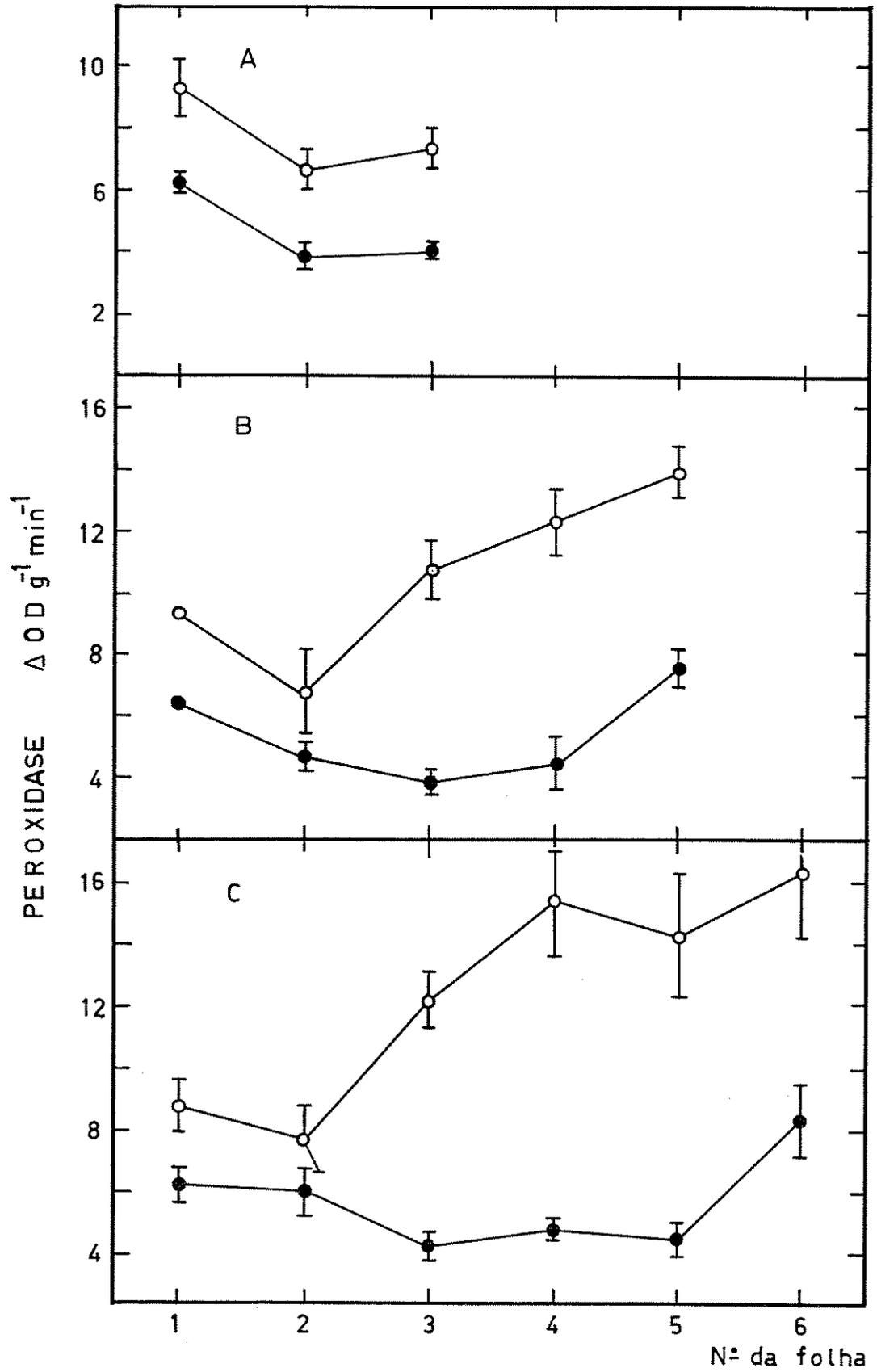
um aumento de diferente magnitude segundo a idade (ou localização na ordem cronológica) da folha. Estes aumentos diferentes para folhas de diferente idade alteram o perfil de distribuição desta atividade enzimática ao longo do caule.

O incremento induzido na atividade catalásica, pela infecção viral, foi maior para as folhas mais novas, decrescendo até zero para a folha 1, que é a folha inoculada. Este comportamento foi verificado nas amostragens dos 14 e 20 dias (Fig. 22A e B), mas aos 32 dias o diferencial foi máximo nas folhas 3, 4 e 5 e decresceu na sexta (Fig. 22C). É importante assinalar que o primeiro sintoma sistêmico, consistente em encarquilhamento, apareceu na terceira folha.

A evolução da atividade catalásica em cada uma das folhas é mostrada na figura 23. A infecção viral não alterou o nível desta atividade enzimática na primeira folha, como já assinalado. Na segunda folha houve um incremento deste parâmetro por efeito da infecção, próximo ao nível de significância aos 14 dias mas não significativo aos 20 e 32 dias. Nas folhas 3, 4 e 5 a infecção induziu um significativo aumento da atividade desta enzima nas três amostragens.

Em geral as curvas de atividade catalásica em função do tempo, para cada uma das folhas infectada e sadia, apresentaram bastante paralelismo. Isto indica que a infecção não provocou alterações na evolução desta atividade enzimática, embora estabilizada em valores mais altos.

Fig. 24. Atividade peroxidásica em folhas de soja sadia (-●-) e infectada com VMCS (-○-), em três amostragens: A-14 dias após inoculação. B- 20 dias após inoculação. C- 32 dias após inoculação. A folha 1 recebeu a inoculação mecânica. A folha 3 foi a primeira a mostrar sintomas sistêmicos. Médias de seis determinações independentes \pm erro padrão. O valor da folha 1 aos 20 dias foi estimado por interpolação.



b. Peroxidase

A infecção viral induz, em termos gerais, o aumento da atividade peroxidásica, alterando a distribuição entre folhas de diferente idade e também a evolução em cada folha, de maneira diferente à observada na catalase.

A distribuição da peroxidase não foi alterada na amostragem aos 14 dias, pois ocorreu um incremento de atividade praticamente igual para todas as folhas, por efeito da infecção (Fig. 24A). Aos 20 e 32 dias após a inoculação, o incremento de atividade nas folhas mais novas, a partir da terceira, foi muito maior que o observado nas folhas 1 e 2 nas três amostragens (Fig. 24B e C).

A evolução da atividade peroxidásica em cada uma das folhas está representada na figura 25. A primeira folha, que recebeu o inóculo, apresentou um significativo aumento de atividade que se manteve durante todo o experimento. A segunda folha mostrou um incremento significativo aos 14 dias, mas não significativo aos 20 e 32 dias. A terceira folha, que é a primeira a mostrar sintomas sistêmicos, o incremento causado pela infecção na primeira amostragem, praticamente duplicou-se nas duas últimas amostragens. Também nas folhas 4 e 5 observou-se uma tendência ao aumento do diferencial de atividade associado à infecção, ao contrário do observado para a catalase.

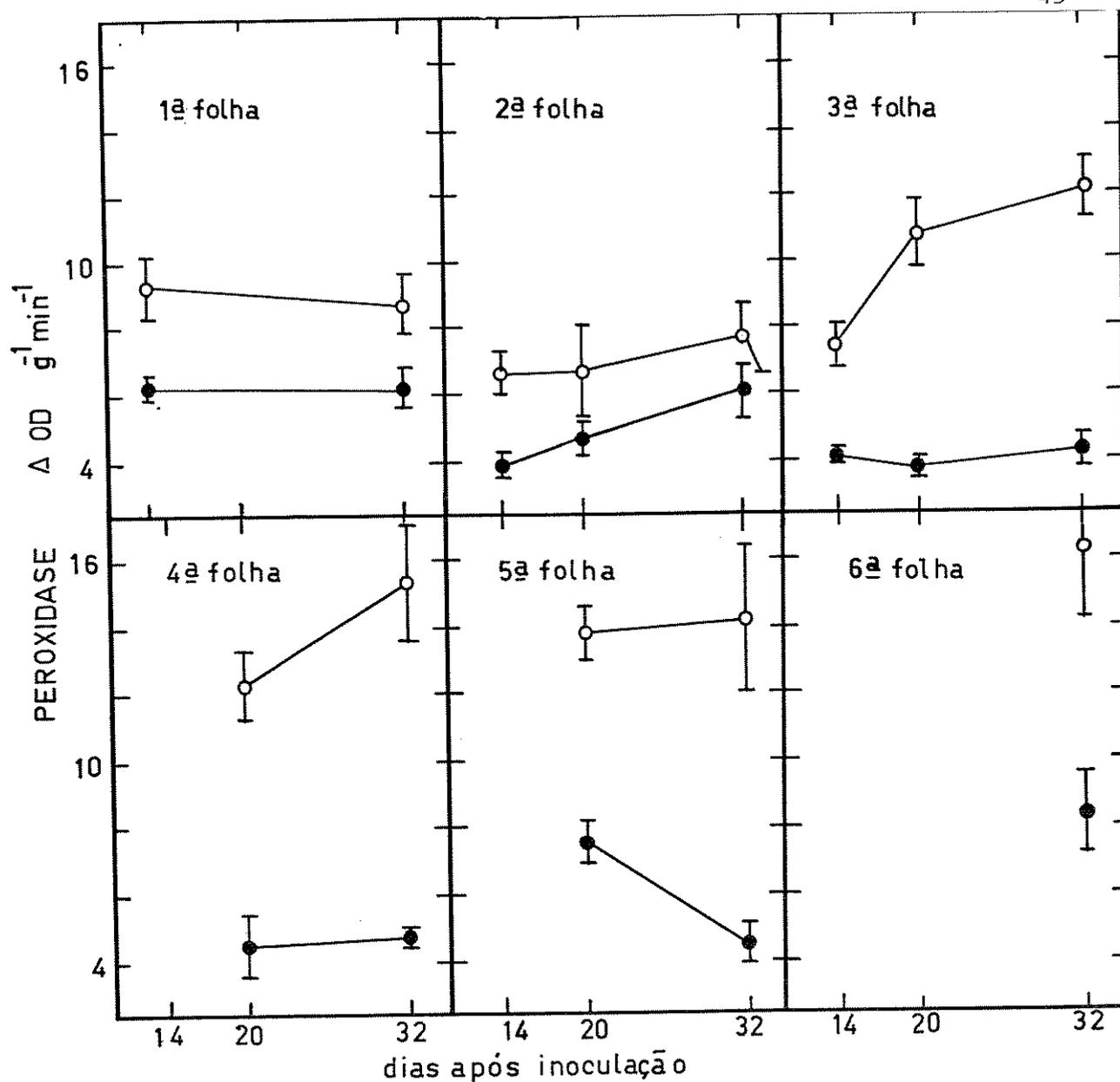


Fig. 25. Atividade peroxidásica em cada uma das folhas de soja sadia (●) e infectada pelo VMCS (○), em função do tempo. A 1ª folha recebeu a inoculação mecânica e a 3ª folha foi a primeira a apresentar sintomas sistêmicos. Médias de seis determinações independentes \pm erro padrão.

V. DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados mostram inequivocamente a ocorrência de associação entre as inclusões lamelares, induzidas pelo vírus do mosaico comum da soja, e os peroxisomas em folhas de soja com sintomas de infecção sistêmica. A identidade dos peroxisomas em contato com as IL é demonstrada pela atividade catalásica localizada nestas organelas, através do estudo citoquímico. O fato de este fenômeno ser igualmente observado com diferentes tipos de fixação, praticamente exclui a possibilidade de que seja um artefato de preparação do material. Também a ocorrência desta associação em duas variedades de soja com diferentes comportamento frente ao vírus -a Santa Rosa muito suscetível e a IAC-2 medianamente tolerante - indica que não se trata de um fenômeno limitado a uma determinada variedade. Por outro lado também foi observado em outras variedades, como a Viçoja, não incluídas no presente estudo. Também não é uma característica singular de um isolado ou estirpe do vírus, pois a associação peroxisomas-IL foi observada na maioria dos isolados do vírus do mosaico comum da soja, mantidos na coleção da Seção de Virologia do IAC.

A associação entre peroxisomas e inclusões lamelares não tem sido relatada na literatura para nenhum potyvirus embora, provavelmente, seja uma característica da citopatologia comum a vários membros deste grupo. Em alguns trabalhos publicados pode observar-se micrografias onde é visível o contato entre peroxisomas e IL, como por exemplo na figura 6 do trabalho de McMullen e Gardner (1980). Este fenômeno não é comentado pelos autores. É possível que a associação entre peroxisomas e IL não ocorra em outros potyvirus de maneira tão evidente como é observada na soja infectada pelo VMCS. Cabe também a possibilidade de este fenômeno ser influenciado por fatores ambientais, como a temperatura, o que dificultaria sua observação em alguns casos. EDWARDSON (1974) observou um aparente aumento no número de peroxisomas em Nicotiana tabacum infectada com o vírus Y da batata e com o "tobacco etch virus", embora sem a associação destas organelas com as inclusões lamelares.

No caso da soja infectada pelo VMCS, a agregação dos peroxisomas é induzida pela infecção viral, aparentemente através da associação com as inclusões lamelares. A formação destes agregados, especialmente evidente na variedade Santa Rosa, afeta a contagem de peroxisomas ao nível de microscopia óptica, como analisado anteriormente (pág.34), diminuindo o número destas organelas visíveis por corte de célula. Nas micrografias eletrônicas é evidente que nos agregados

os peroxisomas são bastante alterados pelas inclusões lamelares, formando invaginações tão profundas que podem ser interpretadas de duas maneiras opostas: 1. As invaginações induzidas ou associadas às IL poderiam chegar a dividir o peroxisoma (Fig. 9); 2. A agregação em volta da IL poderia levar à fusão de peroxisomas (Figs. 10,13). Inclusive a observação de alguns casos onde as IL aparecem dentro do peroxisoma poderia corresponder à fusão de peroxisomas em volta da inclusão (Fig. 16). Uma interpretação alternativa para estas imagens seria que estas ocorrem quando o plano do corte atravessa perpendicularmente uma invaginação da membrana peroxisomal contendo uma inclusão (Fig.10). Qualquer que seja a interpretação das micrografias, é clara a intensidade da interação entre estas duas estruturas, especialmente no cv. Santa Rosa.

O efeito da infecção viral sobre a atividade da catalase, uma enzima localizada no peroxisoma, é praticamente nulo na folha inoculada e na folha subsequente (primeira e segunda folha). Na terceira folha ocorre, juntamente com a manifestação dos sintomas sistêmicos, um significativo aumento nesta atividade enzimática. Os resultados apresentados, tanto da distribuição da catalase nas folhas de diferentes idades como da evolução desta enzima em cada uma das folhas, sugerem que o incremento na atividade catalásica é relacionado com a associação entre IL e peroxisomas, e provavelmente uma consequência desta associação. Isto é apoiado em dois fatos: 1. A associação entre inclusões lamelares

e peroxisomas somente ocorre nas folhas que apresentam sintomas sistêmicos, que por sua vez são as que têm a sua atividade catalásica incrementada, indicando uma estreita correlação entre os três fenômenos: as sociação IL- peroxisomas/manifestação de sintomas sistêmicos/ incremento da atividade catalásica. 2. Sendo o aumento da atividade catalásica induzido pela infecção viral, e por outro lado, sendo as inclusões lamelares as únicas estruturas induzidas pelo vírus que afetam as organelas portadoras da catalase (os peroxisomas), parece lógico interpretar esta associação entre as estruturas subcelulares como causadora do incremento na atividade catalásica.

A peroxidase é uma enzima cuja localização na célula é em pequenos vacúolos e na parede celular (SEXTON & HALL, 1978; MARTY et al., 1980). O incremento na atividade desta enzima tem sido descrito para diversas viroses (VEGUETTI et al., 1975, SHEEN & DIACHUM, 1978), não sendo portanto, uma particularidade da infecção pelo VMCS. A comparação entre as respostas à infecção da catalase e da peroxidase, como exemplos de enzima peroxisomal e não peroxisomal respectivamente, sugere o possível envolvimento destas enzimas em diferentes processos de reação da planta à infecção viral. Assim enquanto a catalase aumenta na fase de sintomas sistêmicos, a peroxidase é já incrementada na folha que recebe o inóculo. Isto sugere que a peroxidase poderia estar ligada à resposta da planta ao nível local, provavelmente interferindo no processo de distribuição do vírus. A catalase, ao

contrário da peroxidase, não é alterada na folha inoculada sugerindo que esta enzima não participa na reação local. Provavelmente, no início da infecção, as inclusões lamelares se associariam à membrana plasmática para facilitar, de alguma maneira, a passagem do vírus através dos plasmodesmas. Relacionado com isto, provavelmente ocorreria o aumento da atividade peroxidásica localizada na parede celular. Na fase de sintomas sistêmicos ocorre o aumento tanto da atividade catalásica como da peroxidásica.

HIPÓTESE GERAL

Uma interpretação definitiva dos resultados aqui apresentados não é possível, não só pelos diversos aspectos que ainda devem ser estudados, como também pelo quase total desconhecimento das funções das inclusões lamelares e dos peroxisomas em situações patológicas. Com estas limitações somente é possível elaborar uma hipótese de trabalho através de uma série de suposições, que estudos posteriores poderão ou não confirmar.

A associação das inclusões lamelares com os peroxisomas, e a alteração tanto morfológica como funcional destas organelas, parece ser parte do mecanismo pelo qual o vírus induz a manifestação de sintomas sistêmicos. Isto é sugerido pelo fato de que as alterações morfológicas mais intensas dos peroxisomas (deformação e agregação), ocorrem na variedade que apresenta os sintomas mais severos. Provavelmente na planta infectada pelo VMCS os peroxisomas foliares, afetados

pela infecção, não cumprem as funções que na célula sadia lhe correspondem. Segundo as revisões mais recentes (TOLBERT, 1980; HUANG et al., 1983) a função principal dos peroxisomas seria proteger o sistema fotossintético contra a foto-oxidação que ocorreria em condições de alta intensidade de iluminação e alta concentração de oxigênio. A disfunção dos peroxisomas, afetados pela infecção viral, poderia tornar pouco eficiente este sistema de proteção, o que causaria danos ao sistema fotossintético mesmo em condições ambientais que normalmente não o afetariam. Estes danos por foto-oxidação poderiam estar relacionados com a formação de clorofila, e conseqüentemente com a alteração da cor na folha, que caracteriza o sintoma denominando mosaico.

Uma interpretação alternativa dos resultados seria considerar que a agregação entre peroxisomas e inclusões lamelares é parte de um sistema que, a nível celular, dificultaria o estabelecimento do vírus. Esta hipótese é sugerida pela observação de que as inclusões induzidas pelo vírus ocorrem em maior quantidade em células epidérmicas, onde a atividade dos peroxisomas não foi detectada pelo método da DAB. No mesófilo, ao contrário, os peroxisomas são numerosos e muito ativos e as inclusões lamelares ocorrem em menor quantidade que na epiderme, geralmente em contato com os peroxisomas. Podem ser imaginadas duas maneiras pelas quais a atividade peroxisomal afetaria o processo geral da infecção viral: 1. Poderia existir uma relação competitiva entre o vírus e a atividade peroxisomal; 2. Os

peroxisomas seriam parte de um sistema defensivo da planta a nível ce
lular.

As hipóteses apresentadas levantam numerosos interrogan
tes, alguns dos quais poderão ser elucidados em pesquisas futuras, dan
do apoio a alguma das alternativas propostas.

VI. CONCLUSÕES

1. Nas células com atividade peroxisomal alta, como as do mesófilo, ocorre associação entre as inclusões lamelares induzidas pelo vírus e os peroxisomas, quando invadidas sistemicamente.
2. As inclusões lamelares induzidas pelo vírus ocorrem em maior quantidade nas células com baixa atividade peroxisomal, como as da epiderme, em comparação com as células de alta atividade peroxisomal, como as do mesófilo.
3. Observou-se correlação entre a intensidade de alterações morfológicas dos peroxisomas, em contato com inclusões, e a severidade dos sintomas nas duas variedades examinadas.
4. A atividade da catalase, uma enzima localizada nos peroxisomas, é significativamente incrementada com a associação destas organelas às inclusões lamelares.

5. A atividade da peroxidase, uma enzima não peroxisomal que frequentemente é incrementada por infecções virais, aumenta significativamente tanto em folhas onde ocorre a associação peroxisomas-inclusões, como naquelas onde não foi observada.

VII. RESUMO

Em células do parênquima fotossintetizante de folhas de soja [Glycine max (L.) Merr.] , invadidas sistemicamente pelo vírus do mosaico comum da soja ("soybean mosaic virus"), foi observado que uma importante fração das inclusões lamelares (IL) induzidas pelo vírus aparecem em contato com os peroxisomas. Esta organela foi identificada pela reação da diaminobenzidina para localização citoquímica da catalase. Os peroxisomas são deformados pelo contato com as inclusões e formam agregados em volta destas. A atividade da catalase, uma enzima peroxisomal, é incrementada nas folhas com sintomas sistêmicos, juntamente com a ocorrência da associação entre peroxisomas e inclusões. Não ocorre aumento desta atividade enzimática nas folhas inoculadas, nas quais não foi observada a associação entre inclusões e peroxisomas. A peroxidase, uma enzima não peroxisomal, é incrementada tanto nas folhas inoculadas como nas invadidas sistemicamente.

Na variedade de soja Santa Rosa, muito suscetível ao VMCS, foi observado um decréscimo aparente no número de peroxisomas

visíveis ao microscópio óptico, por corte de célula, nas folhas infectadas. Este resultado estaria relacionado com a agregação dos peroxisomas que dificulta sua identificação individual. Na variedade IAC-2, de tolerância média ao VMCS, não foi observado este efeito da infecção viral.

Os resultados são discutidos considerando que a associação das IL com os peroxisomas é parte do mecanismo pelo qual o vírus induz a manifestação de sintomas. É também considerada a hipótese de que esta agregação entre IL e a organela celular seja uma reação a nível celular que dificultaria o estabelecimento do vírus.

VIII. SUMMARY

ASSOCIATION BETWEEN PEROXISOMES AND CYTOPLASMIC INCLUSIONS INDUCED BY THE SOYBEAN MOSAIC VIRUS

Most cytoplasmic inclusions induced by soybean mosaic virus were observed associated with peroxisomes in mesophyll cells of systemically infected leaves of soybean (Glycine max (L.) Merr.). Peroxisomes, identified by the diaminobenzidine reaction for catalase, become misshapen because of deep invaginations at the region of contact with the lamellar inclusions. Aggregates of peroxisomes, formed around the lamellar inclusions, are frequent. The catalase activity, a peroxisomal enzyme, increases in leaves with systemic symptoms, apparently as a result of the peroxisome-inclusion as sociation. Catalase activity was not increased in inoculated leaves, nor was noted an association between peroxisomes and inclusions in them. The peroxidase activity, which is not localized in the peroxisome, is increased in either systemic or locally infected leaves.

The cultivar Santa Rosa, very susceptible to SMV, apparently shows a lower number of peroxisomes per cell section when infected, as evaluated by optical microscopy. This result may be related to the aggregation of peroxisomes that makes difficult their individual identification. This aggregation was not observed in the cv. IAC-2, which has some tolerance to SMV.

The aggregation of peroxisomes and lamellar inclusions is considered as part of the mechanism that leads to the development of systemic symptoms. As an alternative hypothesis, it is suggested that the aggregation inclusion-cell organelle might be related to some kind of plant defense mechanism.

IX. BIBLIOGRAFIA

- ANDREWS, J.H. and SHALLA, T.A. 1974. The origin, development, and conformation of amorphous inclusion body components in tobacco etch virus-infected cells. *Phytopathology* 64:1232-43.
- BEEVERS, A. 1979. Microbodies in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 30:159-93.
- BRUENING, G., BEACHY, R.N., SHALLA, R. and ZAITLIN, M. 1976. In vitro and in vivo translation of the ribonucleic acids of a cowpea strain of tobacco mosaic virus. *Virology* 71:498-517.
- CAMARGO, I.J.B., KITAJIMA e COSTA, A.S. 1971. Microscopia eletrônica de inclusões citoplasmáticas e alterações celulares induzidas associadas ao vírus do mosaico da cenoura. *Bragantia* 30:31-38.
- CHAMBERLAIN, JUDITH A. 1974. The relation between tolerance and the production of pinwheel inclusions in plants infected with mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 23:201-204.
- CHAMBERLAIN, JUDITH A. 1975. Electron microscopy of grass viruses in relation to possible resistance mechanisms. *Ann. Applied Biol.* 81:264-266.
- DAVIES, J.W. and HULL, R. 1982. Genome expression of plant positive strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* 61:1-14.
- De ZOETEN, G.A., G. GAARD and DIEZ, F.B. 1973. Localization of some heme containing enzymes in healthy and pea enation mosaic virus-infected plants. *Physiological Plant Pathol.* 3:159-166.

- DOUGHERTY, W. G. and HIEBERT, E. 1980a. Translation of potyvirus RNA in a rabbit reticulocyte lysate: Reaction conditions and identification of capsid protein as one of the products of in vitro translation of tobacco etch and pepper mottle viral RNA. *Virology* 101: 466-474.
- DOUGHERTY, W.G. and HIEBERT, E. 1980b. Translation of potyvirus RNA in a rabbit reticulocyte lysate: Identification of nuclear inclusion proteins as products of tobacco etch virus RNA translation, and cylindrical inclusions protein as a product of the potyvirus genome. *Virology* 104:174-82.
- DOUGHERTY, W.G. and HIEBERT, E. 1980c. Translation of Potyvirus RNA in a rabbit reticulocyte lysate: Cell free translation strategy and a genetic map of the potyviral genome. *Virology* 104:183-94.
- EDWARDSON, V.R. 1966. Electron microscopy of cytoplasmic inclusions of in cells infected with rod-shaped viruses. *Am. J. Bot.* 53:359-64.
- EDWARDSON, V.R. 1974. Some properties of the potato virus Y. *Florida Agr. Exp. Sta. Monograph* 4:398 pp.
- EFROM, D. and MARCUS, A. 1973. Translation of TMV-RNA in cell-free wheat embryo system. *Virology* 53:343-48.
- FARKAS, G.L. and STAHHANN, M.A. 1966. On the nature of changes in peroxidase isozymes in bean leaves infected with southern bean mosaic virus. *Phytopathology* 56:669.677.
- GLAUERT, A.M. 1975. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. In: A.M. Glauert (ed.) "Practical Methods in Electron Microscopy" Vol. 3, Part I. North-Holland, Amsterdam, pp. 58-60.
- HARRISON, B.D., FINCH, J.T. GIBBS, A.J. HOLLINGS, R.J. SHEPHERD, VALENTA, V. and WETTER, C. 1971. Sixteen groups of plant viruses. *Virology* 45:356-363.
- HELLMAN, G.M., HAW, J.G.S., LESMAW, J.A., CHU, LEE-YUN. DIRONE, T.D. D. and RHOADS, R.E. 1980. Cell-free translation of tobacco vein mottling virus RNA. *Virology* 106:207-216.

- HIEBERT, E., PURCIFULL, D.E. , CHRISTIE, R.G. and CHRISTIE, S.R. 1971. Partial purification of inclusions induced by tobacco etch virus and potato virus Y. *Virology* 43:638-646.
- HIEBERT, E. and Mc DONALD, J.G. 1973. Characterization of some proteins associated with viruses in the potato y group. *Virology* 56: 349-61.
- HIGGINS, T.J.V., GOODWIN, P.B. and WHITEFELD, P.R. 1976. Occurrence of short particles in beans infected with the cowpea strain of TMV. Evidence that short particles contain the cistron for coat-protein. *Virology* 71:486-497.
- HOEFFERT, L.L. 1969. Proteinaceous and virus-like inclusions in cells infected with beet mosaic virus. *Virology* 37:498-501.
- HOLLINGS, M. and BRUNT, A.A. 1981. Potyvirus group. CMI/AAB Descriptions of plant viruses 245: 7 pp.
- HOOPER, G.R. and WIESE, M.V. 1972. Cytoplasmic inclusions in wheat affected by wheat spindle streak mosaic. *Virology* 47:664-672.
- HUANG, A.H.C., TRELEASE, R.N. & T.S. MOORE 1983. Plant peroxisomes, Academic Press, New York, 252 pp.
- IRWIN, M.E. and GOODMAN, R.M. 1981. Ecology and control of soybean mosaic virus. In Maramorosch and Harris (eds.) "Plant diseases and vectors: ecology and epidemiology". Academic Press, New York, pp. 181-220.
- ISRAEL, H.W. and WILSON, H.J. 1977, Pinwheel inclusions and plant viruses. In K. Maramorosch, (ed.) "The Atlas of insect and plant viruses", Academic Press, New York, pp.405-417.
- KARNOVSKY, M.J. 1965. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 27:137A.
- KARNOVSKY, M.J. 1967. The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. *J. Cell. Biol.* 35:213-236.
- KITAJIMA, E.W. and COSTA, A.S. 1969. Association of pepper ringspot virus (Brazilian tobacco rattle virus) and host cell mitochondria. *J. Gen. Virol.* 4:177-181.

- KITAJIMA, E.W. and LOVISOLO, O. 1972. Mitochondrial aggregates in Datura leaf cells infected with henbane mosaic virus. J. Gen. Virol. 16:265-271.
- KITAJIMA, E.W. and COSTA, A.S. 1974. Fine structure of leaf tissues of some solanaceous plants infected with Brazilian eggplant virus. Phytopath. Z. 79:289-300.
- KNUHTSEN, H., HIEBERT, E. and PURCIFULL DE. 1974. Partial purification and some properties of tobacco etch virus-induced intranuclear inclusions. Virology 61:200-209.
- LANGENBERG, W.C. and SCHRODER, H.F. 1973. Electron microscopy of instable inclusions induced in maize by maize dwarf mosaic virus. Phytopathology 63:1066-73.
- LAWSON, R.H., HEARON, S.S. and SMITH, F.F. 1971. Development of pinwheel inclusions associated with sweet potato russet crack virus. Virology 46:453-63.
- LUCK, H. 1965. Catalase. In: "Methods of enzymatic analysis". H. U. Bergmeyer (Ed.) Verlag/Academic, Weinheim/New York, pp. 885-894.
- MARTY, F., BRANTON, D. and LEICH, R.A. 1980. Plant Vacuoles. In N. E. Tolbert (ed.) "The biochemistry of plants", Vol.1, "The plant cell", Academic Press, New York. pp.625-658.
- MATSUOKA, S. 1982. Impact of sugarcane mosaic virus on past industry and future perspectives for Latin America. First Int. Conf. on the Impact of viral disease on development of Latin American Countries and the Caribbean region. Rio de Janeiro. Brasil.
- MATTHEWS, R.E.F. 1981. Plant virology 2 Ed., Academic Press, New York, 897 pp.
- Mc DONALD, J.G. and HIEBERT, E. 1974. Ultrastructure of cylindrical inclusions induced by viruses of the potato Y groups as visualized by freeze-etching. Virology 58:200-208.
- Mc MULLEN, C.R. and GARDNER, W.S. 1980. Cytoplasmic inclusions induced by wheat streak mosaic virus. Virology 72:65-75.

- MERNAUGH, R.L., GARDNER, W.S. and YOCOM, K.L. 1980. Three dimensional structure of pinwheel inclusions as determined by analytical geometry. *Virology* 106:273-81.
- MOLLENHAUER, H.H. 1964. Plastic embedding mixtures for use in electron microscopy. *Stain Technol.* 39:111-112.
- MOLLERNHAUER, H.A., MORRE, D. J. and KELLEY, A.G. 1966. The wide-spread occurrence of plant cytosomes resembling animal microbodies. *Proroplasma.* 62:44-52.
- NOVIKOFF, A.B. and GOLDFISHER, S. 1969. Visualization of peroxisomes (microbodies) and mitochondria with diaminobenzidine. *J. Histochem. Cytochem.* 17:675-680.
- PETERS, D. 1982. Pea enation mosaic virus. CMI/AAB Description of plant viruses, n^o 257.
- PURCIFULL, D.E., HEIBERT, E. and Mc DONALD, J.G. 1973. Immuno chemical specificity of cytoplasmic inclusions induced by viruses in the potato Y group. *Virology* 55:275-279.
- RUBIO-HUERTOS, M. 1950. Estudios sobre inclusiones intracelulares producidas por virus en las plantas. *Microbiol. Españ.* 3:207-321.
- RUBIO-HUERTOS, M. y LOPEZ-ABELLA, D. 1966. Ultraestructura de células de pimiento infectadas con un virus y su localización en las mismas. *Microbiologia Española* 19:77-86.
- RUSSO, M., DI FRANCO, A. and MARTELLI, G.P. 1983. The fine structure of *Cymbidium* ringspot virus infections in host tissues. III. Role of peroxisomes in the genesis of multivesicular bodies. *J. Ultrastruct. Res.* 82:52-63.
- SEXTON, R. and HALL, J.L. 1978. Enzyme cytochemistry. In J.L.Hall (ed.) *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells.* Elsevier North Holland, Amsterdam pp. 63-147.
- SHEEN, S.J. and S. DIACHUM. 1978. Relationship of peroxidase and polyphenol-oxidase activity to virus symptoms in red clover. *Acta Phytopathologica* 13:243-253.

- SHEPARD, J.F. 1968. Electron microscopy of subtilisin treated tobacco etch virus nuclear and cytoplasmic inclusions. *Virology* 36: 20-29.
- SHEPARD, J.F., GAARD, G. and PURCIFULL, DE., 1974. A study of tobacco etch virus-induced inclusions using indirect immunoferritin procedures. *Phytopathology* 64:418-425.
- SINGER, B. 1971. Protein synthesis in virus-infected plants. I. The number and nature of TMV - directed proteins detected on polyacrylamide gels. *Virology* 46:247-55.
- TOLBERT, N.E. 1980. Microbodies - peroxisomes and glyoxisomes. In N.E. TOLBERT (ed.) "The biochemistry of plants", Vol. 1 "The plant cell". Academic Press. New York, pp.359-388.
- TOLBERT, N.E. and ESSNER, E. 1981. Microbodies: Peroxisomes and Glyoxisomes. *J. Cell Biol.* 91:271s-283s.
- VANCE, V.B. and BEACHY, R.N. 1984. Translation of soybean mosaic virus RNA in vitro evidence for protein processing. *Virology* 132: 271-81.
- VEGUETTI, G., CONTI, G.G. and PESCI, D. 1975. Changes in phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenoloxidase during the development of local necrotic lesions in Pinto bean leaves infected with alfalfa mosaic virus. *Phytopath. Z.* 84:153-171.
- VENABLE, J. and COGGESHALL, R. 1965. The use of a simple citrate stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 25:407-408.
- VIGIL, L.V. 1969. Intracellular localization of catalase (peroxidatic) activity in plant microbodies. *J. Histochem. Cytochem.* 17: 425-428.
- WEINTRAHUB, M. and RAGETLI, H.W.J. 1968. Intracellular characterization of bean yellow mosaic virus-induced inclusion by differential enzyme digestion. *J. Cell. Biol.* 38:316-328.

WILSON, H.J., ISRAEL, H.W. and STEWARD, F.C. 1974. Morphogenesis and the fine structure of cultured carrot cells. J. Cell. Sci. 15: 57-63.

WILSON, H.J., GOODMAN, R.M. and ISRAEL, H. 1976. Pinwheel inclusions in morphogenesis: a possible alternative to induction by viruses. Archives of Virology 51:347-354.