

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CÉLIA REGINA BAPTISTA GRASSI

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA FISIOLÓGICA
DE PLANTAS CÍTRICAS À INFECÇÃO PELO VÍRUS
DA TRISTEZA**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Célia Regina Baptista Grassi e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para a obtenção do Título de Doutor em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Vega

2002

UNICAMP



UNIDADE Bc
Nº CHAMADA T/UNICAMP
G769c
V _____ EX _____
TOMBO BCI 51153
PROC 16-837/02
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 01/10/02
Nº CPD _____

CMO0174651-9

BIB ID 259908

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP**

G769c

Grassi, Célia Regina Baptista.

Caracterização da resposta fisiológica de plantas cítricas à infecção pelo vírus da tristeza / Célia Regina Baptista Grassi. – Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Jorge Vega.

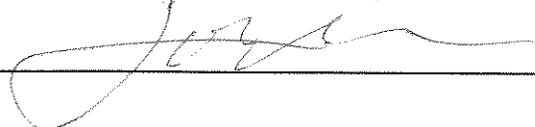
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Fisiopatologia. 2. Peroxidase. 3. Enzimas. 4. Vírus de plantas. 4. Ácido salicílico. 5. Relação hospedeiro - vírus. I. Vega, Jorge. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da defesa: 20/08/2002

Banca Examinadora

Prof. Dr. Jorge Vega (Orientador)



Prof. Dr. Ladaslav Sodek



Profa. Dra. Cláudia Regina Baptista Haddad

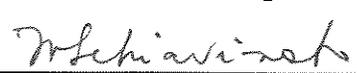
Dr. Gerd-Walter Müller



Dra. Maria Luísa Penteado Natividade Targon



Profa. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato



Dr. Eduardo Caruso Machado

2002/08/20

Dedico esta tese ao meu esposo Júnior e ao nosso filho Gustavo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jorge Vega, meu agradecimento especial pela oportunidade, apoio e pelos ensinamentos durante a realização deste trabalho.

Ao prof. Dr. Paulo Mazzafera, pelos auxílios prestados para o desenvolvimento desta tese e aos demais professores do Departamento de Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos e amizade.

Aos profs. Drs. Ladaslav Sodek, Cláudia Regina Baptista Haddad, Gerd Walter Müller e Maria Luísa Penteado Natividade Targon, pela análise prévia do trabalho e pelas valiosas sugestões.

Ao Dr. Marcos Antônio Machado, pelas sugestões durante a realização do trabalho.

Aos meus colegas e funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal, pela amizade e convívio.

À minha família, em especial à minha mãe, pelo apoio e incentivo.

Ao Júnior e Gustavo, pela paciência e amor.

Ao Centro APTA Citros, Sylvio Moreira/IAC, pelo fornecimento do material vegetal utilizado neste trabalho.

À UNICAMP, pela estrutura, e ao CNPq, pela bolsa concedida.

ÍNDICE

Resumo.....	vii
Summary.....	x
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	21
3. Materiais e Métodos.....	22
4. Resultados.....	34
5. Discussão.....	60
6. Conclusões.....	69
7. Literatura citada.....	70
8. Apêndice.....	86

RESUMO

Esta tese teve como objetivos caracterizar as alterações histológicas e fisiológicas induzidas em plantas de laranja 'Pera' e limão 'Galego', inoculadas com isolados fracos (Pera IAC e Isolado 50) e severos (Pera Rio e Barão B) do vírus da tristeza dos citros (CTV); estudar as respostas das plantas à infecção pelo CTV quanto à variação de atividades enzimáticas envolvidas na reação da planta (PAL, CAD, Peroxidases ligadas à parede celular - POX-lig); obter dados sobre a localização a nível morfo-histológico de peroxidases ligadas à parede celular; obter dados sobre isoenzimas de peroxidases envolvidas na resposta à infecção pelo CTV; caracterizar a resposta das plantas à infecção pelo CTV quanto a alterações no conteúdo de ácido salicílico total. Para tanto, plantas de laranja 'Pera' e limão 'Galego' foram inoculadas por união de tecido com borbulhas de plantas infectadas com os isolados do vírus. Como controle foram usadas plantas enxertadas com borbulhas sadias. As plantas foram mantidas em casa de vegetação.

Nos experimentos onde determinou-se a atividade das enzimas PAL, CAD e Pox-lig foi verificado, com exceção da enzima CAD, que plantas infectadas pelos isolados severos do CTV apresentaram um aumento significativo na atividade dessas enzimas, enquanto que as plantas infectadas pelos isolados fracos do vírus diminuíram a atividade ou não a modificaram. Quando guaiacol e siringaldazina, substratos específicos para determinar a atividade de peroxidases foram usados, observou-se que a atividade de guaiacol peroxidase não apresentou correlação com a severidade do isolado do CTV. As diferenças observadas na atividade de siringaldazina peroxidase foram de tal magnitude que poderiam ser consideradas na prática como um parâmetro na diferenciação entre isolados fracos e severos do CTV. A enzima CAD

não foi estimulada pela infecção com os diferentes isolados do CTV, não foram observadas diferenças nas atividades entre as plantas infectadas com vírus e plantas saudas.

Assim como na Pox -lig e PAL, o conteúdo de ácido salicílico foi mais elevado somente nas plantas infectadas pelos isolados severos do vírus. Plantas infectadas pelo isolado severo Barão B apresentaram teores de SA duas vezes mais elevados que as plantas saudas e 2,7 e 4,4 vezes o valor de plantas infectadas com os isolados Pera IAC e Galego 50, respectivamente.

Nos experimentos de eletroforese as isoperoxidasas foram separadas em gel ácido (pH 4,5) e gel alcalino (pH 8,3). Em gel alcalino utilizando carbazole como substrato genérico para peroxidases, observou-se duas bandas peroxidases citoplasmáticas nos materiais infectados com isolados severos, enquanto que com o isolado fraco e plantas saudas apresentaram apenas uma banda. Em pH ácido, utilizando siringaldazina como substrato, apenas uma peroxidase de parede celular foi detectada em plantas infectadas pelos isolados severos do CTV. Plantas saudas e infectadas com isolados fracos do vírus não apresentaram atividade.

A análise da atividade de guaiacol peroxidase através de fracionamento por HPLC mostrou que as plantas infectadas com o isolado severo do CTV apresentaram dois picos de atividade, sendo o primeiro aos 16-17 minutos de eluição com atividade em torno de 0,02 Δ Abs / min. e o segundo pico, aos 19,5 min. de eluição, com atividade bem maior, em torno de 0,09 Δ Abs / min. Por outro lado, plantas saudas e plantas infectadas com isolado fraco do vírus apresentaram apenas um pico de atividade aos 20 min. de eluição com atividade ao redor de 0,04 e aos 21 min. de eluição com atividade ao redor de 0,06 Δ Abs / min, respectivamente.

Nos ensaios de microscopia de fluorescência, plantas de limão 'Galego' infectadas pelo isolado severo Barão B apresentaram depressões no xilema que foram visualizadas quando utilizou-se excitação com luz UV (Fig. 13 a). O material apresentou fluorescência amarela

com excitação por luz azul (Fig. 13 b). Em plantas sadias e plantas infectadas pelo isolado fraco Galego 50 não foram observadas alterações na fluorescência na região do floema e do câmbio vascular (Fig. 13 c,d, respectivamente). Em plantas de laranja 'Pera' infectadas pelos isolados severos Barão B e Pera Rio, foi observado um acúmulo de material fluorescente verde na região do câmbio vascular.

O trabalho permite concluir que a atividade de peroxidase associada à lignificação (Pox-lig) pode ser considerada como um parâmetro bastante significativo para a diferenciação de isolados fracos e severos do CTV. Os isolados severos do vírus causam aumento na atividade de enzimas envolvidas nas reações de defesa das plantas, concomitante com o aumento no teor de SA, que atua como molécula sinalizadora. Plantas infectadas pelos isolados severos apresentam disfunção do floema, na região do câmbio vascular e também o aparecimento de uma proteína com atividade peroxidásica que pode ocorrer através de síntese *de novo* (ativação gênica) ou por ativação de proteína preexistente.

Summary

The present work had as objective the characterization of physiological and histological alterations induced in 'Pera' sweet orange and 'Mexican' lime plants infected by severe (Pera Rio and Barão B) or mild (Pera IAC and Isolado 50) isolates of citrus tristeza virus (CTV). The response of plants to CTV infection was examined in relation to changes in enzymatic activities associated with the reaction of the plant to virus infection: PAL, CAD and cell wall-associated peroxidase (Pox-lig). Also examined were the content of salicylic acid, the histological localization of cell wall-associated peroxidases and their electrophoretic characteristics. All the experiments were conducted in 'Pera' orange and 'Mexican' lime plants, graft-inoculated with the different CTV isolates. As healthy controls, plants graft-inoculated with healthy scions were used. The plants were kept in the greenhouse during the experiments.

Two enzymes, PAL and cell wall-associated peroxidase, have their activity significantly increased in plants infected by severe CTV isolates. These enzyme activities were reduced or not changed by infections with mild isolates, as compared to healthy controls. This correlation between activity and severity of the virus isolate was not observed when guaiacol was used as generic substrate in the peroxidase assay. However, using syringaldazine as substrate for cell wall-associated peroxidase (Pox-lig), the correlation was evident. The differences in syringaldazine-peroxidase and in PAL activities were of such magnitude that they may be useful as a parameter in differentiating mild and severe isolates. The activity of the enzyme CAD was not changed by CTV infection, whether of severe or mild isolates.

Paralleling the activity of Pox-lig, the content of salicylic acid was also increased only in plants infected by severe CTV isolates. 'Pera' oranges infected with the severe isolate

“Barão B” had 2,7 and 4,4 times greater content of SA than plants infected with “Pera IAC” or “Galego 50” mild isolates, respectively.

Using non-denaturing PAGE electrophoresis at an alkaline pH (pH 8.3) an additional band was detected only in plants infected with severe isolates. At acid pH (pH 4.5) it was possible to detect one band with syringaldazine-peroxidase activity only in plants infected with severe isolates.

Separation of isoenzymes by HPLC showed an additional peak of guaiacol activity (0.02 Δ abs/min) eluting at 16-17 minutes, which was absent in healthy or mild isolate-infected materials. At 19.5-21 minutes eluted a peak of greater activity (0.09 Δ abs/min) that was common to infected and healthy materials.

Fluorescence microscopy of stem tips of 'Mexican' lime plants, infected with the severe isolate Barão B, showed depressions in the xylem, visualized using UV excitation light. With blue light excitation it was possible to visualize a yellow fluorescing material within the xylem depressions (Figs. 13 a and b). In healthy or mild isolate (Galego 50) materials, fluorescence alterations were not observed in the cambium zone. In 'Pera' orange plants infected with severe isolates (Barão B and Pera Rio) the accumulation of green-fluorescent material was observed in the cambium zone when UV excitation was used.

It may be concluded that peroxidase activity associated with lignification can be considered as a significant parameter to differentiate severe from mild isolates of CTV. Severe isolates of CTV induce increases in enzyme activities involved in plant defense mechanisms, paralleling the increase of salicylic acid content, which functions as signaling molecule. Plants infected by severe isolates show dysfunctional phloem and an altered cambium zone. They also show the appearance of a new band with peroxidasic activity that may arise from *de novo* synthesis (gene activation) or from activation of a pre-existing protein.

1. INTRODUÇÃO

A resistência natural de plantas a microorganismos patogênicos baseia-se, em parte, numa variedade de barreiras e mecanismos de defesa já existentes, denominados constitutivos. Todavia, plantas possuem mecanismos de defesa pós-infeccional, ainda mais eficientes, que são acionados após serem elas expostas a agentes de indução (Kiraly *et al.*, 1970; Sticher *et al.*; 1997).

Duas características fundamentais da resistência induzida, amplitude do espectro de efetividade e sistemicidade, tornam-na de grande potencialidade no controle de enfermidades de plantas (Kloepper, 1996; Van Loon *et al.*, 1998). Numa visão geral e simplificada do processo de resistência induzida, o fenômeno pode ser comparado com a imunização de animais e seres humanos em seus efeitos finais de proteção, ainda que os mecanismos sejam totalmente diferentes em sua natureza, pois na resistência induzida ocorre proteção de amplo espectro, enquanto que na imunização em animais a proteção é específica para cada doença.

Não se pode assumir, simplesmente, que ocorreu indução de resistência quando plantas ficam protegidas contra patógenos após exposição a agentes bióticos ou abióticos, putativamente indutores de resistência. Afinal, o agente de controle tanto pode estar realmente induzindo resistência, como atuando diretamente sobre o patógeno, ou ambas as coisas (Sticher *et al.*, 1997; Van Loon *et al.*, 1998).

A resposta de hipersensibilidade (HR) é considerada uma forma de resistência, e é determinada por um único gene dominante no genótipo vegetal (Dawson & Hilf, 1992). Ela se manifesta como pequenas lesões necróticas em resposta da planta ao ataque de patógenos e ocorre poucas horas após o ataque (Agrios, 1998). A ativação da HR leva à morte de células

no sítio de infecção, resultando na restrição do patógeno a pequenas áreas ao redor das células inicialmente infectadas (Holub *et al.*, 1994).

Vários processos característicos de HR parecem envolver primeiramente a ativação de enzimas pré-existentes, ao invés de ocorrerem mudanças na expressão gênica. Um desses processos rápidos é a liberação de formas ativas de oxigênio, principalmente, íon superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot), local e sistemicamente (Orozco-Cárdenas & Ryan, 1999). Essa é provavelmente a primeira resposta em interações incompatíveis, que atuaria como gatilho que desencadeia a resposta de hipersensibilidade (Mehdy, 1994). O O_2^- gerado é rapidamente dismutado tanto não enzimaticamente como via superóxido dismutase (SOD) a H_2O_2 sendo desse detectado na maioria das plantas. Este surto oxidativo precede e, posteriormente, acompanha a morte celular da planta hospedeira associada à lesão (Mehdy *et al.*, 1996).

O surto oxidativo está correlacionado com a ocorrência da HR em diversos modelos planta-patógeno e desta forma pode ser um elemento importante que contribui para o desenvolvimento da resistência induzida (Mehdy, 1994).

Doke & Ohashi (1988) verificaram que O_2^- foi produzido em interações incompatíveis entre batata e *Phytophthora infestans* e entre fumo e o vírus do mosaico do fumo ("tobacco mosaic virus" - TMV), em discos foliares, sob reação de hipersensibilidade. Ao contrário, pouco O_2^- foi produzido em discos foliares não infectados ou sob invasão sistêmica em interações compatíveis.

1.1. Sinais bioquímicos desencadeadores de fenômeno de resistência

O conhecimento que se tem sobre sinais bioquímicos desencadeadores de eventos que culminam na resistência induzida ainda é fragmentário (Lawton *et al.*, 1994; Shah *et al.*; 1997), principalmente baseado em sistemas-modelo envolvendo plantas transgênicas ou mutantes de *Arabidopsis* sp. e ação de inibidores de rotas de síntese de certos compostos. Contudo, já há evidências suficientes para certas hipóteses serem formuladas e certos conceitos básicos estabelecidos.

Um dos compostos que vem sendo considerado como sinal bioquímico de indução é o etileno. Plantas o sintetizam tanto como resposta a ferimentos, como à infecção por patógenos e à exposição a elicitores de mecanismos de defesa (Grosskopf *et al.*, 1991). Mauch *et al.* (1984) encontraram que a indução de síntese de quitinase e β -1,3-glucanase, proteínas associadas à resistência induzida, ocorre em vagens de feijoeiro expostas a aminoetoxivinilglicina (inibidor da síntese de etileno), o que levou a Sticher *et al.* (1997) a interpretarem que a síntese de etileno ocorrendo concomitante com a indução de resistência, poderia ser mais um efeito que uma causa.

Ácido jasmônico ("jasmonic acid" - JA), jasmonatos e seus derivados encontram-se largamente distribuídos em tecidos de plantas (Stumpf & Conn, 1981). Sticher *et al.* (1997) consideram ainda um pouco controvertidas as evidências experimentais de que JA e seus derivados podem se constituir em sinais bioquímicos de resistência sistêmica induzida. Entretanto, a frequência com que eles ocorrem em tecidos vegetais, aliada à sua conhecida mobilidade nos tecidos e entre plantas, podem apontar uma função sinalizadora, segundo Farmer & Ryan (1990). Gundlach *et al.* (1992), pressupõem que JA seja um sinal de resistência sistêmica, sinal este que se transloca para outros órgãos desencadeando eventos que levam à ativação de genes de resistência. Cohen *et al.* (1993) induziram resistência local e

sistêmica em plantas de tomate e batata a *Phytophthora infestans* pela aplicação exógena de JA. Trabalhos recentes relatam que o JA atua como sinal para resistência a insetos (Mc Conn *et al.*, 1997; Leon *et al.*, 2001).

Outros prováveis sinais bioquímicos de resistência induzida são o ácido salicílico ("salicylic acid" - SA), salicilatos e seus análogos. White (1979) observou que a exposição de plantas de fumo a SA induzia síntese de Proteínas Relacionadas com Patogênese (PRPs) e concomitante resistência sistêmica ao vírus do mosaico do fumo (TMV). Van Loon (1983), também constatou que a exposição de plantas de fumo a etileno tinha o mesmo efeito e sugeriu que esse acúmulo deve-se a algum composto com atividade semelhante à do ácido salicílico. Malamy *et al.* (1990), também trabalhando com fumo, levantaram a hipótese de que SA poderia ser um sinal endógeno, já que salicilatos se acumulam tanto local como sistemicamente como resposta de plantas de fumo à inoculação com TMV. Até o momento, desconhece-se de que forma sinais atuam ativando genes e desencadeando os eventos de resistência induzida em plantas. Muitos outros trabalhos apontam o SA como molécula sinalizadora de reação de defesa (Shualev *et al.*, 1995; Mauchi-Mani & Slusarenko, 1996; Sticher, 1997).

1.2. Manifestações distintas de resistência sistêmica induzida

As siglas ISR ("Induced systemic resistance") e SAR ("Systemic acquired resistance") têm sido usadas como sinônimos, embora não o sejam. Ambas designam o fenômeno através do qual plantas, após exposição a um agente indutor, têm seus mecanismos de defesa ativados, não apenas no sítio de indução como também em outros locais dele distantes, de forma mais ou menos generalizada (Sticher *et al.*, 1997).

Em verdade, SAR e ISR são fenômenos distintos quanto à forma através da qual são induzidos, mas bastante semelhantes, se não idênticos, no que concerne ao resultado fenotípico final que se expressa sob forma de indução de resistência com caráter de sistêmico (Pieterse *et al.*, 1998; Van Loon *et al.*, 1997). Assim, SAR envolve o acúmulo de PRPs como mecanismos de defesa da planta. Sua indução é salicilato-dependente, podendo resultar em alterações visuais, como necrose, por exemplo, na planta que sofreu indução e geralmente é induzida por patógenos ou ativadores químicos. No caso de ISR, não há acúmulo de PRPs, a indução não é salicilato-dependente, os agentes indutores geralmente são rizobactérias promotoras do crescimento de plantas ("Plant growth-promoting rhizobacteria" – PGPR), parecendo haver uma rota de sinalização mais associada a jasmonatos e etileno (Pieterse *et al.*, 1998; Van Loon *et al.*, 1998).

O espectro biológico de proteção conferida pela SAR inclui patógenos diversos tais como fungos causadores de manchas foliares, bactérias causadoras de murcha foliar, vírus que causam necrose ou mosaico, entre outros (Lucas, 1999).

O fenômeno de resistência sistêmica adquirida tem sido descrito em pelo menos 20 espécies de plantas de seis famílias diferentes (Sticher, *et al.*, 1997). No entanto, questões importantes permanecem obscuras, tais como, quais mecanismos são realmente responsáveis pela indução e expressão da SAR e se esse fenômeno ocorre nas diferentes espécies vegetais.

Ross (1961) conduziu alguns experimentos clássicos com fumo em que a SAR pôde ser ativada através de infecções locais, como por exemplo, com o vírus do mosaico do fumo. Essa resistência não foi limitada apenas ao local da infecção, mas se espalhou por toda a planta.

Outros trabalhos pioneiros sobre resistência sistêmica adquirida mostraram que plantas de pepino apresentaram resistência a patógenos alguns dias após uma infecção localizada com *Colletotrichum lagenarium*. Essas plantas não só apresentaram resistência contra esse fungo,

como também contra uma ampla variedade de outras doenças, incluindo fungos, bactérias e vírus (Kuc & Richmond, 1977). Uma pré-infecção com o vírus da necrose do fumo ("tobacco necrosis virus" - TNV), protegeu plantas de pepino contra pelo menos treze doenças distintas (Madamanchi & Kuc, 1991).

Tanto em fumo como *Arabidopsis*, SAR está associada com a expressão coordenada de um conjunto de genes chamados genes SAR. O conjunto desses genes em fumo é composto por um número de genes não alélicos, que podem ser classificados como genes que codificam proteínas relacionadas com patogênese. A família de genes que constituem genes SAR aparentemente tem um papel ativo no processo de resistência, porque sua expressão em plantas transgênicas pode dar significativa resistência à doença (Pieterse *et al.*, 1998). Em *Arabidopsis*, a SAR envolve a indução de um subconjunto de genes que também são expressos em fumo (Uknes *et al.*, 1992), sugerindo que os tipos de genes expressos em SAR devem ser comuns a diversas espécies. Assim, embora deva haver vários tipos de respostas de resistência induzida, SAR pode ser distinta por apresentar amplo espectro, resistência sistêmica e a expressão associada de um conjunto de genes particular.

Embora conheça pouco sobre a rota de transdução de sinal que leva à SAR, um passo envolve o acúmulo de ácido salicílico. Níveis de SA são elevados no início da SAR em pepino (Métraux *et al.*, 1990), fumo (Malamy *et al.*, 1990) e *Arabidopsis* (Uknes *et al.*, 1993). Aplicação exógena de SA em folhas de fumo ou *Arabidopsis* induz resistência ao mesmo espectro de patógenos e induz o mesmo conjunto de SAR genes, como quando SAR é induzida por patógeno. Plantas transgênicas que expressam genes da bactéria *Pseudomonas putida* que codificam salicilato hidroxilase (*nahG*), uma enzima que converte SA em catecol, exibem baixos níveis de SA e são incapazes de induzir SAR (Gaffney *et al.*, 1993). Essas evidências sugerem que SA desempenha um papel importante na rota de transdução de sinal

que leva à SAR. Entretanto, resultados de alguns estudos indicam que SA provavelmente não é um sinal transmitido sistemicamente (Vernooij *et al.*, 1995).

Não está claro se a biossíntese do SA é uma causa ou uma consequência de HR. Em altas concentrações o ácido salicílico inibe a atividade de catalase, levando a um aumento nos níveis de H₂O₂, o qual funcionaria como um mensageiro secundário do SA (Chen *et al.*, 1993). Os autores sugerem que a percepção de SA pela célula da planta, pode envolver a geração de formas ativas de oxigênio. Por outro lado, alguns trabalhos contestam tais resultados (Newenchwander *et al.*, 1995; Vernooij *et al.*, 1995).

Mauch-Mani & Slusarenko (1996) mostraram a atuação do SA nos mecanismos de compatibilidade, governados pela teoria gene-a-gene. Plantas do gênero *Arabidopsis* constituem com *Pernospora parasitica*, uma associação incompatível. Entretanto, o tratamento das plantas com AIP (ácido 2-amino-indano-2-fosfônico), inibidor de PAL e da rota fenilpropanóide (que resulta na síntese de SA) transforma a associação em compatível. Porém, a aplicação exógena de SA restaura a incompatibilidade da interação, mostrando que o ácido salicílico e a enzima fenilalanina amônia-liase parecem ter papéis importantes na expressão dos genes de incompatibilidade.

Para descrever os mecanismos de SAR, pode-se dizer que as plantas freqüentemente respondem, no local da tentativa de infecção microbiana, com morte localizada da célula (resposta de hipersensibilidade). Segue-se, assim, uma série adicional de mecanismos de defesa, inclusive a formação de calose, lignificação e reforço das paredes celulares. Esses mecanismos são estritamente localizados. Porém, se uma planta pré-infectada (imunizada) é atacada por um patógeno, mesmo que este ataque ocorra em local diferente da primeira infecção, ela freqüentemente responde com maior rapidez utilizando esses mecanismos.

1.3. Lignificação como mecanismo de resistência a doenças

Lignina é um polímero de subunidades aromáticas geralmente derivado de fenilalanina. É encontrada na parede celular de vários tipos de tecidos de condução e suporte, principalmente traqueídeos e elementos de vasos do xilema. Ela é depositada na parede secundária, podendo ocorrer também na parede primária e lamela média em contato com celulosas e hemicelulosas já presentes. A rigidez mecânica de lignina fortalece o caule e o tecido vascular, permite que algumas espécies arbóreas atinjam alturas consideráveis fazendo com que água e minerais possam ser conduzidos através do xilema, sob pressão negativa, sem causar colapso no tecido. Além de suporte mecânico, a lignina possui importante papel na resistência a doenças. O fenômeno de lignificação tem sido observado em muitas espécies de plantas em resposta à infecção por microorganismos patogênicos tais como fungos, bactérias, vírus e nematóides (Hammerschmidt & Kuc, 1982; Sticher *et al.*, 1997).

As ligninas têm sua origem na rota fenilpropanóide, pela polimerização desidrogenativa de precursores (Stumpf & Conn, 1981). Muitas enzimas estão envolvidas na biossíntese de precursores de lignina,. Entretanto, fenilalanina amônia-liase (PAL) e cinamil-álcool desidrogenase (CAD) parecem atuar como enzimas chave (Nakashima *et al.*, 1997; Roth *et al.*, 1997).

O primeiro passo na rota fenilpropanóide é a desaminação de fenilalanina a ácido cinâmico, catalizado pela enzima fenilalanina amônia-liase, que por sua vez, origina precursores para lignina e outros compostos intermediários envolvidos em resistência (Vance *et al.*, 1980), (Apêndice 1). Inibidores específicos de PAL reduzem a resistência de plantas a doenças, provavelmente pelo impedimento da síntese de derivados fenilpropanóides necessários à formação de lignina (Mauch-Mani & Slusarenko, 1996). Outras enzimas

envolvidas na rota fenilpropanóide tais como cinamil-álcool desidrogenase e peroxidases, são também induzidas em reações de resistência (Hahlbrock & Scheel, 1989).

Folhas de trigo inoculadas com *Botrytis* apresentaram aumento nas atividades das enzimas PAL e *o*-metil-transferase (Maule & Ride, 1976). As atividades da PAL e peroxidases também aumentaram em áreas lignificadas de lesões locais induzidas pelo vírus do mosaico do fumo e vírus do mosaico da couve-flor (Fritig *et al*, 1973; Conti *et al*, 1974). Stadnik (1999) mostrou um aumento no conteúdo de lignina em plantas de trigo inoculadas com o fungo *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici* associado com um aumento nas atividades das enzimas PAL e peroxidases, mas não CAD.

O modo como a lignina protege as plantas contra patógenos ainda é assunto pouco investigado. A maioria dos trabalhos que envolvem a lignina como um mecanismo de resistência, utilizam patógenos fúngicos como modelo de estudo. Ride (1978), sugeriu 5 vias por onde a lignificação pode impedir o crescimento de fungos através do tecido vegetal :1. A lignina torna a parede celular mais resistente à penetração mecânica; 2. A lignificação da parede no ponto de entrada do patógeno pode torná-la mais resistente à dissociação pelas enzimas do fungo; 3. A lignina pode atuar como uma barreira de difusão às enzimas e toxinas do fungo para o hospedeiro e água e nutrientes do hospedeiro para o fungo; 4. Precursores fenólicos de lignina de baixo peso molecular e radicais livres produzidos durante a polimerização podem apresentar atividades anti-fúngicas e inativar membranas, enzimas, toxinas e elicitores do fungo; 5. A hifa pode tornar-se lignificada e perder a elasticidade necessária para o crescimento.

As ligninas induzidas por vírus são menos estudadas e geralmente estão associadas à resposta de hipersensibilidade. Faulkner & Kimmins (1976), examinaram a resposta de plantas de feijão infectadas pelos vírus do mosaico e vírus da necrose do fumo. Foi verificado que a

lignificação ao redor das lesões locais atuava como uma barreira para a propagação das partículas virais. Outros estudos de interação hospedeira-vírus também sugerem que a lignificação ao redor de lesões locais pode limitar a propagação do vírus através do tecido infectado. Conti e colaboradores (1974), trabalhando com plantas de feijão infectadas com o vírus do mosaico da alfafa e plantas de repolho infectadas com o vírus do mosaico da couve-flor, mostraram a formação de lignina localizada nas zonas externas do tecido necrótico acompanhada pelo aumento na atividade das enzimas PAL e peroxidase.

Essas alterações na estrutura da parede celular da planta após infecção, podem contribuir para resistência, tanto impedindo a entrada do patógeno como retardando o processo de penetração, permitindo assim, à planta ativar mecanismos de defesa ulteriores.

Quanto à infecção de citros pelo vírus da tristeza, não há informação sobre os possíveis mecanismos de resistência ou tolerância a esse vírus.

1.4. A tristeza dos citros

A tristeza dos citros é considerada uma das mais importantes doenças que atingiram esta cultura nos últimos 70 anos. O nome tristeza foi empregado, desde 1937, para designar uma moléstia de natureza então desconhecida que afetava combinações de laranjas doce (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) enxertadas em laranja Azeda (*C. aurantium* L.), em pomares de citros do Vale do Paraíba, SP, Brasil e inicialmente denominada "a doença dos citros no Vale do Paraíba" (Bitancourt, 1940, citado por Müller & Costa, 1993). Anteriormente, já havia registros de sintomatologia da doença em outras partes do mundo que mais tarde foram associadas à tristeza. O primeiro foi de uma incompatibilidade em laranja doce enxertada em Azeda, observada na África do Sul no início do século. As manifestações patológicas

conhecidas como "Podredumbre de las raicillas de los citros" na Argentina (Zeman, 1930); "Citrus quick decline virus" (Fawcett & Wallace, 1946); "Lime die-back virus" (Hughes & Lister, 1953) e "Grapefruit stem pitting virus" (Oberholzer *et al.*, 1949) também foram verificadas como sendo causadas pela tristeza.

Assim que a doença apareceu, um vírus foi suspeito de ser o patógeno (Bitancourt, 1940), porém, somente em 1946 foi confirmada a natureza infecciosa da tristeza por Meneghini (1946), que transmitiu a doença através de afídeos. Outro indicativo da natureza viral da tristeza foi obtido por Wallace e Fawcett (1947), que transmitiram a doença através da enxertia de borbulhas de plantas infectadas. No Brasil, Bennett e Costa (1949), conseguiram transmitir a tristeza através do pulgão preto dos citros (*Toxoptera citricidus* Kirk.) e também por enxertia de borbulhas infectadas. Testes comparativos de transmissão sugeriram que os problemas ocorridos em cada país eram todos manifestações da mesma doença (Grant *et al.*, 1951).

Devido à alta eficiência do vetor, a tristeza no Brasil foi amplamente disseminada nos pomares citrícolas, porém, foi controlada através da utilização de técnicas de convivência com o vírus, tais como o uso de porta-enxertos tolerantes e de proteção cruzada ou pré-imunização (Costa & Müller, 1980), ou seja, a inoculação de plantas com isolados fracos do CTV que as protegem contra as formas mais severas.

Atualmente cerca das 80 milhões de laranjas Pera plantadas no Brasil originaram-se de material pré-imunizado com isolados protetivos do vírus, sem perder a capacidade de proteção após sucessivas gerações clonais (Müller e Costa, 1993).

Embora a maioria das variedades de citros, quando enxertadas em cavalos tolerantes, possua capacidade de convivência com o vírus, a ocorrência de isolados severos poderia quebrar a proteção conferida às plantas pelos isolados fracos, levando a perdas inestimáveis (Bar-Joseph *et al.*, 1989). Dessa forma, para poder aplicar essa tecnologia à outras variedades e

espécies cítricas, é necessário continuar a procura de isolados fracos do CTV que sejam protetivos para cada tipo de planta.

1.4.1. O vírus da tristeza dos citros (CTV)

1.4.1.1. Caracterização e propriedades biológicas

O CTV é um vírus limitado ao floema, possui partículas alongadas, flexuosas, de simetria helicoidal, com dimensões aproximadas de 2.000 nm x 11 nm (Kitajima *et al.*, 1963; Bar. Joseph *et al.*, 1979). Kitajima *et al.*, (1963) demonstraram a associação entre manifestações patológicas e a presença de partículas virais filamentosas "thread like particles". A partir daí, muitos trabalhos foram feitos visando purificar essas partículas (Price, 1966; Silva *et al.*, 1965).

Bar. Joseph *et al.*, (1970) conseguiram a caracterização parcial do CTV. Foi criado o grupo dos closterovírus, englobando o CTV e outros vírus filamentosos de diversos tamanhos e hospedeiras muito distintas (Bar. Joseph & Hull, 1974). Desde então, muitas modificações no processo tornaram possível uma purificação mais rápida e a preservação de partículas inteiras (Bar. Joseph *et al.*, 1985; Gonsalves *et al.*, 1978; Lee *et al.*, 1987; Tsuchizaki *et al.*, 1978; Baptista *et al.*, 1996).

O vírus da tristeza infecta a maioria das espécies, cultivares e híbridos de citros. Outras Rutáceas não cítricas (que não pertencem aos gêneros *Fortunella*, *Poncirus* e *Citrus*) podem também ser hospedeiras do vírus: *Aeglopsis chevalieri* Swing., *Afraegle paniculata* (Schum.) Engl. e *Pamburus missiones* (Wt) Swing. (Wallace, 1978). As únicas hospedeiras conhecidas

que não pertencem à família Rutáceas são certas espécies de *Passiflora* (Müller & Garnsey, 1984; Roistacher & Bar. Joseph, 1987).

As diferenças de sintomatologia encontradas em diversas áreas citrícolas do mundo, causando diferentes sintomas, devem-se principalmente em função dos isolados do vírus, do vetor e do clima. A expressão de sintomas varia, via de regra, com a espécie hospedeira e a severidade do isolado da tristeza. As tangerinas (*Citrus reticulata* Blanco) têm alta tolerância à tristeza. Laranjas doces e o limão Cravo (*Citrus limonia* Osb.), de uma maneira geral, são tolerantes mas podem sofrer danos quando infectados com isolados fortes. O vírus afeta tipos de citros com tecidos intolerantes como as limas ácidas, pomelos (*Citrus paradise* Macf.), algumas laranjas-doces mais sensíveis como a 'Pera', outros de menor importância econômica, e também outros gêneros de Rutáceas (Müller & Costa, 1993).

Os sintomas de tristeza na sua concepção clássica, isto é, aqueles observado em combinações de citros suscetíveis ao vírus tendo como porta-enxerto a laranja Azeda, são caracterizados por folhas ligeiramente bronzeadas, aspecto coriáceo, quebradiças, em alguns casos, amarelecimento da nervura principal, ou amarelecimento total das folhas velhas, declínio rápido da planta, seca gradativa dos galhos a partir das extremidades, necrose dos tubos crivados da laranja Azeda, podridão das radículas e morte da planta, em muitos casos. Árvores afetadas podem apresentar caneluras invertidas na face interna da casca do cavalo de laranja Azeda. Um espessamento da casca pode ser observado nessa região. Algumas vezes as plantas declinam rapidamente, outras vezes, ficam enfezadas e cloróticas, não perecendo. Plantas afetadas apresentam redução e, nos casos mais graves, paralisação do crescimento. Algumas vezes encontram-se plantas de aspecto normal com um ou mais galhos afetados, outras vezes observam-se galhos que se destacam pelo seu vigor do resto da copa afetada.

Nas folhas de limas ácidas observam-se sintomas considerados como característicos para a presença da tristeza, tais como, palidez das nervuras que se mostram translúcidas,

quando observadas contra a luz (Wallace, 1968). Esses sintomas ocorrem principalmente em folhas jovens e podem desaparecer quando elas amadurecem. As folhas apresentam-se com tamanho reduzido, acanoadas, com extremidade distal voltada para cima. Algumas vezes ocorre amarelecimento total da folhagem. Árvores afetadas apresentam redução na produtividade. Os frutos são pequenos, de coloração verde pálida, vulgarmente denominados "coquinho". Tais frutos apresentam baixo teor de suco e acidez elevada. Quando a casca dessas árvores são retiradas, observam-se sintomas denominados caneluras ("stem-pitting"), que são depressões rasas e alongadas que ocorrem no lenho. As caneluras podem ser encontradas no tronco e nos galhos mais finos.

Inicialmente, propriedades biológicas do CTV tais como severidade em plantas no campo ou em indicadoras, transmissibilidade por afídeos ou habilidade de proteção cruzada, foram usadas para caracterizar os diferentes isolados do CTV. Os vários sintomas induzidos pelo CTV devem ser, provavelmente, produzidos por variantes de um único vírus (Mc Clean, 1974, citado por Targon, 1997).

Garnsey *et al.* (1991) estabeleceram uma coleção internacional de isolados do CTV e, através de ensaios biológicos, compararam e descreveram vários isolados do vírus presentes em diferentes países. Os isolados do CTV foram classificados em grupos, de acordo com sua atividade biológica em diferentes hospedeiras: fracos, induzindo apenas clareamento das nervuras em limão 'Galego', e os severos, causadores de declínio rápido, "seedling yellows" (amarelecimento das plântulas), caneluras em pomelos e caneluras em laranjas doce.

Em células do floema infectadas com o CTV são produzidas inclusões, que são estruturas intracelulares de agregados de partículas virais e de proteínas relacionadas, detectadas pela primeira vez por Schneider (1959). De acordo com Brlansky (1987), o número de inclusões observadas nos tecidos de plantas infectadas pode ser relacionado à severidade do

isolado do vírus. Desse modo, sob condições de crescimento uniforme, as inclusões podem ser úteis para a diferenciação entre isolados fracos e severos do CTV (Brlansky & Lee, 1990).

1.4.1.2. Caracterização molecular do CTV

Diversas estimativas da massa molecular da proteína da capa do vírus foram feitas por eletroforese em gel de poliacrilamida, após degradação dos vírus em SDS, apontando para valores próximos de 25 KDa (Bar. Joseph *et al.*, 1972; Gonsalves *et al.*, 1978; Nagel *et al.*, 1982). Estas estimativas foram obtidas para diferentes estirpes do CTV. Posteriormente, proteínas do capsídeo de cinco estirpes do CTV, da Flórida, foram parcialmente caracterizadas e apresentaram duas bandas (Lee & Calvert, 1987; Lee *et al.*, 1988). Uma proteína maior (CP1), apresentou massa molecular de 23 KDa e outra menor (CP2), presente em menor quantidade, com massa molecular de 21 KDa. A razão de CP1: CP2 em vírus purificado foi de 5:1. Ambas, CP1 e CP2 deram reações serológicas positivas. Mapas polipeptídicos de CP1 e CP2, após digestão com várias enzimas proteolíticas e eletroforese em SDS-PAGE, foram similares, sugerindo que CP2 seja provavelmente um produto de degradação de CP1. Anteriormente já havia sido detectada, além da proteína de 25 KDa, outra de menor massa molecular, interpretada como um produto de degradação da primeira (Gonsalves *et al.*, 1978). Já em preparações de proteínas do capsídeo de isolados do CTV encontrados na Espanha e Israel foram observados peptídeos de 27-28 e 26 KDa para CP1 e CP2, respectivamente (Guerra *et al.*, 1990).

O vírus da tristeza contém exclusivamente RNA, com massa molecular entre $6,3$ a $6,9 \times 10^6$ (Bar. Joseph *et al.*, 1976). A eletroforese do RNA em agarose permitiu concluir tratar-se

de um genoma não dividido, de fita simples e confirmar a ordem de grandeza para massa molecular (Dodds & Bar. Joseph, 1983; Gumph *et al.*, 1981). Outra estimativa aponta para massa molecular entre $5,4$ e $6,5 \times 10^6$ (Bar. Joseph *et al.*, 1985). Um genoma dessa ordem de grandeza é o maior genoma de RNA de cadeia simples não dividida conhecido em virologia vegetal (Dodds & Bar. Joseph, 1983; Dodds *et al.*, 1984). O RNA é "positive sense", ou seja, é funcional como RNA mensageiro (Lee *et al.*, 1988). Não possui cauda poli-A na extremidade 3' (Bar. Joseph *et al.*, 1989).

Rosner *et al.* (1983) prepararam vários clones de DNA complementares (cDNA) de diversas regiões do genoma do CTV, por transcrição reversa seguida de clonagem. De alguns desses clones foram obtidas sondas radioativas, para serem usadas em "Northern blot" para hibridização com RNA viral. Várias dessas sondas, além de hibridizarem com o RNA genômico, reagiram também com diversas bandas, discretas, de RNA de menor peso molecular. Os autores sugeriram que essas bandas poderiam corresponder a RNA sub-genômico encapsidado em partículas do vírus de tamanho normal, embora não se pudesse excluir a possibilidade de fragmentação específica dos vírus em determinados locais, tal como acontece com outro closterovírus (Bar. Joseph & Hull, 1974).

Dodds & Bar. Joseph (1983) através de fracionamento por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), do RNA de dupla fita (dsRNA) obtido de tecidos infectados, detectaram uma banda de dsRNA com massa molecular de $13,3 \times 10^6$, duas vezes o tamanho do RNA genômico, interpretada como a forma replicativa do genoma viral, e outras diversas bandas de dsRNA com menor massa molecular. Segundo os autores essas bandas poderiam representar suportes de transcrição de RNA sub-genômico. Essa hipótese foi reforçada pelo fato de que em "Northern - blot", após desnaturação, ter sido verificado que existia homologia

de massas moleculares entre algumas dessas bandas e algumas das bandas de RNA viral detectadas por Rosner *et al.* (1983).

Calvert (1987) preparou bancos de cDNA a partir de RNA de isolados fracos e severos do CTV. Dois clones foram selecionados do banco de cDNA, preparado a partir de RNA de isolado severo. Juntos, esses clones representaram 70% do genoma total do CTV e foram utilizados em trabalhos posteriores para caracterização molecular do vírus.

Sekiya *et al.* (1991) prepararam um banco de cDNA a partir de RNA de um isolado do CTV em vetor lambda Zap II e selecionaram clones contendo o gene da capa protéica com anticorpos policlonais, produzidos contra a proteína do capsídeo do vírus. Cinco clones produziram proteínas em *E. coli*, que reagiram com anticorpos mono e policlonais específicos da proteína do capsídeo do CTV.

Muitos trabalhos de clonagem e seqüenciamento do gene da capa protéica do CTV foram realizados, utilizando-se isolados biológica e geograficamente distintos. Os autores encontraram entre 90-100% de similaridade na seqüência de ácidos nucleicos e de aminoácidos deduzidas entre os diversos isolados estudados (Niblett *et al.*, 1992; Pappu *et al.*, 1993; Manjunath *et al.*, 1994 e Targon, 1997).

1.4.1.3. Detecção e diferenciação de isolados do CTV

Inúmeras técnicas têm sido utilizadas visando diferenciar isolados fracos do CTV. O procedimento normalmente utilizado é o ensaio biológico, com plantas indicadoras. Entretanto, além de ser um processo bastante lento, não existe padronização quanto aos hospedeiros que são usados na caracterização biológica dos isolados. Geralmente o limão

'Galego' é o mais utilizado, porém, possui pequeno poder discriminatório. Em poucos casos é utilizada a laranjeira Azeda para caracterização quanto à sintomatologia "seedling yellows" .

Esforços têm sido feitos no sentido de determinar outras características detectáveis nos vírus ou nos tecidos infectados que possibilitem distinguir entre estirpes e relacionar tais características com a sintomatologia. Atualmente a serologia ainda não pode ser aplicada com esse objetivo, uma vez que o CTV não é um único vírus e sim um complexo de vírus relacionados imunologicamente, o que torna problemática a sua detecção com base nas reações serológicas. Em trabalhos desenvolvidos no Brasil (Vega *et al.*, 1993) foi verificado que anticorpos monoclonais produzidos contra isolados dos E.U.A. não conseguem diferenciar isolados com diferentes graus de severidade que ocorrem no Brasil. Outras técnicas aplicadas para a identificação de isolados do CTV são a análise do padrão de bandas de dsRNA extraído de tecidos infectados e fracionados por PAGE (Dodds *et al.*, 1984) e o mapeamento peptídico da capa protéica do vírus (Pappu *et al.*, 1993).

Em análise de mapeamento de peptídeos são observadas diferenças na sensibilidade de proteínas da capa à digestão enzimática e o número e tamanho dos peptídeos gerados. Reação com anticorpos monoclonais algumas vezes permite diferenciar peptídeos com mobilidade eletroforética similar. Por esse procedimento é possível distinguir isolados de CTV que diferem por suas propriedades biológicas e/ou perfil dsRNA, assim como alguns isolados com características biológicas similares e o mesmo perfil dsRNA. O método de detecção de dsRNA baseia-se no fato de que as plantas não infectadas com vírus de RNA não apresentam quantidades apreciáveis de RNA de fita dupla (Dodds *et al.*, 1984).

O diagnóstico molecular do CTV consiste na detecção de três segmentos de dsRNAs subgenômicos com massa molecular de 1,3; 1,9 e 0,9 x 10⁶, presentes em todas as estirpes analisadas, que parecem ser características do vírus (Dodds *et al.*, 1987). Foram detectados

também outros dois dsRNAs subgenômicos de $1,7 \times 10^6$ e $0,5 \times 10^6$ associados com estirpes do CTV que causam "seedling yellows" e "stem pitting", respectivamente.

Uma abordagem promissora deste problema é através da localização no RNA do genoma viral de genes (ou sequências) que modulam a severidade do isolado. Estas sequências poderiam ser detectadas através de sondas marcadas não radioativamente, ou através de testes de PCR ("Polymerase chain reaction") com iniciadores ("primers") adequados.

Atualmente técnicas de Biologia Molecular têm sido utilizadas na identificação de isolados do CTV, tais como RFLP ("Restriction fragment length polymorphism"), do gene da capa protéica do vírus, amplificado por PCR. Segundo Gillings *et al.* (1993), a identificação dos isolados pode ser feita com rapidez e segurança. Outra técnica empregada é chamada "Single stranded conformational polymorfism" (SSCP) que separa moléculas de DNA com tamanhos similares mas com diferenças nas sequências de ácidos nucleicos (Febres *et al.*, 1995). Devido às diferenças existentes, ocorrem mudanças na conformação da molécula, que conduz a uma migração diferencial de moléculas de DNA de fita simples em géis de poliacrilamida não desnaturantes. De acordo com os autores, através de RT-PCR ("Reverse transcription polymerase chain reaction") e SSCP, foi possível identificar diferenças na sequência de ácidos nucleicos entre vários isolados do CTV.

Um aspecto ainda não estudado é o referente à resposta da planta à infecção viral. Para que uma planta cítrica seja infectada pelo CTV deve ocorrer uma seqüência de eventos, tais como inoculação do vírus pelo afídeo vetor seguida de replicação inicial do vírus, invasão sistêmica da planta e finalmente a indução de sintomas que caracterizam a doença (Wood, 1989). A caracterização dos isolados é normalmente feita pelo resultado final, isto é, a intensidade ou severidade dos sintomas manifestados. Neste sentido a proposta deste trabalho foi estudar cada etapa desse processo, pouco estudado até o presente, não só como objetivo de

conhecimento básico, mas como fonte de informação para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico. Cada uma das etapas da infecção é influenciada ou controlada por genes virais e estão relacionadas com as características de severidade e capacidade protetiva do isolado viral.

Por outro lado não há informação sobre os fatores que determinam que um isolado do CTV seja protetivo ou não quando desafiado por um complexo viral severo. É possível que o estudo mais detalhado destes procesos permita diferenciar isolados que são fracos por diferentes motivos, por exemplo, por ter sua distribuição na planta diminuída ou por induzir uma resposta menor a nível enzimático nas plantas infectadas.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Caracterizar as alterações histológicas e fisiológicas induzidas em plantas de laranja ‘Pera’ e limão ‘Galego’ por infecção com isolados fracos e severos do CTV.

Objetivos Específicos

- Caracterizar a resposta da planta à infecção pelo CTV quanto a variações de atividades enzimáticas envolvidas na reação da planta.
- Obter dados sobre a localização a nível morfo-histológico de peroxidases ligadas à parede celular.
- Obter dados sobre isoenzimas de peroxidases envolvidas na resposta à infecção pelo CTV.
- Caracterizar a resposta das plantas à infecção pelo CTV quanto a alterações no conteúdo de ácido salicílico total

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e isolados do CTV

Foram utilizadas no presente trabalho plantas de laranja ‘Pera’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e limão ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle), enxertadas em limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) provenientes de borbulhas sadias obtidas no Centro APTA Citros, “Sylvio Moreira”, Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Cordeirópolis, São Paulo. Como fonte do vírus da tristeza foram usadas a laranja Pera IAC e o limão Galego isolado 50, como isolados fracos e as laranjas Pera Rio e Barão B como isolados severos.

O isolado presente em Pera IAC, foi coletado 40 anos atrás em pomares de laranja ‘Pera’ e selecionado como o melhor entre 45 isolados testados em experimento de proteção cruzada (Müller & Costà, 1977, citado por Targon, 1997). Indexado em limão ‘Galego’, dá uma reação fraca. Sua estabilidade e alto grau de proteção foram responsáveis pelo sucesso da pré-imunização em laranja ‘Pera’ no Estado de São Paulo. Outro isolado fraco utilizado neste trabalho, presente em limão ‘Galego’ (isolado 50), apresenta reação fraca quando inoculado nessa hospedeira.

O isolado Barão B, foi coletado em campo, de plantas sem sintomas mas portadoras do vírus e é até hoje mantido em casa de vegetação. Borbulhas de Barão B, quando enxertadas em laranja azeda e pomelo, apresentam reação severa de tristeza (Grant & Costa, 1948, citado por Targon, 1997). O isolado presente em laranja Pera (Rio 154), pertence à coleção de clones velhos do Centro APTA Citros, “Sylvio Moreira” , IAC, apresenta sintomas severos da tristeza quando enxertado em limão ‘Galego’.

Plantas de limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) foram obtidas a partir de semeadura direta de sementes, em tubetes de plástico de 50 ml, contendo substrato à base de vermiculita e casca de pinus. Assim que atingiram tamanho adequado (aproximadamente 6 meses), as plantas foram enxertadas com duas borbulhas retiradas de plantas de laranja 'Pera' ou de limão 'Galego' sadias. Cerca de 90 dias após a enxertia, as plantas foram enxertadas, abaixo das borbulhas sadias anteriormente citadas, com duas borbulhas retiradas das plantas infectadas com os isolados fracos (Pera IAC e isolado 50) e com os isolados severos (Pera Rio e Barão B) do vírus. Para cada tratamento foram utilizadas vinte repetições. Como controle foram usadas plantas enxertadas apenas com as borbulhas sadias. As plantas foram mantidas em casa de vegetação.

3.2.Avaliação da multiplicação dos isolados do vírus

A multiplicação dos isolados do CTV foi avaliada através de testes ELISA ("Enzyme linked immunosorbent assay"), usando anticorpo policlonal específico contra a proteína do capsídeo do vírus (Baptista *et al.*, 1996). As análises foram feitas aos 20, 30 e 60 dias após a enxertia das plantas com os isolados fracos e severos do CTV. Como controle foram utilizadas plantas negativas e positivas para o CTV.

Os testes foram feitos utilizando-se anticorpo policlonal (PAb) na cobertura da placa e, posteriormente, uma mistura de anticorpos monoclonais (MAb) de amplo espectro, que foram detectados através de conjugado anti-mouse IgG-fosfatase alcalina. A metodologia utilizada foi a descrita por Cambra *et al.* (1991), como segue:

- Microplacas de poliestireno (Corning 29860) foram cobertas com anticorpo policlonal específico para o CTV, diluído 1:10.000 em tampão carbonato e incubadas durante 2 horas a 37°C.

- Extrato das folhas ensaiadas, diluído 1:20 (p/v) em tampão PBS foi colocado nas placas e feita uma incubação durante 1 hora a 37°C.

- Tampão PBS contendo 2% de leite em pó desnatado foi adicionado nas placas e foi feita uma incubação durante 15 minutos a 37°C.

- Anticorpos monoclonais específicos diluídos 1: 1.000 em tampão PBS foram adicionados e as placas incubadas durante 1 hora a 37°C.

- Foi adicionado tampão PBS contendo conjugado anti-mouse IgG-fosfatase alcalina (Sigma) na diluição de 1:50.000 e foi feita uma incubação por 1 hora a 37°C.

- As placas foram incubadas com substrato p.nitrofenil fosfato (PNPP-Sigma 104) diluído em tampão de dietanolamina (1 mg/ml), durante 1 hora no escuro, à temperatura ambiente.

- Mediu-se a absorbância a 405 nm em leitor de placas de ELISA.

O mesmo volume (100 µl/poço) foi usado para todos os reagentes. As amostras foram ensaiadas em duplicata. As placas foram lavadas entre cada passo 3 vezes com PBS-T.

3.3. Determinações enzimáticas

3.3.1. Peroxidases - PER - (EC 1.11.1.7)

3.3.1.1. Ensaios espectrofotométricos

Os ensaios para a determinação da atividade da enzima POX foram realizados segundo metodologia descrita por Peyrano *et al.* (1997), com modificações. Siringaldazina e guaiacol foram usados como substratos. A determinação incluiu peroxidases citoplasmáticas e ligadas à parede celular, assim como peroxidases totais. Para tanto foram realizadas três extrações, que foram feitas a partir da porção apical do caule lignificado (extrato bruto).

a) Peroxidases citoplasmáticas – (cit): 100 mg do material vegetal foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 6,0 e centrifugado a 12000 g durante dez minutos. O sobrenadante foi utilizado nos ensaios enzimáticos e o precipitado obtido foi utilizado na extração de peroxidases ligadas à parede celular;

b) Peroxidases ligadas à parede celular – (pc): Ao precipitado obtido acima (peroxidases citoplasmáticas) foram adicionados 500 µL do mesmo tampão contendo KCl 1M e 0,25 g de PVP/ g tecido. O material foi mantido sob agitação durante duas horas a 25° C, seguido de centrifugação a 12.000 g por dez minutos. O sobrenadante obtido foi utilizado na determinação das atividades enzimáticas;

c) Peroxidases totais (totais): 20 mg do tecido vegetal foram homogeneizados em 500 µL de tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 6,0 contendo KCl 1 M e 0,25 g de PVP/ g tecido. Em seguida foi feita uma centrifugação a 12.000 g por dez minutos e o sobrenadante obtido foi usado nos ensaios.

O meio de reação para determinar a atividade de siringaldazina oxidase foi composto por 19 µM de siringaldazina, 54 µM de H₂O₂, 50 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,4; mantido a 35° C. A cada 1 mL do meio de reação, foram adicionados 20 µL do extrato vegetal e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 530 nm, a cada 10 segundos, durante um minuto e trinta segundos. A atividade foi determinada pela oxidação da siringaldazina, substrato específico para peroxidases associadas ao processo de lignificação.

O meio de reação para determinar a atividade de guaiacol oxidase foi composto por 1,2 mM de guaiacol, 0,1 M de H₂O₂ e 50 mM de tampão fosfato de sódio pH 5,7. A cada 1 mL do meio de reação foram adicionados 10 µL do extrato vegetal. A absorbância foi determinada a 470 nm a cada dez segundos, durante um minuto e trinta segundos.

3.3.1.1.1. Peroxidases ligadas à parede celular – Pox-lig

O experimento foi realizado visando determinar a atividade de peroxidases ligadas à parede celular (Pox-lig), em plantas de laranja ‘Pera’ infectadas com os isolados severos (Barão B e Pera Rio) e isolados fracos (Pera IAC e Galego 50) do vírus. Como controle foram usadas plantas sadias. A metodologia usada foi a mesma descrita anteriormente (Peyrano *et al.*, 1997), utilizando-se siringaldazina como substrato. Foram testadas no mínimo 7 plantas/tratamento. A declividade da curva obtida forneceu uma estimativa da POX, que foi expressa em variação da Abs_{530nm} / min. g massa fresca.

3.3.1.2. Separação de peroxidases por HPLC - (“High performance liquid chromatography”)

A extração das proteínas foi feita a partir de 500 mg de tecido do caule de plantas de laranja ‘Pera’ e o material vegetal homogeneizado em 2,5 mL de tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5, contendo KCl 1 M e 0,25g de PVP/g tecido. Após agitação em gelo, durante 60 min, o material foi centrifugado a 12000 g por 15 min, e o sobrenadante coletado foi filtrado em uma

coluna Sephadex G-25 (PD-10), utilizando-se tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5 para eluição. As amostras foram aplicadas em uma coluna Mono-Q (Pharmacia), equilibrada em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5, com gradiente de 0 a 0,5 M de NaCl. A coluna foi monitorada a 280 nm (UV) (Christensen *et al.*, 1998). Foram aplicadas alíquotas de 0,5 mL de cada amostra e as coletas foram feitas a cada 30 segundos, durante 30 minutos. A determinação da atividade da enzima peroxidase foi feita por espectrofotometria a 470 nm, utilizando-se guaiacol como substrato. Para tanto, 10 µL do extrato vegetal foram adicionados a 1 mL da mistura de reação contendo 5 mM de guaiacol, tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0. A reação foi iniciada mediante a adição de 5 mM de H₂O₂. As leituras da absorbância foram realizadas a cada 10 segundos, durante um minuto e trinta segundos. A declividade da curva obtida forneceu uma estimativa da peroxidase, que foi expressa em variação de Abs_{470nm} / min.g massa fresca.

3.3.1.3. Eletroforese

A determinação da atividade de peroxidases incluiu tanto peroxidases citoplasmáticas como peroxidases ligadas à parede celular. As isoenzimas foram separadas em gel não desnaturante ácido (pH 4,5) e alcalino (pH 8,3), segundo metodologia descrita por *Chen et al.* (2000), com modificações.

3.3.1.3.1. Peroxidases citoplasmáticas

A extração de proteínas foi feita conforme descrito no item 3.3.1.1.a. A cada 100 μL da amostra foram adicionados 20 μL de azul de bromofenol 0,1% e 20 μL de glicerina. As proteínas foram separadas através de eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida (10 %). Foram aplicadas alíquotas de 20 μL de amostra em cada canaleta do gel. O tampão de corrida consistiu de Tris base 25 mM e glicina 192 mM, pH 8,3. A corrida eletroforética foi feita a 30 mA por 80 min, a 5° C.

Para a análise da atividade de peroxidase, o gel foi transferido para meio de reação contendo carbazole como substrato (detecta todas as isoformas de peroxidase), composto de 200 mg de 3-amino-9-ethylcarbazole, 20 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e 20 μL de H_2O_2 . Assim que o gel adquiriu a coloração desejada foi lavado com água destilada. O gel para análise de proteína total foi corado com “Coomassie Brilliant Blue” R 250.

3.3.1.3.2. Peroxidases ligadas à parede celular

A extração de proteínas foi feita conforme descrito no item 3.3.1.1.b. A cada 100 μL da amostra foram adicionados 20 μL de “methyl green” 0.02 % e 20 μL de glicerina. As proteínas foram separadas através de eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida (8 %). Foram aplicadas alíquotas de 20 μL de amostra em cada canaleta do gel. O tampão de corrida consistiu em β -alanina 0,14 M e ácido acético 0,35 M, pH 4,5. A corrida eletroforética foi feita a 60 mA, por cerca de três horas, a 5 ° C, com polaridade invertida.

Para a análise da atividade de peroxidase, o gel foi transferido para meio de reação contendo guaiacol e siringaldazina como substratos. O meio de reação para atividade de

guaiacol oxidase foi composto por H_2O_2 50 mM, guaiacol 50 mM, tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 (Chen *et al.*, 2000). Para siringaldazina o meio de reação foi composto por 0,6 mL de 0,1% de siringaldazina em 95% de etanol, 2,4 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,0 e 0,16 mL de H_2O_2 0,1 % (Peyrano *et al.*, 1997). Assim que os géis adquiriram a coloração desejada foram lavados com água destilada.

3.3.1.4. Localização histoquímica da atividade de siringaldazina peroxidase e Imuno-localização do CTV

Esses dois experimentos foram feitos simultaneamente para comparar a localização da atividade de siringaldazina peroxidase (Peyrano *et al.*, 1997), com a localização do CTV, a nível histológico, em cortes transversais da haste apical de plantas de laranja 'Pera' impressos em membranas de nitrocelulose.

Cerca de 2 cm da haste apical das plantas foram cortados e a superfície do corte impressa levemente contra as membranas de nitrocelulose. Para a atividade de siringaldazina peroxidase as impressões foram cobertas com uma tira da mesma membrana e algumas gotas do meio de reação foram adicionadas na segunda membrana. O meio de reação foi composto por 0,6 mL de siringaldazina 0,1%, 2,4 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,0 e 0,16 mL de H_2O_2 0,1%.

Para a localização do CTV as membranas foram incubadas durante 60 min. em tampão TBS (Tris-HCl 0.05 M; NaCl 0.2 M; pH 7.5) contendo 5% de leite em pó desnatado. Em seguida foram lavadas 4 vezes em tampão TBS-T (TBS contendo 0.1% de Tween-20). Posteriormente as membranas foram incubadas com anti-soro policlonal específico para o CTV, diluído 1:10.000 em TBS, durante 60 min., seguido de 4 lavagens em TBS-T. As

membranas foram incubadas em TBS-T contendo o conjugado "anti-rabbit" IgG-fosfatase alcalina (Sigma) diluído 1:5.000, durante 1 hora à temperatura ambiente. Foi feita uma lavagem como descrito acima e em seguida foi feita a revelação em uma solução contendo 100 ml de tampão (Tris - HCl 0,1 M, pH 9.5; NaCl 0,1 M; MgCl₂ 5 mM), 8 mg de BCIP (5-bromo - 4 - chloro - 3-indolyl phosphate); 16 mg de NBT (nitroblue tetrazolium). As membranas foram colocadas em água destilada quando a coloração desejada foi obtida.

Nos dois experimentos as membranas foram examinadas sob microscópio óptico, fotografadas e a quantidade de produto da reação foi visualmente estimada.

3.3.1.5. Fluorescência

Cortes transversais da haste apical foram obtidos manualmente com cerca de 3-4 mm de diâmetro e colocados em lâminas com uma gota de água, cobertos com lamínula e observados por epi-fluorescência num microscópio Leitz. Foi utilizada luz azul (450-490nm) de excitação, com espelho divisor de 510 nm e filtro de barreira de 520 nm. Para excitação em ultra-violeta (UV) foi utilizada luz de 270-380 nm para excitação, espelho divisor de 380 nm e filtro de barreira de 410-580 nm. Os cortes foram fotografados com filme colorido positivo (slide) 400 ASA.

3.3.2. Fenilalanina amônia-liase –PAL (E.C.4.3.1.5)

A atividade da enzima PAL foi determinada de acordo com modificações do método descrito por Pascholati *et al.* (1986). A extração foi feita a partir de 1 g de tecido do caule. O material foi triturado em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino e, em seguida, foi adicionado 5 mL de tampão de extração (borato de sódio 100 mM, pH 7,0) contendo 0,1 g de polivinil-poli-pirrolidona (PVPP). Após homogeneização, a emulsão foi filtrada através de gaze e centrifugada a 12.000 g durante 30 min. A proteína foi precipitada de 2 mL do sobrenadante com 0,3 g de polietilenoglicol (PEG- 6000). Após 1 hora o material foi novamente centrifugado a 12.000 g por 20 min e o precipitado foi recuperado em 2 mL de tampão borato de sódio 100 mM, pH 8,8. Essa fração foi usada para medida da atividade enzimática. O meio de reação foi composto por 0,8 mL do extrato da amostra, 1 mL de tampão borato 100 mM, pH 8,8 e 1 mL de fenilalanina 12 mM, no mesmo tampão. Como branco foram utilizados 0,8 mL do extrato da amostra e 2 mL de tampão borato. A atividade da PAL foi determinada a 40° C através de medida espectrofotométrica da conversão da fenilalanina para ácido trans-cinâmico a 290 nm, e foi expressa em relação à massa fresca ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}$)

3.3.3. Cinamil - álcool desidrogenase - CAD – (E.C. 1.1.1.195)

A atividade da CAD foi medida de acordo com a oxidação do coniferil álcool a 30° C como indicado por Mitchell *et al.* (1994), com modificações. Os extratos enzimáticos foram obtidos a partir de 90 mg de tecido do lenho, triturados em nitrogênio líquido e homogeneizados em 1,5 mL de tampão de extração (fosfato de sódio 100 mM, pH 7,3, contendo 4% de PVPP, 2% de PEG 6000, 0,12 % de β - mercaptoetanol). As amostras foram

centrifugadas a 12.000 g por 5 min e os sobrenadantes foram usados durante os ensaios enzimáticos. A mistura de reação (1mL) continha 100 μ M de coniferil álcool, Tris-HCl 100 mM, pH 9,3, 100 μ M NaDP e 200 μ L do extrato enzimático. Os ensaios foram monitorados a 400 nm pela formação de coniferaldeído.

3.4. Análise de ácido salicílico total

O ácido salicílico foi extraído de amostras constituídas de 1 g de folhas, segundo metodologia proposta por Shulaev *et al.* (1995), com algumas modificações. As amostras foram trituradas em 2,5 mL de metanol 90% (v/v) e centrifugadas a 20.000 g por 15 minutos. O precipitado foi suspenso em 2,5 mL de metanol 100 % e novamente centrifugado. Os sobrenadantes resultantes destas duas extrações foram combinados e secos em aparelho de Speed Vac (SC 110), Savant. Posteriormente, o material foi suspenso em 5 mL de HCl 2 N, a 60° C durante 40 minutos. Foi realizada uma extração com 15 mL de acetato de etila, em três vezes de 5 mL cada. As amostras foram secas em evaporador rotatório, suspensas em 1 mL de tampão para HPLC (23 % (v/v) de metanol em tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,0). A quantificação foi feita por espectrofluorescência, através de HPLC com λ excitação de 313 nm e emissão de 405 nm, conforme metodologia descrita por Enyedi *et al.* (1992). Os extratos vegetais foram injetados numa coluna SuperPac Sephacil TM C 185 μ m (4,0 mm x 25 cm) e as amostras foram fracionadas isocriticamente com 23 % (v/v) de metanol em tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,0; num fluxo de 1,0 mL/min.

3.5. Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram completamente casualizados, e foram utilizados no mínimo dez plantas por tratamento (repetições). A análise estatística dos dados obtidos nos experimentos constou de cálculo da média e desvio padrão.



4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da concentração dos isolados do vírus

4.1.1. DASI – ELISA

A tabela 1 apresenta os resultados obtidos nos testes de DASI - ELISA das plantas de laranja 'Pera' após enxertia das borbulhas infectadas com os isolados fracos e severos do CTV e dos controles sadios. Aos 20 dias após a enxertia das borbulhas contaminadas o CTV não foi detectado em nenhum dos isolados testados. Somente após o 30º dia foi possível detectar o vírus. Aos 30 dias após a enxertia os valores de absorbância foram de 0,369 e 0,373 para os isolados fracos Pera IAC e Galego 50, respectivamente e 0,550 e 0,560 para os isolados severos Pera Rio e Barão B, respectivamente. Os controles sadios apresentaram valores de absorbância de 0,004. Aos 60 dias os valores de absorbância obtidos foram maiores em todas as amostras infectadas testadas, indicando maior concentração de partículas do vírus. Os valores obtidos foram de 0,750 e 0,741 para os isolados Pera IAC e Galego 50, respectivamente, e 1,420 e 1,441 para os isolados Pera Rio e Barão B, respectivamente. As plantas sadias apresentaram valores de absorbância de 0,009 indicando ausência de partículas virais nessas amostras.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que as partículas do CTV só puderam ser detectadas após 30 dias da enxertia nos diferentes isolados analisados através de DASI-ELISA. A concentração de partículas virais aumentou com o tempo, deixando evidente que a multiplicação dos vírus estava ocorrendo. Os valores de absorbância obtidos para os

isolados severos (Pera Rio e Barão B) foram sempre maiores em relação aos isolados fracos (Pera IAC e Galego 50), chegando a dobrar o valor após 60 dias da enxertia. Sendo ELISA um teste quantitativo, os resultados aqui obtidos deixam claro que os isolados severos do CTV atingem uma maior concentração de partículas virais nas plantas em relação aos isolados fracos do vírus.

4.2. Determinações enzimáticas

4.2.1. Peroxidases

4.2.1.1. Ensaio espectrofotométrico

As figuras 1 e 2 mostram exemplos de ensaios de atividade de guaiacol-peroxidase em plantas individuais de limão 'Galego', nos quais a atividade peroxidásica está representada pela inclinação da curva nos primeiros 30 segundos de reação. Observa-se que, tanto na extração da enzima citoplasmática (Fig. 1) como de atividade total (Fig. 2), não há um padrão coerente nas alterações de atividade associadas à infecção por diferentes isolados de CTV. Por exemplo, na Fig. 1A a planta sadia e a infectada pelo isolado severo apresentam inclinação muito semelhante, ao passo que a infectada pelo isolado fraco mostra atividade bem menor. Já no teste da Fig. 1B, as três plantas (sadia, infetada pelo isolado fraco e pelo isolado severo) tiveram atividades (inclinações) muito similares. Após numerosos testes concluiu-se que não houve correlação entre a atividade da guaiacol-peroxidase (total ou citoplasmática) e a severidade dos isolados do vírus. Entretanto, a avaliação da atividade da guaiacol-peroxidase extraída da parede celular (Fig. 3), mostrou um padrão de alteração bastante constante em

todos os materiais testados ou seja, aumento de atividade nas plantas infectadas pelo isolado severo e diminuição de atividade nas plantas infectadas pelo isolado fraco.

Nos experimentos com siringaldazina, substrato específico para peroxidases ligadas à parede celular, os resultados seguiram o padrão acima descrito para as três formas de extração utilizadas (vide exemplos nas figuras 4, 5, 6). A enzima apresentou valores de atividade maiores nas plantas infectadas com isolado severo do CTV, enquanto que plantas infectadas com isolado fraco do vírus apresentaram queda na atividade em todas as amostras testadas.

A figura 7 mostra um teste típico de atividade da siringaldazina-peroxidase total em plantas de laranja 'Pera'. O padrão de alteração da atividade observado é idêntico ao descrito para plantas de limão 'Galego' (Fig. 5): aumento de atividade associado à infecção por isolado severo e queda de atividade associada à infecção por isolado fraco.

Tabela 1. Teste DAS-ELISA em plantas de laranja 'Pera' infectadas com isolados fracos (Pera IAC e Galego 50) e severos (Pera Rio e Barão B) do CTV aos 20, 30 e 60 dias após a enxertia. Como controle foram usadas plantas de laranja 'Pera' enxertadas com borbulhas saudáveis.

<i>Dias após a enxertia</i>	<i>Absorbância 405 nm</i>				
	<i>Pera IAC</i>	<i>Galego 50</i>	<i>Pera Rio</i>	<i>Barão B</i>	<i>Sadia</i>
20	0,007	0,012	0,009	0,005	0,008
30	0,369	0,373	0,550	0,560	0,004
60	0,750	0,741	1,420	1,441	0,009

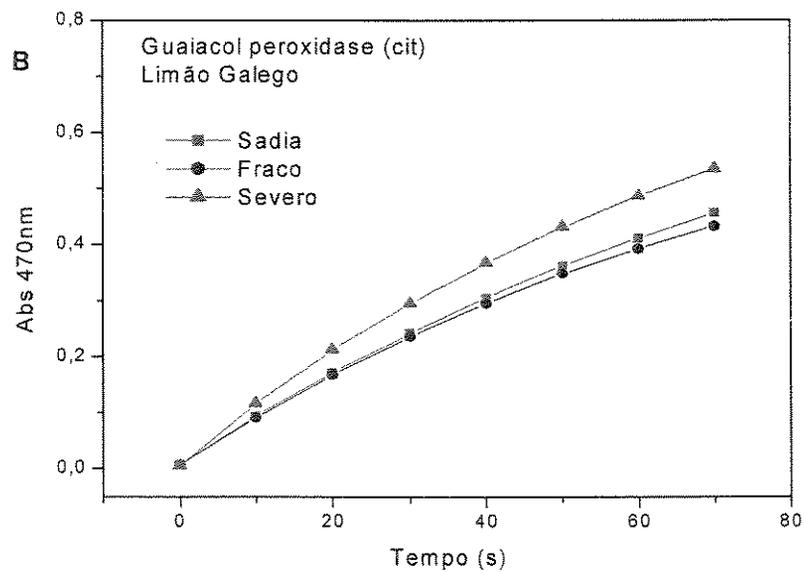
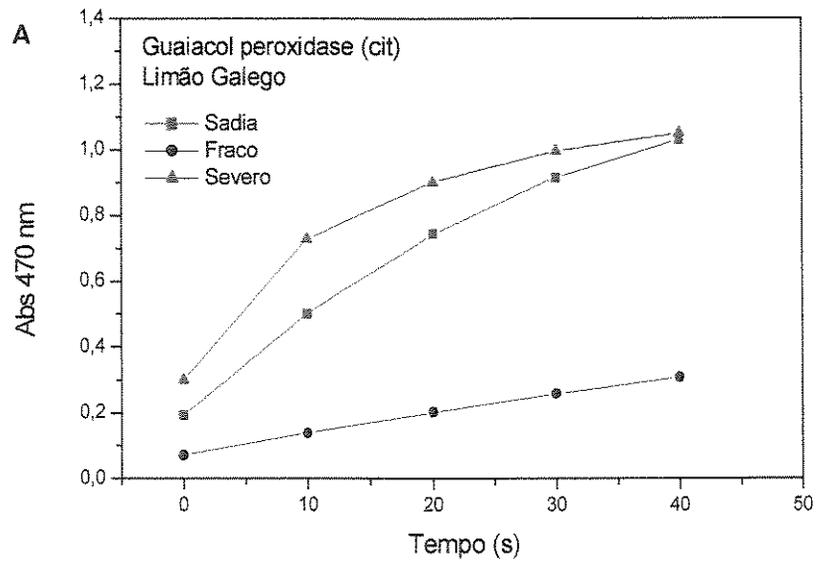


Figura 1. Exemplo de testes de guaiacol-peroxidase citoplasmática em plantas de limão ‘Galego’ infectadas com isolados fracos e severos do CTV e em plantas sadias. Observar a ausência de um padrão nas respostas obtidas em experimentos realizados em datas e plantas diferentes.

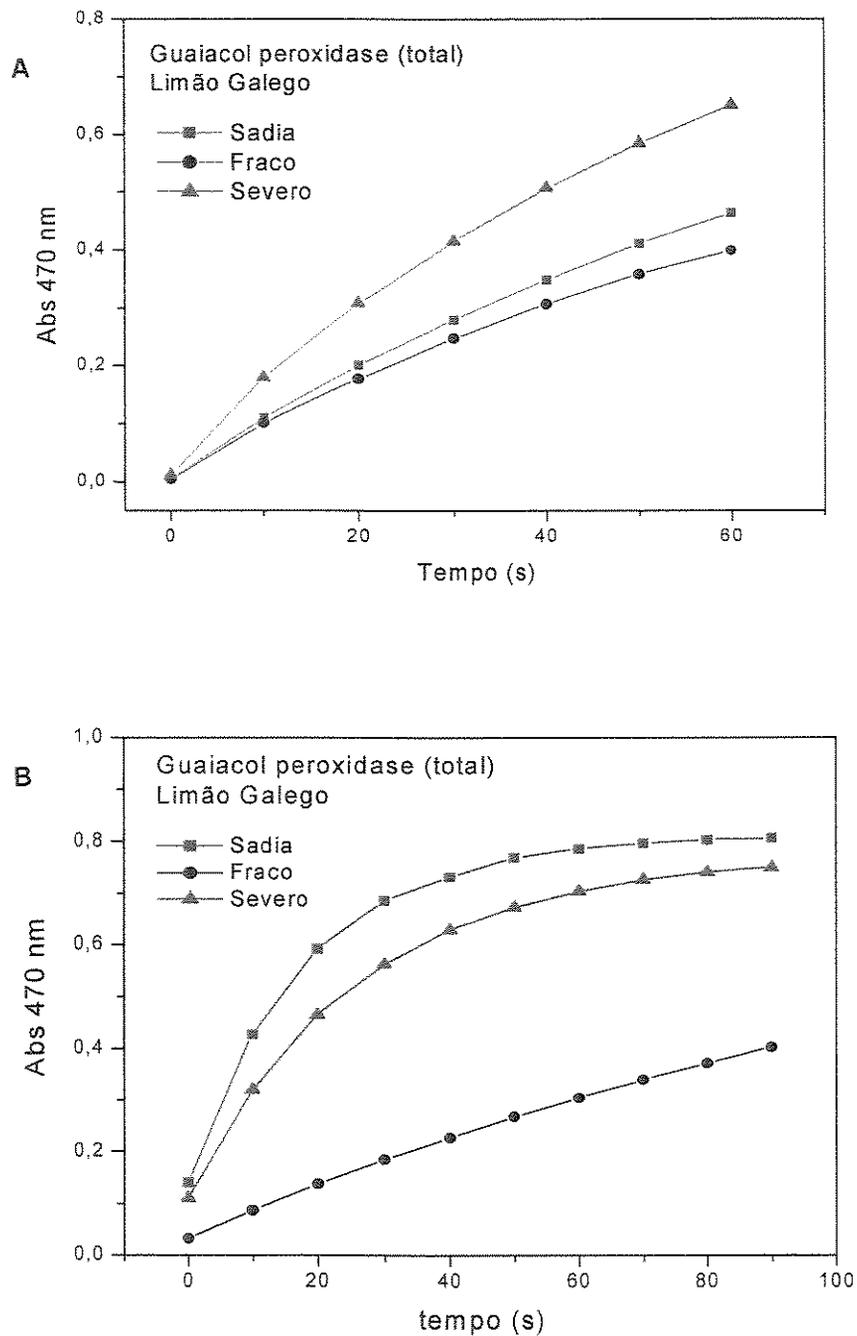


Figura 2. Exemplo de testes de guaiacol-peroxidase total em plantas de limão ‘Galego’ infectadas com isolados fracos e severos do CTV e em plantas saudias. Observar a ausência de um padrão nas respostas obtidas em experimentos realizados em datas e plantas diferentes.

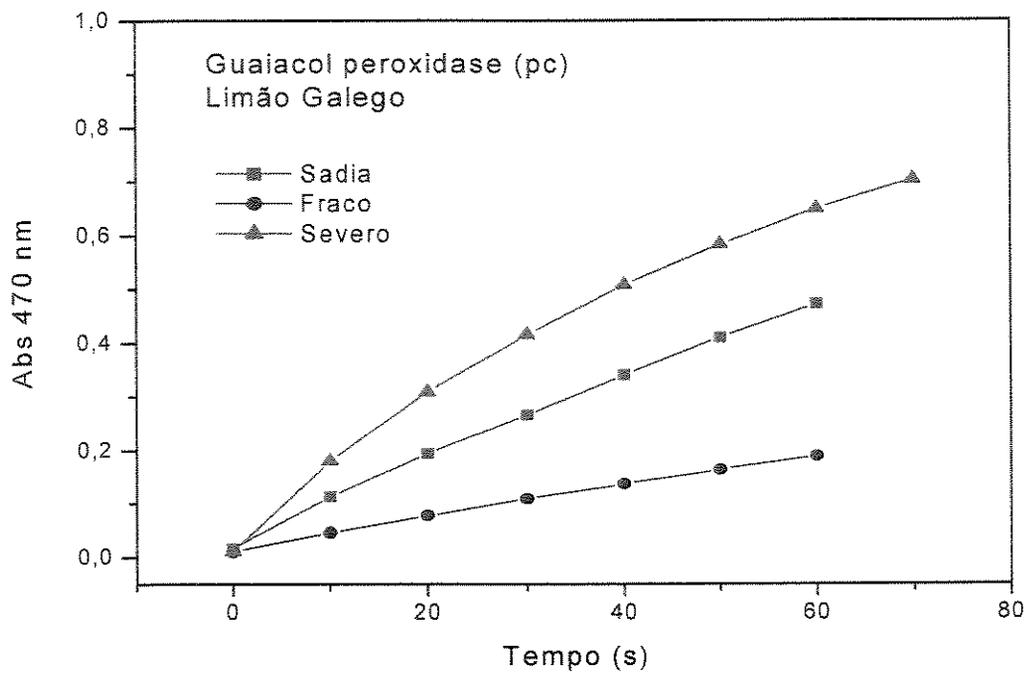


Figura 3. Atividade de peroxidase ligadas à parede celular em plantas de limão ‘Galego’ infectadas com isolados fracos e severos do CTV e em plantas sadias, utilizando guaiacol como substrato.

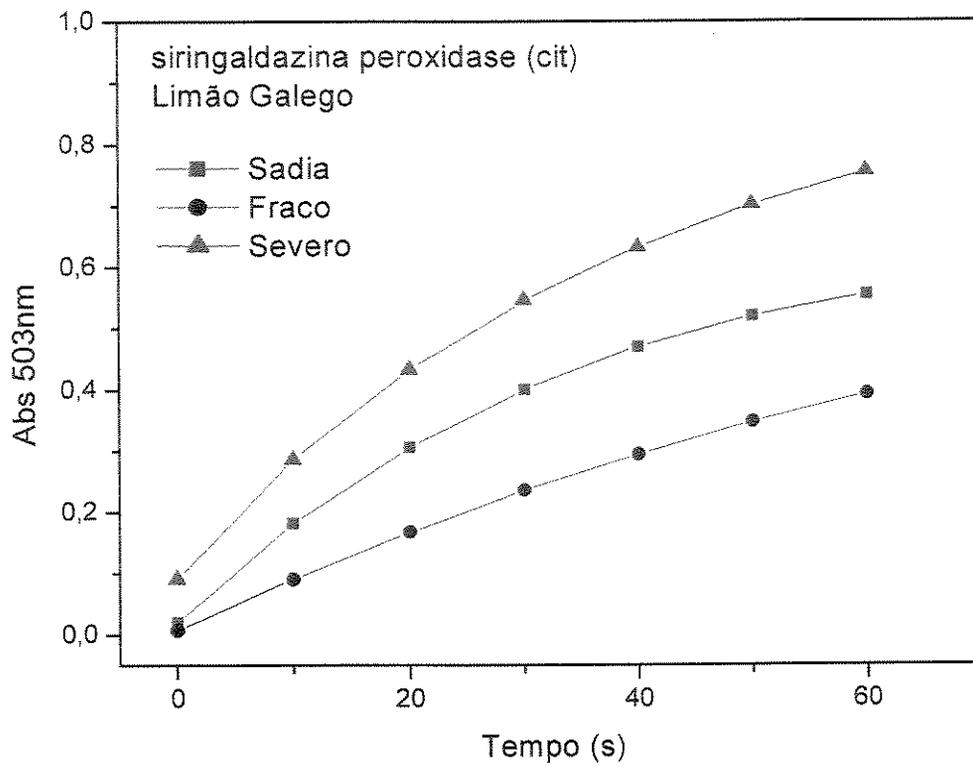


Figura 4. Atividade de peroxidase citoplasmática em plantas de limão 'Galego' infectadas com isolados fracos e severos do CTV e em plantas saudias, utilizando siringaldazina como substrato.

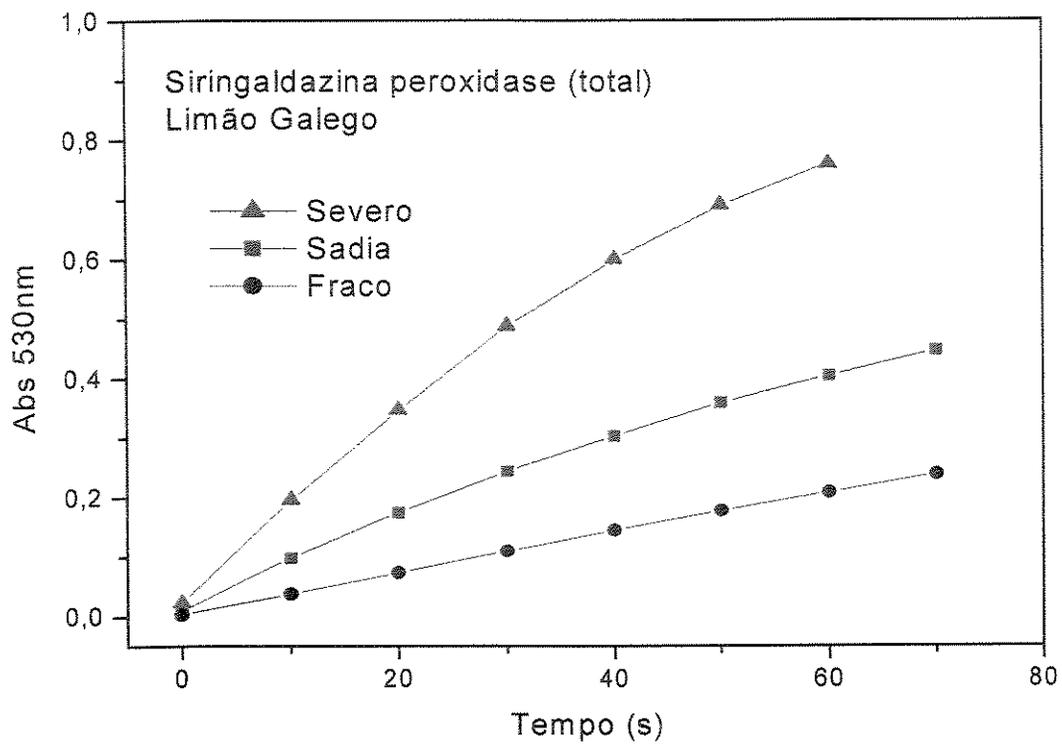


Figura 5. Atividade de peroxidase total em plantas de limão 'Galego' infectadas com isolados fracos e severos do CTV e em plantas saudias, utilizando siringaldazina como substrato.

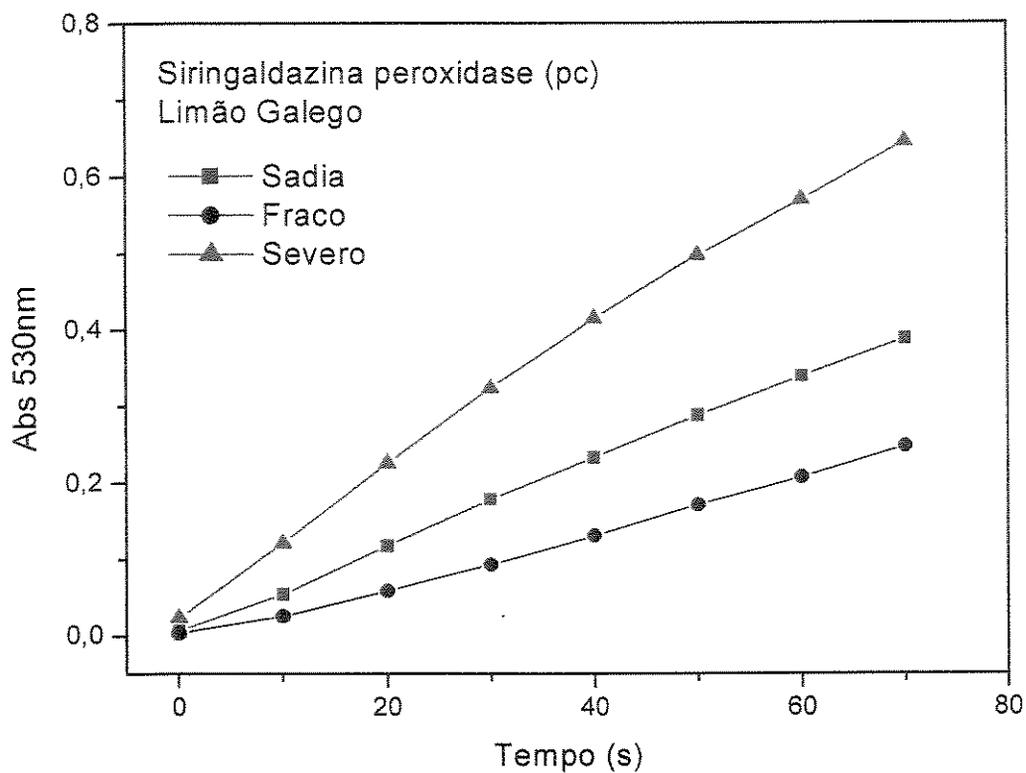


Figura 6. Atividade de peroxidase ligadas à parede celular em plantas de limão 'Galego' infectadas com isolados fracos e severos do CTV e em plantas saudias, utilizando siringaldazina como substrato.

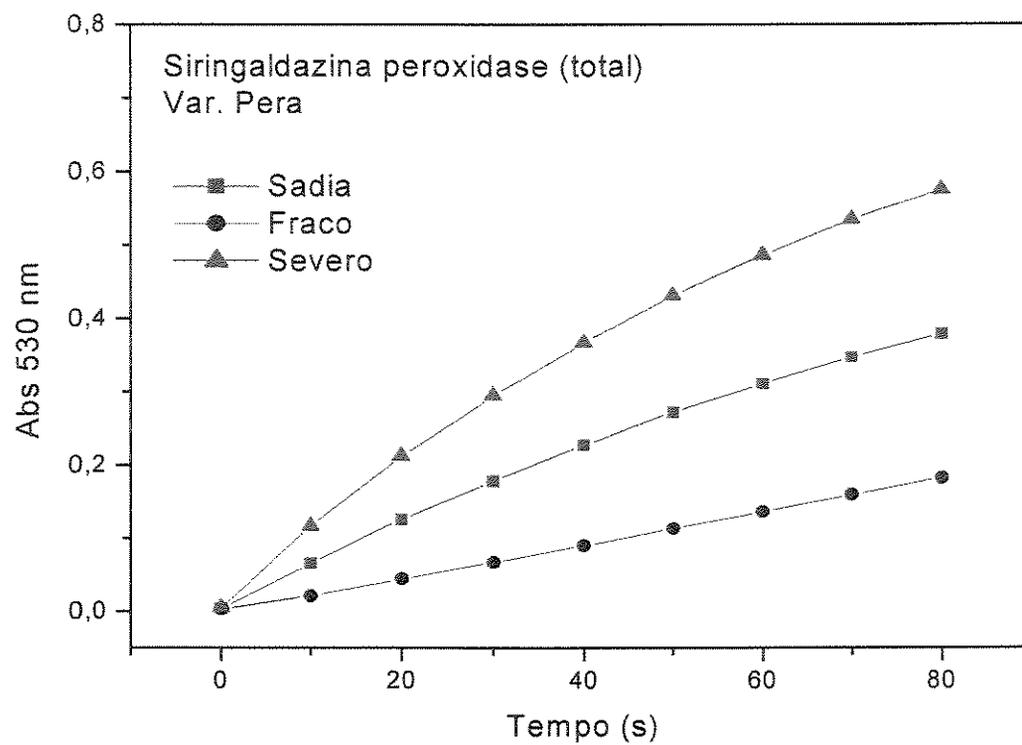


Figura 7. Atividade de peroxidase total em plantas de laranja 'Pera' infectadas com isolados fracos e severos do CTV e em plantas sadias, utilizando siringaldazina como substrato.

Os resultados obtidos para a peroxidases ligadas à parede celular - Pox-lig (Figura 8) mostraram, de um modo geral, que as plantas infectadas com isolados severos do CTV apresentaram atividade significativamente maior, quando comparadas com plantas sadias. Os isolados fracos não alteraram a atividade da peroxidase ou induziram queda na sua atividade. As médias obtidas para as atividade da Pox-lig foram 6,58 e 6,7 $\Delta\text{Abs}_{530\text{nm}} / \text{min.g}$ de massa fresca para os isolados severos Pera Rio e Barão B, respectivamente; 4,35 $\Delta\text{Abs}_{530\text{nm}} / \text{min.g}$ de massa fresca para as plantas controle e 3,8 e 2,8 $\Delta\text{Abs}_{530\text{nm}} / \text{min.g}$ de massa fresca para os isolados fracos Pera IAC e Galego 50, respectivamente. Esses resultados foram consistentes em testes adicionais podendo ser um indicativo na diferenciação entre isolados fracos e severos do CTV.

4.2.1.2. Fracionamento da atividade de guaiacol peroxidase por HPLC

A análise da atividade de guaiacol peroxidase através de fracionamento por HPLC (Figura 9) mostrou que as plantas infectadas com o isolado severo do CTV apresentaram dois picos de atividade, sendo o primeiro aos 16-17 minutos de eluição, com atividade em torno de 0,02 $\Delta\text{Abs}_{470\text{nm}} / \text{min.}$ e o segundo pico, aos 19,5 min. de eluição, com atividade bem maior, em torno de 0,09 $\Delta\text{Abs}_{470\text{nm}} / \text{min.}$ Por outro lado, plantas sadias e plantas infectadas com isolado fraco do vírus apresentaram apenas um pico de atividade aos 20 min. de eluição com absorvância ao redor de 0,04 e aos 21 min. de eluição com absorvância ao redor de 0,06 $\Delta\text{Abs}_{470\text{nm}} / \text{min.}$, respectivamente.

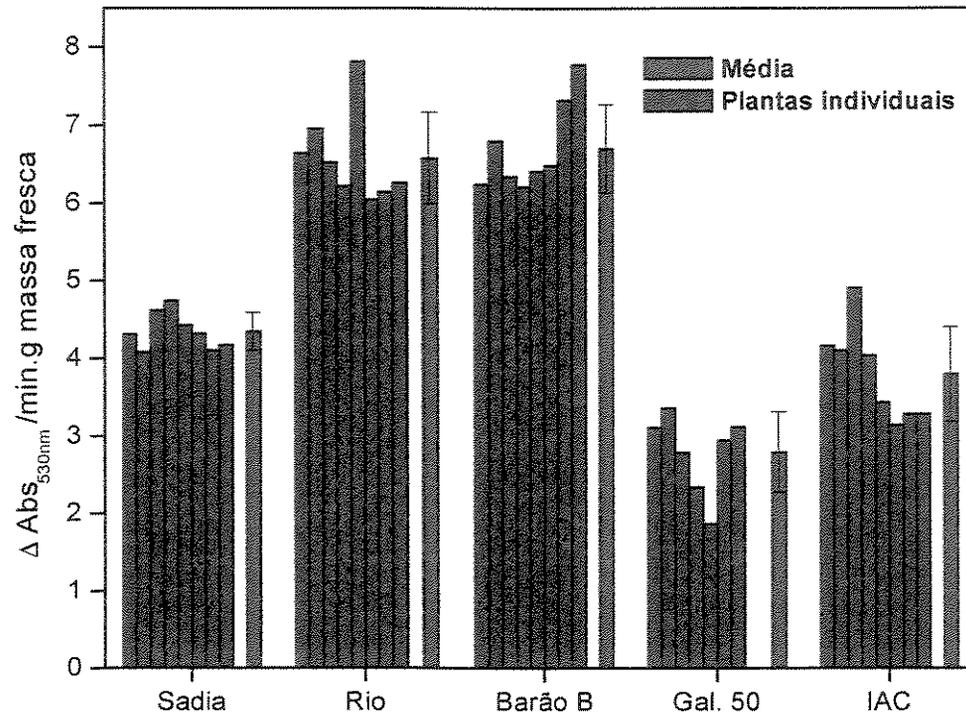


Figura 8 . Atividade de siringaldazina peroxidase (Pox-lig) em plantas de laranjeira Pera infectadas com isolados fortes do CTV (Pera Rio e Barão B) e isolados fracos (Galego 50 e Pera IAC). Como controle foram usadas plantas de laranjeira Pera sadias. Barras verticais representam desvio padrão.

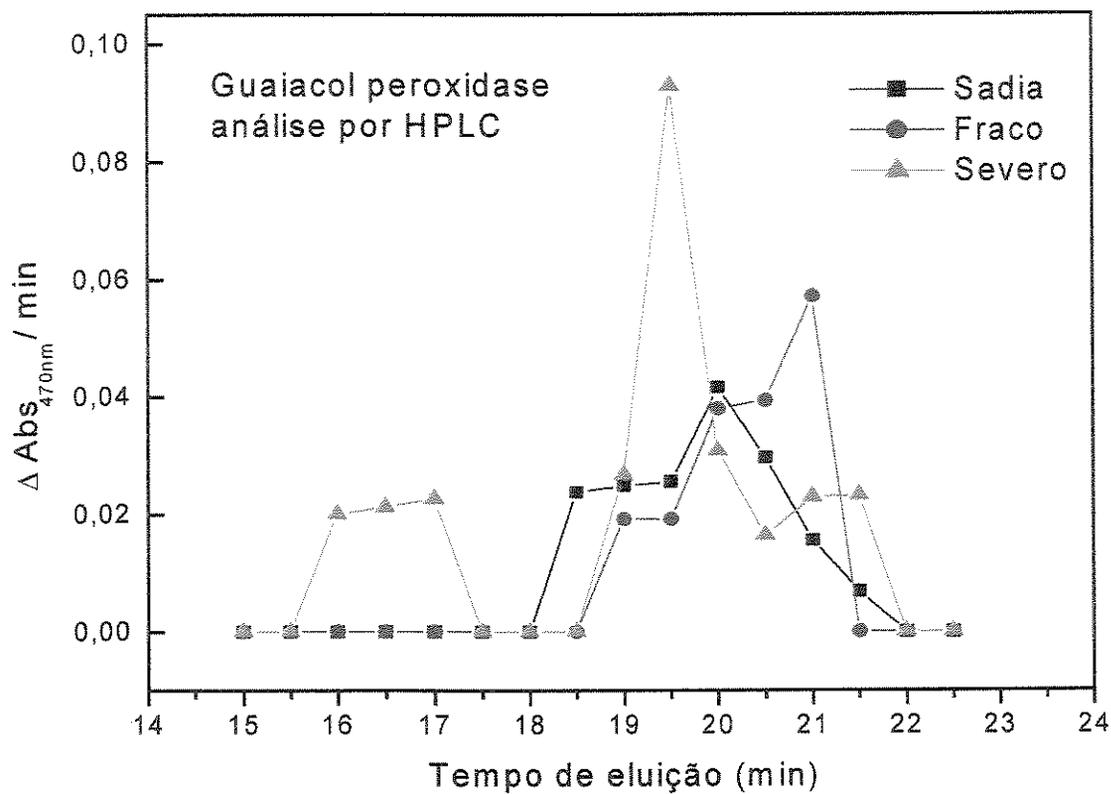
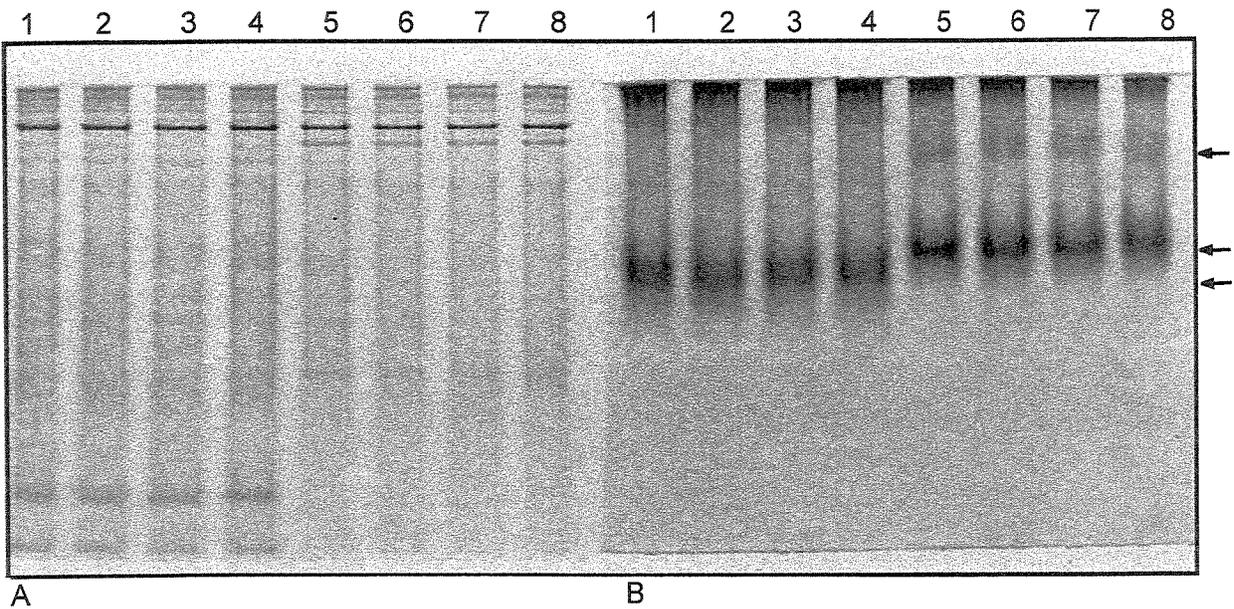


Figura 9. Análise da atividade de guaiacol peroxidase após fracionamento por HPLC em extratos de plantas de laranja 'Pera' sadias ou infectadas com isolado fraco e severo do CTV.

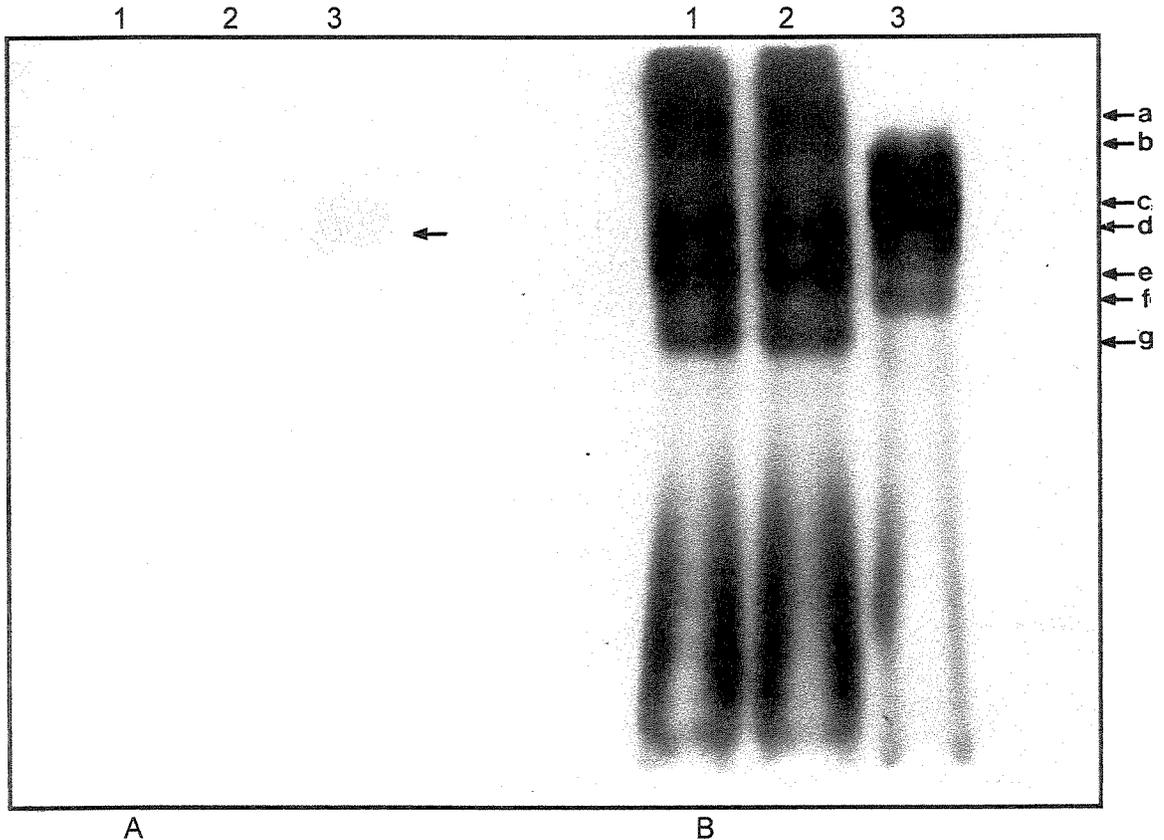
4.2.1.3. Eletroforese

Em pH alcalino o perfil eletroforético das peroxidases citoplasmáticas extraídas de plantas inoculadas com isolado fraco do CTV (Pera IAC) e de plantas sadias foi similar, porém, diferente do perfil eletroforético de plantas inoculadas com os isolados severos Pera Rio e Barão B, tanto no gel corado com carbazole para análise da atividade enzimática como em gel corado com "Comassie blue" para análise de proteína total (Fig. 10). Utilizando-se carbazole como substrato, as isoperoxidasas do isolado fraco do vírus e de plantas sadias apresentaram uma banda com maior mobilidade eletroforética (Fig. 10-B, linhas 1,2,3,4), enquanto que as isoperoxidasas extraídas dos isolados severos apresentaram duas bandas com menor mobilidade eletroforética (Fig. 10-B, linhas 5,6,7,8). Essas bandas não corresponderam a nenhuma proteína no gel corado com "Coomassie Blue" (Fig. 10-A).

A corrida feita em pH ácido utilizando-se guaiacol como substrato, revelou cinco isoformas de peroxidases para os isolados fracos do CTV e para plantas sadias, que correspondem às bandas **a**, **b**, **d**, **e**, **g** (Fig. 11-B) e duas isoformas para o isolado severo do vírus correspondendo as bandas **c**, **f**. Quando siringaldazina foi usada como substrato, apenas uma banda de coloração púrpura foi observada no isolado severo do CTV que corresponde à isoperoxidase **c** no gel corado com carbazole (Fig. 11-A, linha 3). Nenhuma atividade de siringaldazina peroxidase foi detectada em plantas infectadas com o isolado fraco do vírus e plantas sadias (Fig. 11-A, linhas 1 e 2).



A B
 Figura 10. Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante alcalino (pH 8,3) de proteínas de laranja Pera. A) corado com Coomassie Blue. B) Detecção de atividade peroxidásica com carbazole. (1,2) Sadia, (3,4) Isolado fraco CTV-IAC, (5,6) Isolado severo CTV-Rio;(7,8) Isolado severo CTV-Barão B. Setas indicam posição das bandas.



A B
 Figura 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante ácido (pH 4,5) de proteínas de laranja Pera. Detecção de atividade peroxidásica com syringadazina (A) e guaiacol (B). (1) Sadia; (2) isolado fraco; (3) isolado severo. Setas indicam posição das bandas.

4.2.1.4. Imuno-localização do CTV e localização histoquímica de siringaldazina peroxidase

Em laranjeiras ‘Pera’, a imuno-localização do vírus em impressões de cortes transversais de caule em membranas de nitrocelulose, permitiu a clara visualização do precipitado que caracteriza a presença do vírus, na região do floema secundário (Figs. 12 c e 12 e). A quantidade de precipitado observado se correlaciona com a concentração do vírus determinada através de ELISA, ou seja, maior quantidade de precipitado no material infectado pelo isolado severo (Fig. 12e). Também é possível observar que o isolado fraco ocorre em pequenas áreas isoladas entre si (Fig. 12c), ao passo que o isolado severo parece infectar uniformemente áreas maiores do floema (Fig. 12e).

A atividade de siringaldazina peroxidase em membranas de nitrocelulose preparadas paralelamente às de imuno-localização do vírus, mostraram que esta atividade enzimática localiza-se numa porção mais externa do caule, e mostra intensidade e distribuição (Figs 12 d e 12 f) correlacionada com a distribuição e concentração viral sinalizada pela sua imuno-localização.

4.2.1.5. Fluorescência

Nos ensaios de microscopia de fluorescência, plantas de limão ‘Galego’ infectadas pelo isolado severo Barão B apresentaram depressão no xilema, que pôde ser visualizada quando utilizou-se excitação com luz UV (Fig. 13 a). O material contido no xilema apresentou fluorescência amarela com excitação por luz azul (Fig. 13 b). Em plantas sadias e em plantas infectadas pelo isolado fraco Galego 50 não foram observadas alterações na fluorescência na região do floema e do câmbio vascular (Fig. 13 c,d, respectivamente). Em

plantas de laranja ‘Pera’ infectadas pelos isolados severos Barão B e Pera Rio, foi observado um acúmulo de material fluorescente verde, na região do câmbio vascular (Fig. 14).

4.2.2 Fenilalanina amônia – liase

As médias obtidas para a atividade da enzima PAL foram de 12,26 e 12,73 ($\mu\text{moles}\cdot\text{min}/\text{g}$ massa fresca) para os isolados fortes Pera Rio e Barão B, respectivamente; 5,68 e 2,96 ($\mu\text{moles}/\text{min}\cdot\text{g}$ massa fresca) para os isolados fracos Pera IAC e Galego 50, respectivamente e 6,37 ($\mu\text{moles}/\text{min}\cdot\text{g}$ massa fresca) para os controles sadios (Figura 15).

Os resultados mostram que a diferença de atividade entre os isolados severos e fracos foi bastante significativa, em torno de 2 a 4 vezes maior para os isolados severos. As plantas infectadas com o isolado fraco Pera IAC mostraram atividades semelhantes aos controles sadios, enquanto que as atividades das plantas infectadas com o isolado fraco Galego 50 mostraram-se menores que as das plantas sadias ou não mostraram atividade.

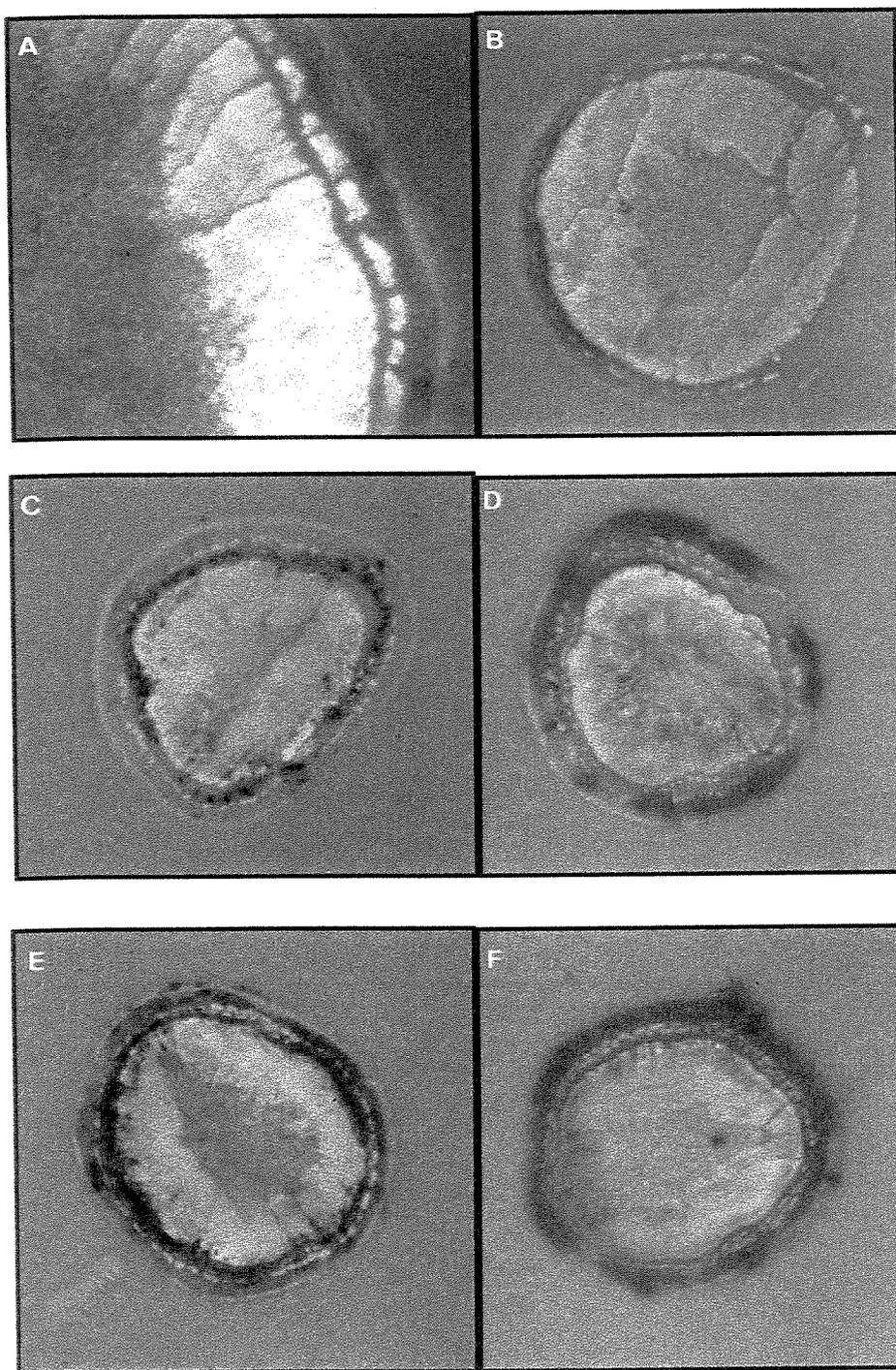


Figura 12. Localização imunohistoquímica do CTV (a,c e) e localização histoquímica da atividade siringaldazina peroxidase (b, d,f) em membranas de nitrocelulose impressas com cortes transversais de haste apical de laranjeira Pera sadia (a, b), infectada pelo isolado fraco CTV-IAC (c, d) e infectada pelo isolado forte CTV-Barão B (e,f). Observar a maior intensidade da reação no material infectado pelo isolado severo.

Fig 13. Fluorescência observada, com diferentes combinações de luz de excitação/emissão, em limão 'Galego'. (A) e (B), infecção por isolado severo de CTV "Barão B". (A) com excitação por luz UV; (B) com excitação por luz azul. Em (A) pode-se observar a depressão (seta) do xilema que contém material que fluoresce amarelo com luz azul (B). Quando sadio (C) ou infectado pelo isolado fraco Galego 50 (D), não se observa alteração na fluorescência na região do floema e do câmbio vascular.

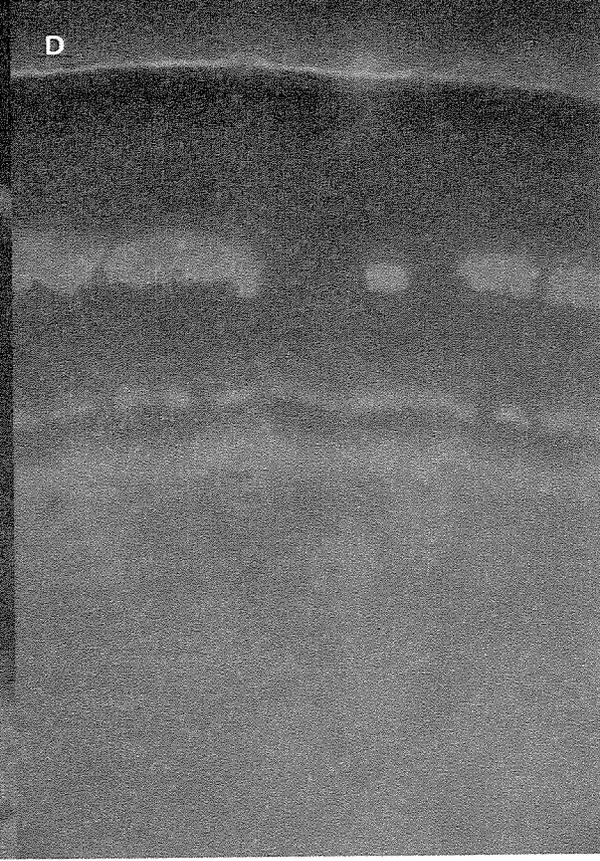
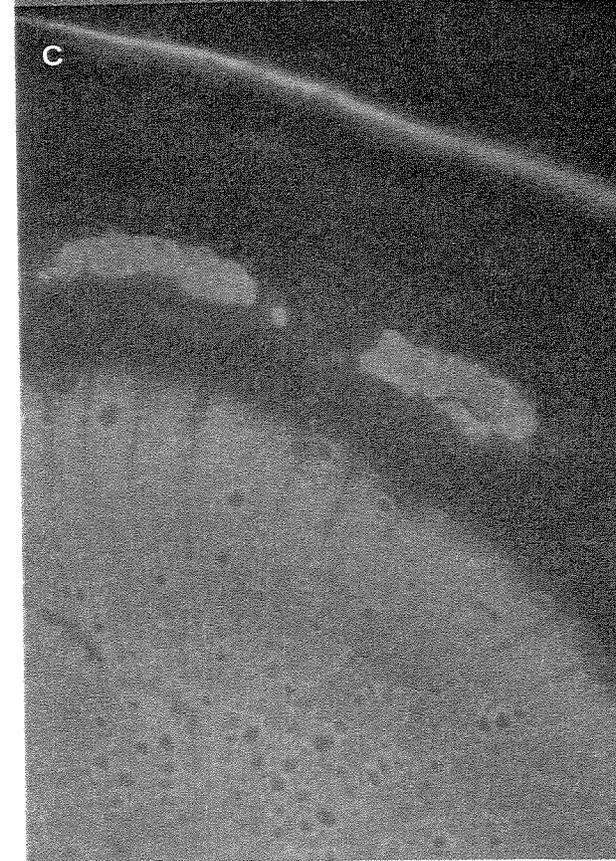
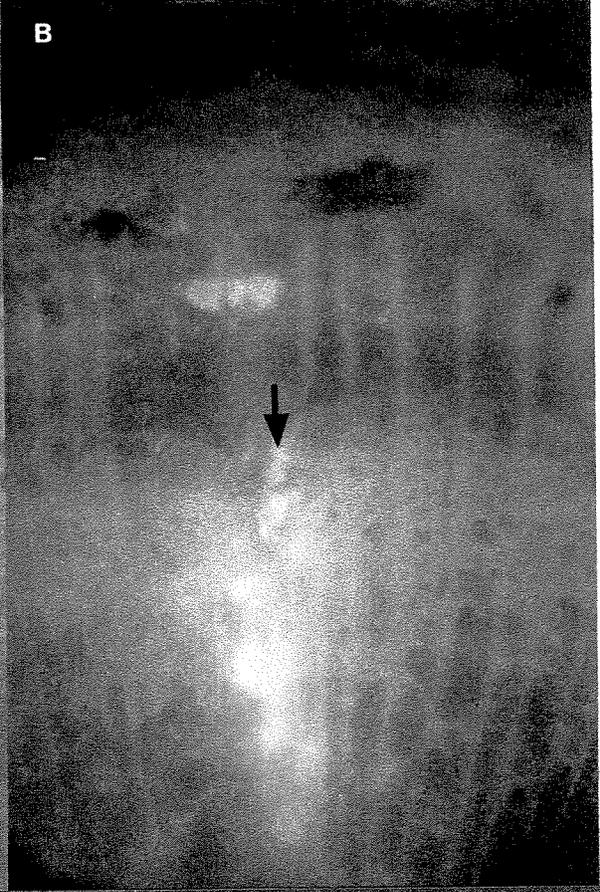
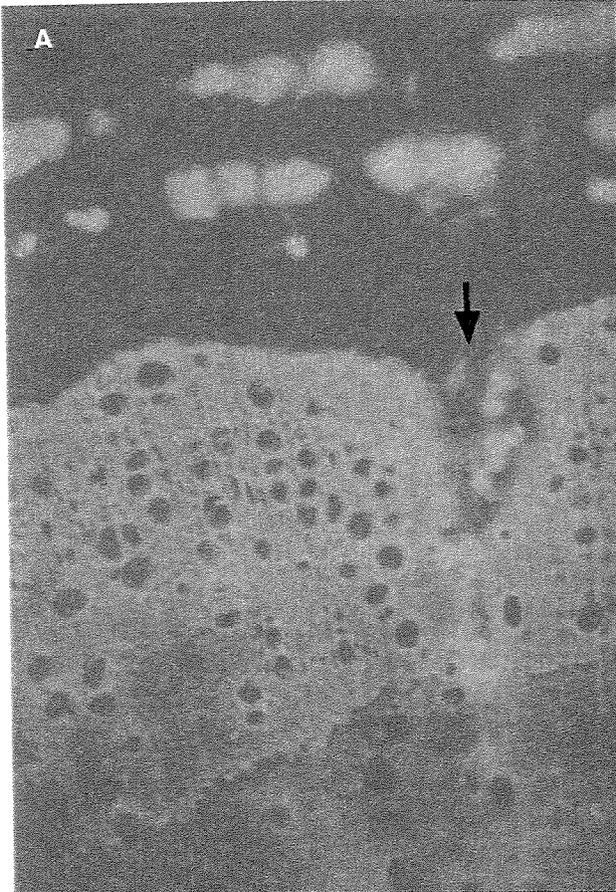
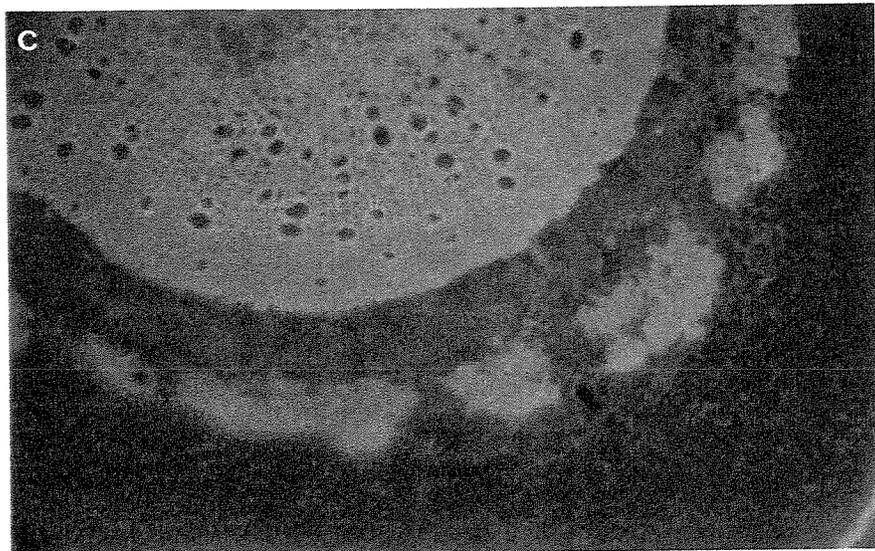
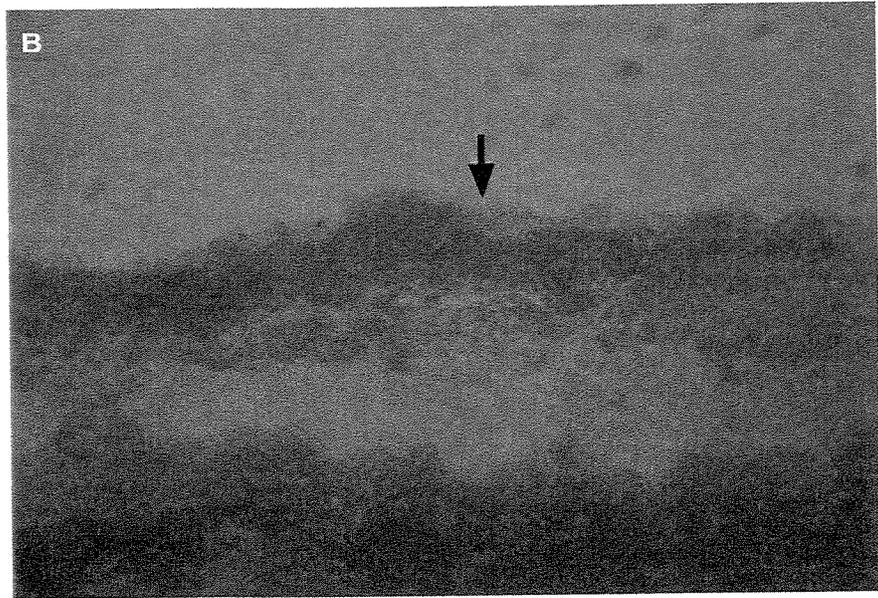
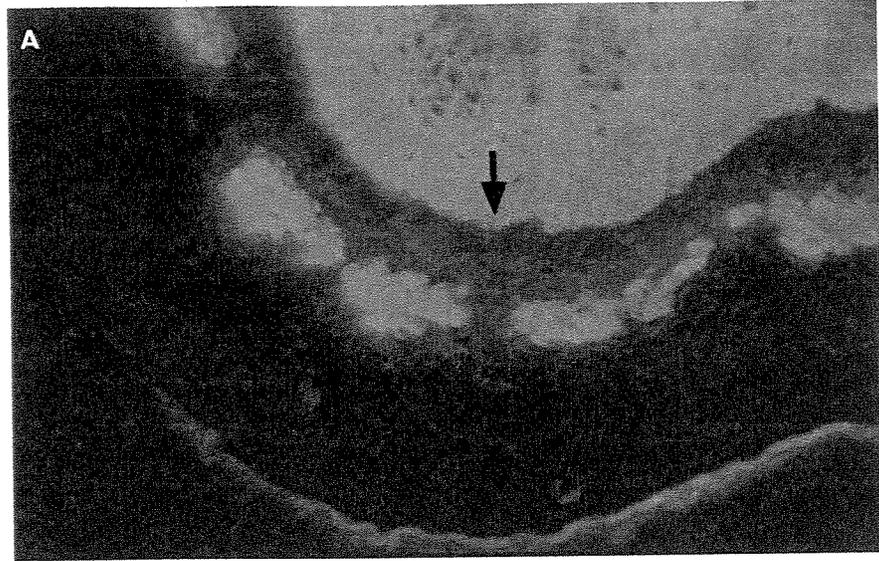


Figura 14. Fotomicrografias obtidas por epi-fluorescência utilizando excitação por UV, em cortes transversais de ápices caulinares de laranjeiras 'Pera'. (A) infectada pelo isolado severo CTV-Barão B; (B) infectada pelo isolado severo CTV-Pera Rio; (C) sadia. Observar o acúmulo de material fluorescente verde na região do câmbio vascular, nos materiais com isolados severos do CTV.



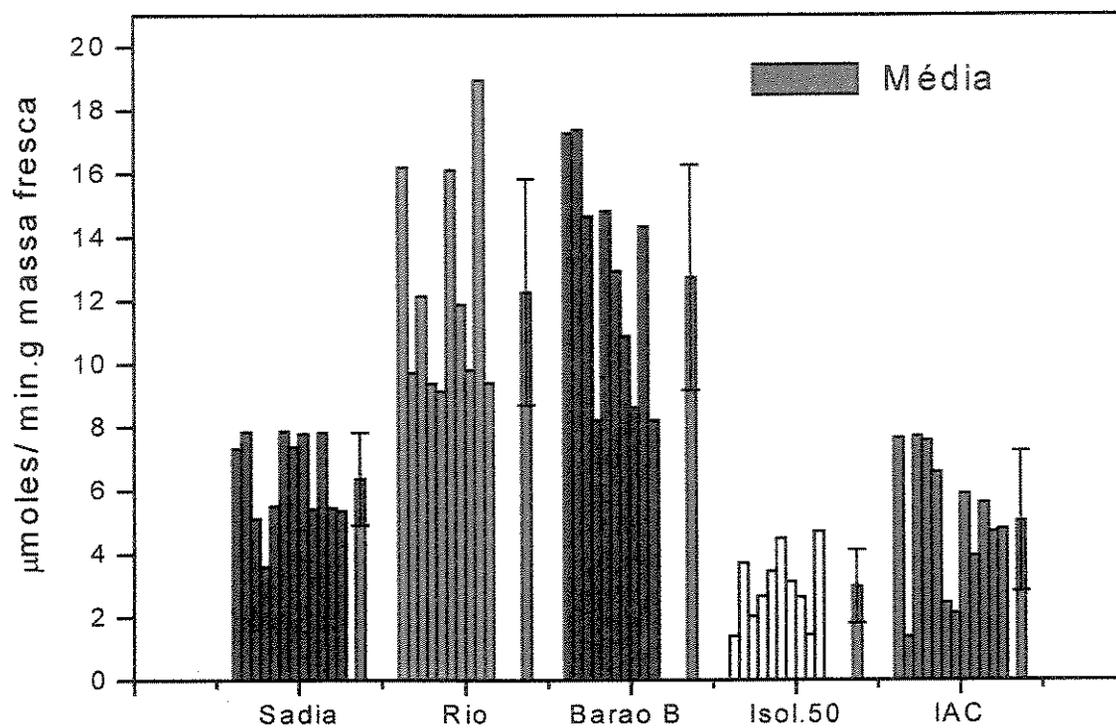


Figura 15. Atividade da PAL em plantas de laranja 'Pera' infectadas com isolados fortes do CTV (Pera Rio e Barão B) e isolados fracos (Galego 50 e Pera IAC). Como controle foram usadas plantas de laranja 'Pera' sadias. Barras verticais representam desvio padrão.

4.2.3. Atividade de cinamil – álcool desidrogenase

As plantas mostraram baixa atividade da CAD em todos os tratamentos, utilizando-se coniferaldeído como substrato. A figura 16 mostra os resultados das médias das atividades da enzima obtidas em cada tratamento. Não foram observadas diferenças em relação à atividade da enzima CAD entre as plantas infectadas com os diferentes isolados do CTV e plantas sadias.

4.3. Análise de ácido salicílico total

O conteúdo de ácido salicílico foi mais elevado somente nas plantas infectadas pelos isolados severos do CTV. A figura 17 mostra que o conteúdo obtido para os isolados severos Pera Rio e Barão B foi de 1,36 e 2,1 $\mu\text{g SA/ g}$ massa fresca, respectivamente, enquanto que para as plantas controle o conteúdo foi de 1,0 $\mu\text{g SA/ g}$ massa fresca. Já para os isolados fracos IAC e Galego 50, o conteúdo foi de 0,78 e 0,48 $\mu\text{g SA/ g}$ massa fresca, respectivamente. O isolado severo Barão B apresentou teores de SA 2 vezes mais elevados que o de plantas sadias e 2,7 e 4,4 vezes maiores que os de isolados fracos Pera IAC e Galego 50, respectivamente. Plantas infectadas pelo isolado severo Pera Rio também apresentaram aumentos significativos no teor de SA sendo 1,4 vezes mais elevado que o de plantas sadias e 1,7 e 2,8 vezes maiores que os de isolados Pera IAC e Galego 50, respectivamente. Por outro lado, as plantas infectadas pelos isolados fracos apresentaram uma queda significativa desse metabólito, principalmente o isolado Galego 50 do vírus.

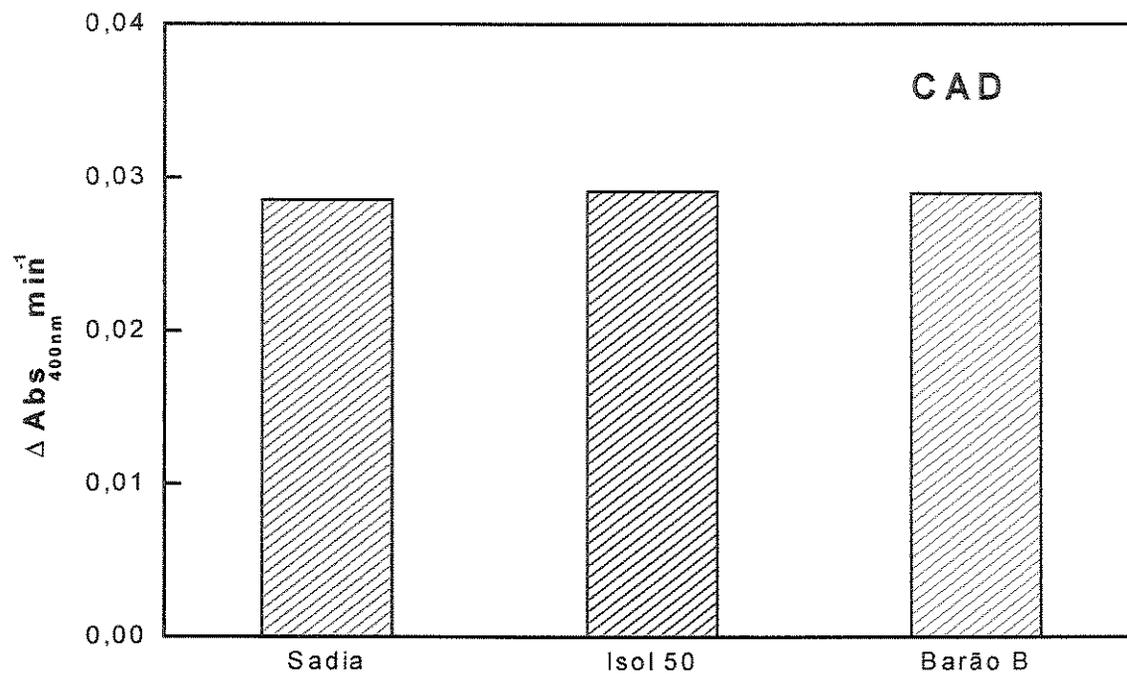


Figura 16. Média da atividade da enzima CAD em amostras de laranja 'Pera' infectadas com o isolado severo do CTV (Barão B) e isolado fraco (Galego 50), comparados com plantas de laranja 'Pera' sadias.

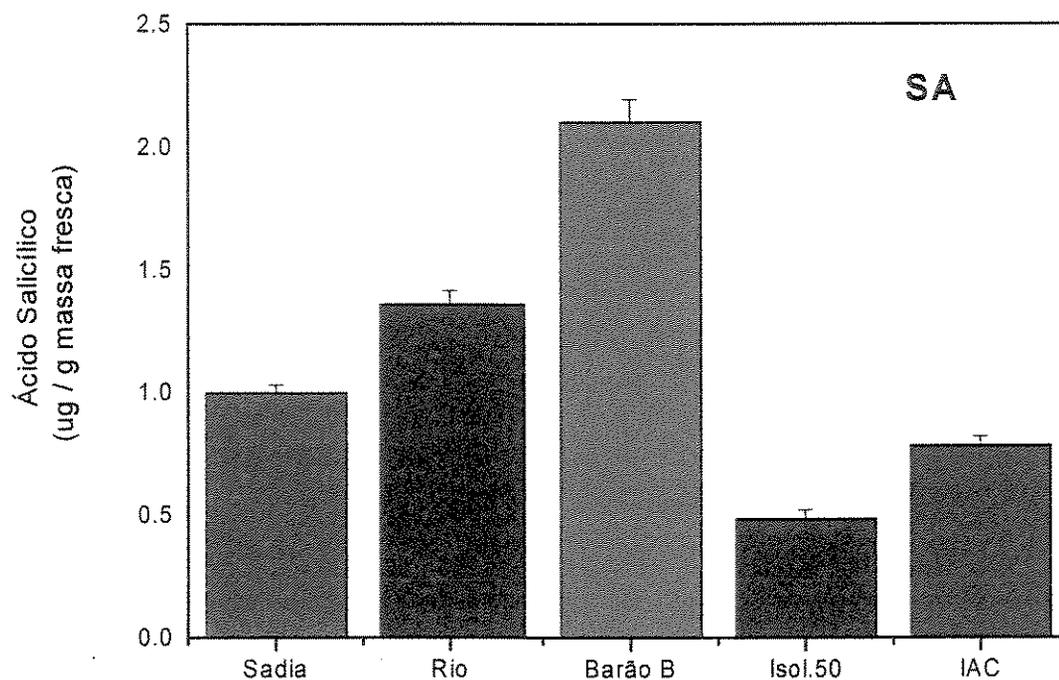


Figura 17. Conteúdo de ácido salicílico total em plantas de laranja 'Pera' infectadas com isolados fortes do vírus da tristeza dos citros (Pera Rio e Barão B) e isolados fracos (Galego 50 e Pera IAC). Como controle foram usadas plantas de laranja 'Pera' sadias. Barras verticais representam desvio padrão.

5. Discussão

As plantas ao serem infectadas por patógenos desencadeiam uma ampla variedade de sinais, que operam através de diversas rotas metabólicas para produzir várias reações de defesa. Em adição à indução de defesa localizada, há também a indução de resistência sistêmica, onde um sinal é gerado no sítio de indução e transportado para outros órgãos, desencadeando eventos que levam à ativação de genes de resistência (Sticher *et al.*, 1997; Van Loon *et al.*, 1998). Trabalhos recentes têm sugerido substâncias e alguns mecanismos a elas associadas que podem ser interpretados como sinais biológicos (moléculas sinalizadoras), dentre as quais incluem-se ácido salicílico, jasmonatos, sisteminas, etileno e sinais elétricos (Hunt *et al.*, 1996; Lawton *et al.*, 1994; Leon *et al.*, 2001; Shualev *et al.*, 1995; Sticher *et al.*, 1997).

A síntese de compostos fenólicos através do metabolismo fenilpropanóide envolve uma seqüência de reações reguladas por enzimas (Apêndice I). Fenilalanina amônia-liase é a enzima que inicia a biossíntese de compostos fenólicos e, portanto, ela é crítica em determinar o fluxo através da rota fenilpropanóide e a taxa de produção dos compostos fenilpropanóides (Jones, 1984; Dong *et al.*, 1991). Essa rota por sua vez, é responsável pela produção de moléculas envolvidas no processo de defesa por parte das plantas. Numerosos fatores (etileno, luz, substâncias, injúria) afetam a síntese ou ativação dessa enzima (Jones, 1984; Wheten & Sederoff, 1995). O aumento na atividade da PAL geralmente está correlacionado com a ativação de mecanismos de defesa, frente ao estresse causado por agentes bióticos ou abióticos. Um esquema relacionando os resultados obtidos no presente trabalho é proposto na figura 18.

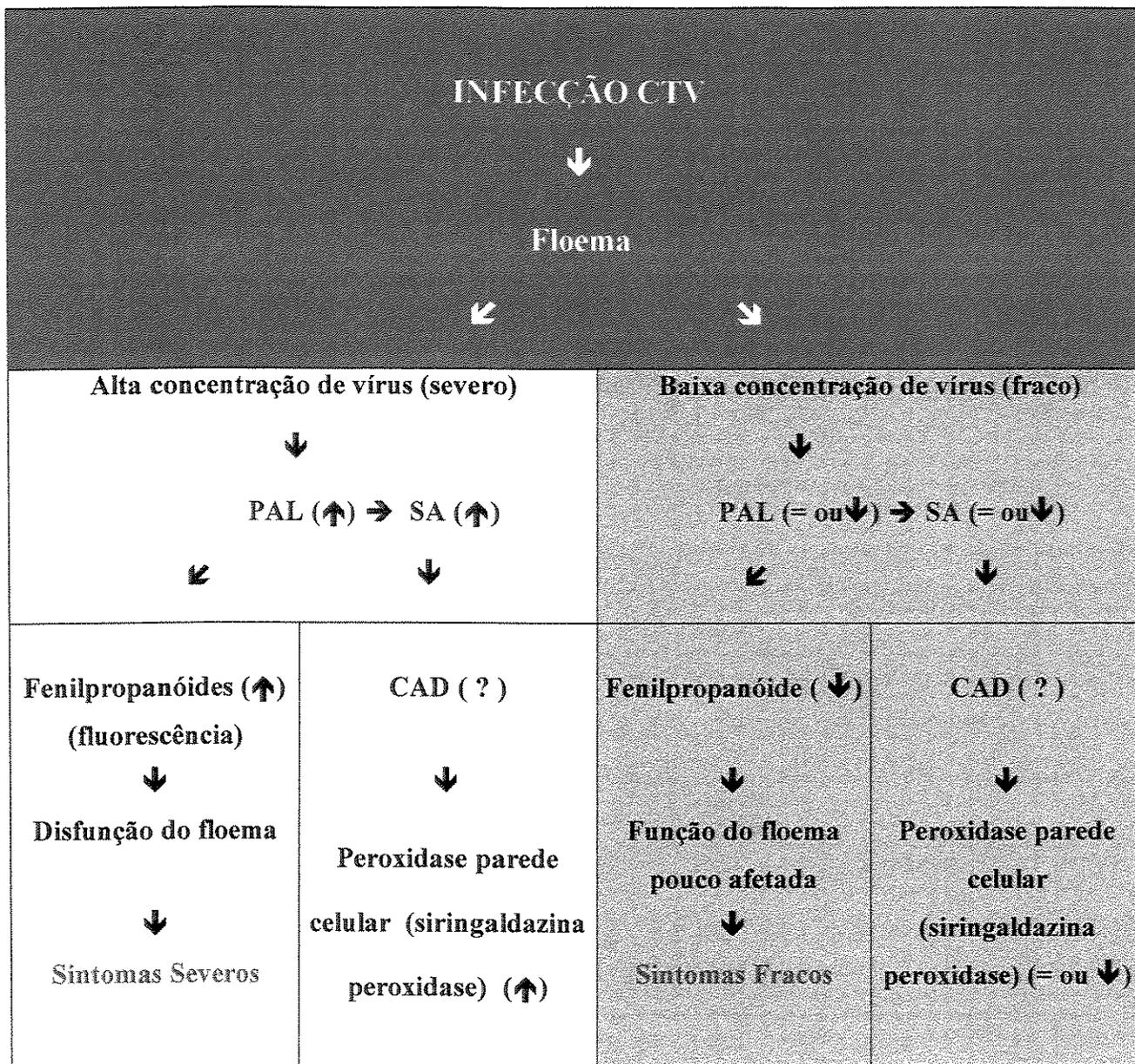


Figura 18. Esquema proposto para a interpretação dos resultados obtidos no presente trabalho.

A PAL teve sua atividade aumentada em plantas de laranja ‘Pera’ infectadas com os isolados severos do CTV (Barão B e Pera Rio), mas não em plantas infectadas com os isolados fracos (Pera IAC e Galego 50) e plantas sadias. Uma provável explicação seria que os isolados

severos do CTV ao infectarem as células do parênquima e células companheiras do floema, atingiram uma concentração alta nesses tecidos, o que levou a um aumento na síntese de fenilpropanóides. Por outro lado, os isolados fracos do vírus apresentaram uma concentração mais baixa de partículas virais nesses tecidos, não aumentando a produção de fenilpropanóides ou mesmo apresentando uma redução na síntese dos mesmos. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que as partículas do CTV só puderam ser detectadas após 30 dias da inoculação por enxertia nos quatro isolados analisados através de DAS-ELISA. A concentração de partículas virais aumentou com o tempo, deixando evidente que a multiplicação do vírus estava ocorrendo. Os valores de absorvância obtidos para os isolados severos (Pera Rio e Barão B) foram sempre maiores em relação aos isolados fracos (Pera IAC e Galego 50), chegando a dobrar o valor após 60 dias da enxertia. Targon (1997), trabalhando com os isolados fraco (Pera IAC) e severo (Barão B) do CTV em diferentes hospedeiras, verificou, através de análises de “Western-Blot”, que quando plantas de laranja ‘Pera’ foram infectadas com o isolado fraco, o vírus pôde ser detectado a partir do 15º dia após a enxertia das borbulhas contaminadas, enquanto que o isolado severo Barão B foi detectado aos 20 dias após a enxertia. Essa diferença obtida em relação ao presente trabalho deve-se, provavelmente, às diferentes metodologias utilizadas para avaliar a multiplicação do CTV. Sendo ELISA um teste quantitativo, os resultados aqui obtidos deixam claro que os isolados severos do CTV atingem uma maior concentração de partículas virais nas plantas, em relação aos isolados fracos do vírus.

A enzima PAL tem sua atividade aumentada em várias reações típicas de resistência e após o tratamento com vários elicitores de reações de defesa (Stadnick, 1999). Em *Arabidopsis* o gene que codifica para a PAL é ativado logo após a inoculação com *Pseudomonas* (Dong *et al.*, 1991). Esse gene é um dos marcadores usados para estudar a ativação gênica durante a resistência adquirida (Wobbe & Klessig, 1996). Além disso, a

inibição da PAL *in vivo* por inibidores específicos, reduz a resistência em várias plantas (Carver *et al.*, 1994; Mauchi-Mani & Slusarenko, 1996). AOPP (α -Amino- β -phenyl propionic acid), inibe competitivamente a enzima PAL, que cataliza o primeiro passo no metabolismo fenilpropanóide, isto é, a conversão de fenilalanina para ácido cinâmico. Conseqüentemente, a inibição da PAL afeta todos os caminhos subsequentes da síntese de compostos fenólicos (Carver *et al.*, 1991).

Em plantas, o ácido salicílico é provavelmente produzido a partir de fenilalanina, que por sua vez é convertida em ácido trans-cinâmico pela enzima PAL (Yalpani *et al.*, 1993). No presente trabalho é muito provável que o aumento na atividade desta enzima tenha estimulado a biossíntese de ácido salicílico, uma vez que o SA é um dos produtos da rota dos fenilpropanóides. De fato o conteúdo de SA é mais elevado somente nas plantas infectadas pelos isolados severos do CTV, mostrando a associação entre os fenômenos. É possível que o ácido salicílico, que atua como molécula sinalizadora, esteja envolvido na transdução de sinal pela planta, induzindo aumento da atividade da siringaldazina peroxidase, relacionada com o passo final da lignificação da parede celular (Pox-lig). Pouco se conhece sobre a forma que os sinais atuam ativando genes e desencadeando reações de defesa em plantas. O uso de plantas transgênicas especificamente transformadas para a super-expresssão de certos genes nela introduzidos, tem sido uma ferramenta útil (Romeiro & Kimura 1997). *Pseudomonas putida* possui genes que codificam a síntese da enzima salicilato-hidroxilase. Esta enzima está envolvida com o metabolismo de naftaleno e também na conversão de SA em catecol. Plantas de tomateiro e de *Arabidopsis* transformadas pela inserção desses genes, exibem baixos níveis de SA nos tecidos e a resistência sistêmica não se expressa, quando tentativas de indução são realizadas (Sticher *et al.*, 1997). Segundo esses mesmos autores, um fato ainda controverso é se SA é um sinal para a síntese de si mesmo (SA endógeno por síntese de redundância) ou se um sinal secundário existe e se transloca para levar a mensagem de síntese de SA endógeno a

locais distantes. Entretanto, há relatos de que certos derivados de SA podem assumir essa função (Shualev *et al.*, 1997).

Em células vegetais, as peroxidases têm sido detectadas em vacúolos, tonoplastos e plasmalema, bem como dentro da parede celular (Gaspar *et al.*, 1982). Elas podem ser divididas em um grande número de isoenzimas, cuja função precisa parece incerta. Elas participam de muitas reações incluindo lignificação, ligações dos polissacarídeos de parede celular, oxidação do ácido 3-indolacético, regulação do alongamento celular e oxidação de fenóis (Gaspar *et al.*, 1991). Peroxidases de parede celular (Pox-lig) têm sido descritas como agentes catalíticos do último passo da biossíntese de lignina, a oxidação de cinamil alcoóis (Harkin & Obst, 1973; Boudet *et al.*, 1995). A atividade de Pox-lig está correlacionada com a taxa de biossíntese de lignina (Mc Dougall, 1992; Rever & Gaspar, 1985). A síntese de fenilpropanóides e peroxidação são aumentadas em folhas de trigo pela infecção com patógenos (Southerton & Deverall, 1990). O presente estudo mostra que a atividade da guaiacol peroxidase extraída de forma convencional não apresenta correlação com a severidade do isolado de CTV. Somente quando a extração desta enzima é realizada de forma a separar a atividade presente na parede celular, observa-se correlação entre atividade e severidade do CTV: os isolados mais severos aumentam significativamente a atividade e os fracos a diminuem ou não a modificam. Quando se utiliza como substrato siringaldazina, sendo a atividade detectada ligada à lignificação da parede celular, verifica-se boa correlação com a severidade do isolado de CTV presente na planta.

A figura 8 mostra claramente que as plantas infectadas pelos isolados severos do CTV apresentam atividade de Pox-lig aumentada em relação as plantas sadias ou plantas infectadas pelos isolados fracos do vírus. As diferenças observadas na atividade de siringaldazina peroxidase são de tal magnitude que esta poderia ser considerada na prática como um parâmetro bastante significativo para diferenciação de isolados severos e fracos de CTV. Do

ponto de vista fisiopatológico a lignificação é parte dos mecanismos de defesa da planta contra diversos patógenos. Embora no caso dos vírus a lignificação não pareça ter nenhum efeito inibitório, é também desencadeada pela infecção viral. Aparentemente a intensidade dessa resposta é diretamente proporcional à severidade do isolado viral. Isto leva à idéia aparentemente paradoxal, de que a severidade do isolado viral é devida à intensidade da resposta defensiva da planta hospedeira.

A localização da atividade siringaldazina peroxidase, através de imuno-localização em membranas de nitrocelulose, mostra que esta enzima ocorre nos mesmos tecidos onde é localizado o vírus, pelo método de imuno-localização. Também é possível observar que a intensidade da coloração, proporcional à atividade enzimática, está correlacionada à área ocupada pelo vírus, delimitada pelo procedimento de imuno-localização. Esta área é sempre maior nos materiais com isolados severos, ao passo que é maior também a intensidade de reação da siringaldazina peroxidase, em relação aos materiais sadios ou com isolados fracos.

A alteração da auto fluorescência observada em cortes de caule, mostra o início da formação de fendas no lenho. Esta fase visível ao microscópio de fluorescência, representa o início de formação de fendas visíveis a olho nu, quando retirada a casca do caule, denominadas caneluras ("stem-pitting"). As caneluras constituem um sintoma típico de isolados severos de CTV, mas que só são visíveis após 1-2 anos de crescimento da planta. O acúmulo de material fluorescente amarelo na região onde se forma a fenda, coincidente com a presença viral e aumento da atividade de peroxidase (Pox-lig), indicam a clara associação deste sintoma com o vírus na sua forma severa.

A caracterização eletroforética num dos sistemas de eletroforese utilizados, em gel alcalino (pH 8,3) com carbazole como substrato genérico para peroxidases, mostrou uma banda adicional de peroxidase citoplasmática nos materiais infectados com isolados severos. Neste mesmo sistema não foi detectada nenhuma atividade siringaldazina peroxidase (dados

não mostrados). No sistema de gel ácido (pH 4,5) foi possível detectar, nos materiais infectados com isolados severos, uma banda com atividade siringaldazina peroxidase que corresponde a uma banda com intensa atividade guaiacol peroxidase. Esta banda não tem correspondência com as bandas de guaiacol peroxidase observadas nos materiais sadios ou com isolados fracos.

Através de HPLC em coluna mono-Q foi obtido um pico adicional de atividade guaiacol peroxidase, somente em plantas infectadas com isolados severos, com tempo de retenção menor (16-17 min) que o da peroxidase detectada em plantas sadias ou infectadas (19-21 min). Estes resultados indicam o aparecimento de uma proteína com atividade peroxidásica nos materiais infectados por isolados severos. Isto poderia ocorrer através de síntese *de novo* (ativação gênica) ou por ativação de proteína preexistente (Goldberg *et al.*, 1983).

Cinamil álcool desidrogenase (CAD) é uma enzima que é específica para a síntese de cinamil alcoóis que são precursores da síntese de lignina. Esta enzima é potencialmente capaz de atuar em três diferentes substratos (coniferaldeído, sinapaldeído e p-coumaraldeído), correspondendo a três monômeros de lignina. No presente trabalho, utilizando-se coniferaldeído como substrato, as plantas de citros apresentaram uma baixa atividade da enzima que não foi significativamente estimulada pela infecção com os diferentes isolados do CTV. Provavelmente a atividade da CAD não é limitante para o processo de lignificação em citros. Carver (1994) mostrou que a inibição da CAD em folhas de aveia diminuiu a resistência a Oídios, sugerindo que essa enzima ou os produtos formados numa etapa posterior na rota da síntese de lignina podem contribuir para resistência. Por outro lado, Zhang *et al.* (1997) não encontraram acúmulo de transcripto para CAD em plantas de aveia e cevada infectadas com Oídios e sugeriram que a regulação transcricional desse gene pode não estar envolvida na resposta da planta. Stadnik (1999), mostrou que folhas de trigo apresentaram uma baixa atividade da enzima CAD, a qual não foi estimulada nem com o uso de indutor de

resistência BTH (benzo (1,2,3) thiadiazole -7- carbothioic acid S- methyl ester), nem pela inoculação do fungo *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici* (*Bgt*). Usando (OH-PAS), inibidor específico da atividade da CAD, não houve alteração na eficiência de penetração do fungo.

5.1. Discussão geral do esquema proposto

O CTV ao infectar as células do parênquima e células companheiras do floema se multiplica e invade esses tecidos. Conforme os resultados obtidos nos testes de DASI-ELISA (Tab.1) os isolados severos atingem uma alta concentração de partículas nesses tecidos (os valores de absorvância no teste DASI-ELISA atingem, na infecção por isolados severos, o dobro do observado nos isolados fracos). Este fato é provavelmente um dos fatores que induz um aumento na atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) que é a primeira enzima da rota da síntese de compostos fenilpropanóides e é enzima chave que determina o fluxo e a taxa da produção de fenilpropanóides (Jones, 1984). O aumento na atividade da enzima PAL desencadeia uma série de eventos em cascata, ocorrendo concomitantemente. Como o conteúdo de ácido salicílico aumentou somente nos isolados severos do CTV, é bastante provável que a PAL tenha estimulado sua biossíntese uma vez que esse composto hormonal é sintetizado a partir de fenilalanina (Yalpani *et al.*, 1993). Paralelamente o aumento na atividade da enzima PAL, gerando um aumento na biossíntese de compostos fenilpropanóides, pode ser a causa do acúmulo de material fluorescente observado nos ensaios de microscopia de fluorescência. Este fato poderia estar relacionado com a disfunção do floema das plantas infectadas pelos isolados severos do vírus, já que o acúmulo de compostos fenólicos precede a morte celular. Isto explicaria a correlação observada entre severidade dos sintomas e aumento de atividade da PAL.

Provavelmente o aumento de SA atua como sinal induzindo o aumento da atividade peroxidásica, que se observa nas plantas infectadas por isolados severos. A peroxidase associada à lignificação da parede teve sua atividade aumentada no material infectado pelos isolados severos do CTV. Esta correlação poderia estar relacionada com o aumento observado na concentração de SA, que atua como molécula sinalizadora (ou hormônio) que entre outros efeitos, induz o aumento da atividade de algumas peroxidases. O aumento da atividade da siringaldazina peroxidase mostra-se claramente relacionado às características patogênicas do isolado de CTV, podendo ser considerado um indicador bastante eficiente do grau de severidade do isolado.

6. CONCLUSÕES

1). A atividade de peroxidase associada à lignificação (Pox-lig) pode ser considerada na prática como um parâmetro bastante significativo para a diferenciação de isolados fracos e severos do CTV.

2). Plantas cítricas infectadas pelos os isolados severos do CTV apresentam atividade aumentada das enzimas PAL e POX, mas não de CAD.

3). Assim como PAL e POX, o conteúdo de ácido salicílico aumentou nas plantas inoculadas com os isolado severos do vírus, e diminuiu ou não modificou os teores do hormônio nas plantas infectadas com isolados os fracos.

4). Os isolados severos causam nas plantas disfunção do floema, observadas em microscopia de fluorescência como um acúmulo de material fluorescente na região do câmbio vascular.

5). Materiais ifectados por isolados severos apresentam uma proteína com atividade peroxidásica que pode ocorrer através de síntese *de novo* (ativação gênica) ou por ativação de proteína preexistente.

7. LITERATURA CITADA

- Agrios, G.N. 1998. Plant Pathology. Academic Press, London.
- Avdiushko, S.A.; Ye, X.S.; Kug, J. 1993. Detection of several enzymatic activities in leaf prints of cucumber plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 42: 441-454.
- Balamaran, K. & Ramakrishnan, K. 1980. Strain variation and crossprotection in citrus tristeza virus on acid lime. In: Proc. 8th Conf. Intern.Organ. Citrus Virol. Univ. California Press, Riverside, 60-68.
- Baptista C.R.; Vega, J.; Stach-Machado, D.R.; Targon, M.L.P.; Müller, G.W.; Machado, M.A. 1996. Método simplificado de purificação do vírus da tristeza dos citros e obtenção de anti-soro de alta especificidade. *Summa Phytopathologica*, 22: 234-238.
- Bar -Joseph, M. & Hull, R. 1974. Purification and partial characterization of sugar beet yellows virus. *Virology*, 62: 552- 562.
- Bar-Joseph, M.; Garnsey, S.M.; Gonsalves, D. 1980. The Closteroviruses: a distinct group of elongated plant viruses. *Adv. Virus Res.* 25: 93-168.
- Bar -Joseph, M.; Gumpf, D.J.; Dodds, J.A.; Rosner, A.; Ginzberg, I. 1985. A simple purification method for citrus tristeza virus and estimation of its genome size. *Phytopathology*, 75: 195-198.
- Bar -Joseph, M.; Loebenstein, G.; Cohen, J. 1970. Partial purification of viruslike particles associated with the citrus tristeza disease. *Phytopathology*, 60: 75-78.
- Bar-Joseph, M.; Garnsey, S.M.; Gonsalves, D.; Moscovitz, M.; Purcifull, D.E.; Clark, M.F.; Loebenstein, G. 1979. The use of Enzyme-Liked Immunosorbent Assay for detection of citrus tristetavirus. *Phytopathology*, 69: 190-194.
- Bar-Joseph, M.; Loebenstein, G.; Cohen, J. 1972. Further purification and characterization of threadlike particles associated with citrus tristeza disease. *Virology*, 50: 821-828.

- Bar-Joseph, M.; Loebenstein, G.; Cohen, J. 1976. Comparison of particle characteristics and cytopathology of citrus tristeza virus with other morphologically similar viruses. In: Proc. 7th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol. Univ. California Press, Riverside, 39-46.
- Bar-Joseph, M.; Marcus, R.; Lee, R.F. 1989. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27: 291-316.
- Bennett C.W. & Costa, A.S. 1949. Tristeza disease of citrus. *Journal of Agricultural Research.* 8: 207-237.
- Bitancourt, A.A. 1940. A doença dos citros no Vale do Paraíba. *O Biológico*, 60: 268-269.
- Boudet, A.M.; Lapierre, C.; Grima-Pettenati, J. 1995. Biochemistry and molecular biology of lignification. *Tansley Review (80)*. *New Phytol.* 129: 203-236.
- Brlansky, R.H. & Lee, R.F. 1990. Numbers of inclusion bodies produced by mild and severe strains of citrus tristeza virus. *Plant Disease* 74: 297-299.
- Brlansky, R.H. 1987. Inclusion bodies produced in Citrus spp. by citrus tristeza virus. *Phytophylactica* 19: 211-213.
- Calavan, E.C.; Pratt, R.M.; Lee, B.W.; Hill, J.P.; Blue, R.L. 1972. Tristeza susceptibility of sweet orange on Troyer citrange rootstock. In: Proc. 5th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol. (W.C. PRICE, Ed.) Gainesville, Univ. Florida Press, 146-153.
- Cambra, M.; Moreno, P.; Navarro, L. 1991. Detección rápida del virus de la tristeza de los cítricos (CTV), mediante la técnica inmunoenzimática ELISA sandwich. *Anales INIA Ser. Prot. Veg.* 12: 115-125.
- Carver, T.L.W.; Robbins, M.P.; Zeyen, R.J. 1991. Effects of two PAL inhibitors on the susceptibility and localized autofluorescent host cell of oat leaves attacked by *Erysiphe graminis* DC. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39: 269-287.

- Carver, T.L.W.; Zeyen, R.J.; Robbins, M.P.; Vance, C.P. 1994. Suppression of host cinnamyl alcohol dehydrogenase and phenylalanine - ammonia lyase increases oat epidermal cell susceptibility to powdery mildew penetration. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 44: 243-259.
- Chen, C.; Bélanger, R.R.; Benhamou, N.; Paulitz, T.C. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 56: 13-23.
- Chen, Z.; Silva, H.; Klessig, D.F. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262: 1883-1886.
- Christensen, J.H.; Bauw, G.; Welinder, K.G.; Montagu, M.V.; Boerjan, W. 1998. Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. *Plant Physiol.* 118: 125-135.
- Cohen, Y.; Gisi, U.; Niederman, T. 1993. Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl-ester. *Phytopathology* 83: 1054-1062.
- Conti, G. G.; Vegetti, G.; Favali, M. A.; Bassi, M. 1974. Phenylalanine ammonia lyase and polyphenoloxidase activities correlated with necrogenesis in cauliflower mosaic virus infection. *Acta Phytopatol. Hung.* 9: 185-193.
- Costa, A.S.; Grant, T.J.; Moreira, S. 1949. Investigações sobre a tristeza dos citros. *Bragantia* 9: 58-80.
- Costa, A.S. & Müller, G.W. Tristeza control by cross-protection. 1980. A US-Brazil cooperative success. *Plant Disease.* 64: 538-541.
- Dawson, W.O. & Hilf, M.E. 1992. Host-range determinants of plant viruses. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 43: 527-555.
- Dodds, J.A. & Bar-Joseph, M. 1983. Double stranded RNA from plants infected with closteroviruses. *Phytopathology*, 73: 419-423.

- Dodds, J.A.; Jurupat, T.; Lee, J.G.; Roistacher, C.N. 1987. Effects of strain, host, time of harvest and virus concentration on double stranded RNA analysis of citrus tristeza virus. *Phytopathology*, 77: 442-447.
- Dodds, J.A.; Morris, T.J.; Jordan, R.L. 1984. Plant viral double-stranded RNA. *Ann. Rev. Phytopathol.* 22: 151-168.
- Doke, N. & Ohashi, Y. 1988. Involvement of oxygen generation system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32: 163-175.
- Dong, X.; Mindrions, M.; Davis, K.R.; Ausubel, F.M. 1991. Induction of *Arabidopsis* defense genes by virulent and avirulent *Pseudomonas syringae* strains and by a cloned avirulence gene. *Plant Cell* 3: 61-72.
- Enyedi, A.J.; Yalpani, N.; Silvermann, P.; Raskin, I. 1992. Localization, conjugation and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89: 2480-2484.
- Farmer, E.E. & Ryan, C.A. 1990. Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of National Academy of Science of the USA* 87: 7713-7716.
- Faulkner G.; Kimmins, W. C. 1976. Staining reactions of the tissue bordering lesions induced by wounding, tobacco mosaic virus, and tobacco necrosis virus in bean. *Phytopathology*, 65: 1390-1400.
- Fawcett, H.S. & Wallace, J.M. 1946. Evidence of the virus nature of citrus quick decline. *Calif. Citrogr.* 32: 88-89.
- Febres, V.J.; Pappu, S.S.; Rubio, L.; Aylon, M.A.; Moreno, P.; Guerri, J.; Lee, R.; Niblett, C.L. 1995. Single stranded conformational polymorphism enables the differentiation of citrus tristeza closterovirus strains. *Phytopathology*, 85: 1210.

- Fritig, B.; Legrand, M.; Gosse, J.; Hirth, L. 1973. Changes in phenylalanine ammonia lyase during the hypersensitive reaction of tobacco to TMV. *Virology*, 55: 371-379.
- Gaffney, T.; Friedrich, L.; Vernooij, B.; Negretto, D.; Nye, G.; Uknes, S.; Ward, E.; Kessmann, H.; Ryals, J. 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754-756.
- Garnsey, S.M.; Christie, R.G.; Derrick, K.S.; Bar-Joseph, M. 1980. Detection of citrus tristeza virus. II. Light and electron microscopy of inclusions and viral particles. In: Proc. 8th Conf. Intern. Organ Citrus Virol. Uni. California Press, Riverside, 9-15.
- Garnsey, S.M.; Civerolo, E.L.; Gumpf, D.J.; Yokomi, R.K.; Lee, R.F. 1991. Development of a worldwide collection of citrus tristeza virus isolates. Proc. Conf. Int. Org. Citrus Virol., 11th, 113-120.
- Garnsey, S.M.; Gonsalves, D.; Purcifull, D.E. 1979. Rapid diagnosis of citrus tristeza virus infections by sodium dodecyl sulfate immunodiffusion procedures. *Phytopathology*, 69: 88-95.
- Garnsey, S.M.; Gonsalves, D.; Purcifull, D.E. 1977. Mechanical transmission of citrus tristeza virus. *Phytopathology*, 67: 965-968.
- Garnsey, S.M.; Gumpf, D.J.; Roistacher, C.N.; Civerolo, E.L.; Lee, R.F.; Yokomi, R.K. 1987. Toward a standardized evaluation of the biological properties of citrus tristeza virus. *Phytophylactica*. 19: 151- 157.
- Gaspar, T.H.; Penel, C.; Hagege, D.; Greppin, H. 1991. Peroxidases in plant growth, differentiation and development process. In: Biochemical, molecular and physiological aspects of peroxidases (J. Lobarzewski; H. Greppin; C. Pennel; T.H. Gaspar, eds). University of Geneva, 29-280.

- Gaspar, T.H.; Penel, C.; Thorpe, T.; Greppin, H. 1982. Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. University of Geneva. Centre de Botanique, 324 p.
- Gillings, M.; Broadbent, P.; Indsto, J.; Lee, R. 1993. Characterization of isolates and strains of citrus tristeza closterovirus using restriction analysis of coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*. 44: 305-317.
- Goldberg, R.; Catesson, A. M.; Czaninski, Y. 1983. Some properties of syringaldazine oxidase, a peroxidase specifically involved in the lignification process. *Z. Pflanzenphysiol.* 267-279.
- Gonsalves, D.; Purcifull, D.E.; Garnsey, S.M. 1978. Purification and serology of citrus tristeza virus. *Phytopathology*, 68: 553-559.
- Grant, T.J. & Costa, A.S. 1948. A progress report on studies of tristeza disease of citrus in Brazil. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 1-14.
- Grant, T.J.; Costa, A.S.; Moreira, S. 1951. Tristeza disease of citrus in Brazil-other citrus diseases may be variations of more spectacular tristeza or quick decline. *Citrus leaves*, 31: 8-10, 36-37.
- Gressens, P. & Martin, J.R. 1994. In situ polymerase chain reaction of HSV-2 DNA sequences in infections of the nervous system. *J. Virol. Methods*. 46: 61-83.
- Grosskopf, D.G. & Boller, T. 1991. A yeast-derived glycopeptide elicitor and chitosan or digitonin differentially induce ethylene biosynthesis, phenylalanine ammonia-lyase and callose formation in suspension-cultured tomato cells. *J. Plant Physiol.* 138: 741-746.
- Guerri, J.; Moreno, P.; Lee, R.F. 1990. Identification of citrus tristeza virus strains by peptide maps of virion coat protein. (Abst). *Phytopathology*, 79.

- Gumph, D.J.; Bar-Joseph, M.; Dodds, J.A. 1981. Purification of citrus tristeza virus (CTV) on sucrose- cesium sulphate cushion gradients and estimation of its genome size. (Abst). *Phytopathology*, 71: 878.
- Gundlach, H.; Müller, M.J.; Kutchan, T.M.; Zenk, M.H. 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2389-2393.
- Halbrock, K. & Scheel, D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 40: 347-369.
- Hammerschmidt, R. & Kuc, J. 1982. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. *Physiol. Plant Path.* 20: 61-71.
- Harkin, J.M. & Obst, J.R. 1973. Lignification in trees: indication of exclusive peroxidase participation. *Science* 180: 296-298.
- Harkin, J.M. & Obst, J.R. 1973. Lignification in trees: indication of exclusive peroxidase participation. *Science* 180: 296-298.
- Holub, E.B.; Beynon, J.L.; Crute, I.R. 1994. Phenotypic and genotypic characterization of interactions between isolates of *Peronospora parasitica* and accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 7: 223-239.
- Hughes, W.A. & Lister, C.A. 1953. Lime dieback in the Gold Coast, a virus disease of the lime, *Citrus aurantifolia* (Christmann) Swingle. *J. Hort. Sci.* 28: 131-140.
- Hunt, M.D.; Neuenschwander, U.H.; Delaney, T.P.; Weimann, K.B.; Friedrich, L.B.; Lawton, K.A.; Steiner, H.Y.; Ryals, J.A. 1996. Recent advances in systemic acquired resistance research - a review. *Gene* 179: 89-95.
- Imberty, A.; Golberg, R.; Catesson, A.M. 1985. Isolation and characterization of *Populus* isoperoxidases involved in the last step of lignin formation *Planta* 164: 221-226.

- Jones, D.H. 1984. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. *Phytochemistry* 23: 1349-1360.
- Kimmins, W. C. & Wuddah, D. 1977. Hipersensitive resistance: Determination of lignin in leaves with a localized virus infection. *Phytopathology*, 67: 1012-1016.
- Kiraly, Z.; Klement, Z.; Solimosy, F.; Voros, J. *Methods in plant pathology*. 1970. Budapest: Akademia Kiadó, 509p.
- Kitajima, E.W.; Silva, D.M.; Oliveira, A.R.; Muller, G.W.; Costa, A.S. 1963. Threadlike particles associated with tristeza disease of citrus. *Nature*. 201: 1011-1012.
- Kloepper, J.W. 1996. Host specificity in microbe-microbe interactions. 1996. *BioScience* 46: 406-409.
- Kuc, J. & Richmond, S. 1977. Aspects of the protection of cucumber against *Colletotrichum lagenarium*. *Phytopathology* 67: 533-536.
- Lawton, K.A; Potter, S.L.; Uknes, S.; Ryals, J. 1994. Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. *Plant Cell* 6: 581-588.
- Lee, R.F. & Calvert, L.A. 1987. Polypeptide mapping of citrus tristeza virus strains. *Phytophylactica*, 19: 205-210.
- Lee, R.F.; Calvert, L.A.; Nagel, J.; Hubbard, J.D. 1988. Citrus tristeza virus: Characterization of coat proteins. *Phytopathology*, 78: 1221- 1226.
- Lee, R.F.; Garnsey, S.M.; Bransky, R.H.; Goheen, A.C. 1987. A purification procedure for enhancement of citrus tristeza virus yields and its application to other phloem-limited viruses. *Phytopathology* 77: 543-549.
- Lee, R.F.; Timmer, L.W.; Purcifull, D.E.; Garnsey, S.M. 1981. Comparison of radioimmunosorbent assay and enzyme linked immunosorbent assay for detection of rickettsialike bacteria and citrus tristeza virus (Abst.). *Phytopathology*, 889.

- Leon, J.; Rojo, E.; Sánchez-Serrano, J.J. 2001. Wound signalling in plants. *J. Exp. Bot.* 52 (354): 1-9.
- Lucas, J.A. 1999. Plant immunisation: from myth to SAR. *Pesticide Science* 55: 193-196.
- Machenko, G.P. 1994. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels, CRC Press, Boca Raton, 341p.
- Madamanchi, N.R. & Kuc, J. 1991. Induced systemic resistance in plants. In: Cole, H.C.; Hoch, H.C. (Eds.). *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. New York, Plenum Press, 347-362.
- Madamanchi, N.R. & Kuc, J. 1991. Induced systemic resistance in plants. In: *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. (G.T. Cole; H.C. Hoch, eds), Plenum, New York, pp. 347-362.
- Malamy, J.; Carr, J.P.; Klessig, D.F.; Raskin, I. 1990. Salicylic acid a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250: 1002-1004.
- Mauch, F.; Hadwiger, L.A.; Boller, T. 1984. Ethylene: symptom, not signal for the induction of chitinase and β -1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. 1984. *Plant Physiol.* 76: 607-611.
- Mauch-maní, B. & Slusarenko, A. J. 1996. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* 8: 203-212.
- Maule, A. J. & Ride, J. P. 1976. Ammonia-lyase and o-methyltransferase activities related to lignification in wheat leaves infected with *Botrytis*. *Phytochemistry*, 15: 1661-1664.
- McClellan, A.P.D. 1974. The tristeza virus complex. *Proc. Conf. Int. Org. Citrus Virol.*, 6th, 59-66.
- McConn, M.; Creelman, R.A.; Bell, E.; Mullet, J.E.; Browse, J. 1997. Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 5473-5477.

- McDougall, G.J. 1992. Changes in cell wall-associated peroxidases during the lignification of flax fibres. *Phytochem.* 31: 3385-3389.
- Mehdy M.C.; Sharma, Y.K.; Sathasivan, K.; Bays, N.W. 1996. The role of activated oxygen species in plant disease resistance. *Physiol. Plant.* 98: 365-374.
- Mehdy, M. 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* 105: 467-472.
- Meneghini, M. 1946. Sobre a natureza e transmissibilidade da doença "tristeza" dos citros. *O Biológico*, 12: 285-287.
- Métraux, J.P.; Signer, H.; Ryals, J.; Ward, E.; Wiss-Benz, M.; gaudin, J.; Raschdorf, K.; Schimidt, E.; Blum, W.; Inverardi, B. 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250: 1004-1006.
- Mitchell, H.J.; Hall, J.L.; Barber, M.S. 1994. Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehidrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Plant Physiol.* 104: 551-556.
- Müller, G.W. & Costa, A.S. 1993. Doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros. In: Rossetti, V.; Müller, G.W.; Costa, A.S.(Eds.). *Doenças dos citros causadas por algas, fungos, bactérias e vírus*. Fundação Cargill, 55-84.
- Müller, G.W. & Costa, A.S. 1997. Tristeza control in Brazil by preimmunization with mild strains. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 3: 868-872.
- Müller, G.W. & Garnsey, S.M. 1984. Susceptibility of citrus varieties, species, citrus relatives and non-rutaceous plants to slash-cut mechanical inoculation with citrus tristeza virus. In: *Proc. 9th Conf. Intern. Organ Citrus Virol.* Univ. California Press, Riverside, 33-40.
- Müller, G.W.; Vega, J.; Teófilo Sobrinho, J.; Pompeu Jr, J. ; Nagai, V.; Costa, A.S. 1991. Resultados satisfatórios da premunização em pomelo Marsh seedless. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 13: 143-148.

- Nagel, J.; Hirbert, E.; Lee, R.F. 1982. Citrus tristeza virus RNA translated with a rabbit reticulocyte lysate: capsid protein identified as one of the products. (Abst.). *Phytopathology*, 72: 953.
- Nakashima, J.; Awano, T.; Takabe, K.; Fujita, M.; Saiki, H. 1997. Immunocytochemical localization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamyl alcohol dehydrogenase in differentiating tracheary elements derived from *Zinnia* mesophyll cells. *Plant Cell Physiol.* 38(2): 113-127.
- Neuenschwander, U.; Friedrich, L.; Delaney, T.; Vernooij, B.; Kessmann, H.; Ryals, J. 1995. Activation of plant disease resistance. *Aspects of Applied Biology* 42: 217-225.
- Oberholzer, P.C.J.; Mathews, I.; Stilmie, S.F. 1949. The decline of grapefruit trees in South Africa. A preliminary report on so-called "stem-pitting". *Sci. Bull. Dep. Agric. S. Afr.* 287, 17p.
- Oliveira, A.R. 1964. Serologia com o vírus da tristeza dos citros (Resumo). *Ciência e Cultura*, 16: 146.
- Oliveira, A.R.; Muller, G.W.; Costa, A.S. 1969. Serology of citrus tristeza virus (Abst.). In: 5th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol. Japan, 66.
- Orozco-Cárdenas, M. & Ryan, C.A. 1999. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 6553-6557.
- Pascholati, S.F.; Nicholson, R.L.; Butler, L.G. 1986. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. *J. Phytopathol.* 115: 165-172.
- Peyrano, G.; Taleisnik, E.; Quiroga, M.; Forchetti, S.M.; Tigier, H. 1997. Salinity effects on hydraulic conductance, lignin content and peroxidase activity in tomato roots. *Plant Physiol. Biochem.* 35 (5), 387-393.

- Pieterse, C.M.; Van Den Wees, S.C.M.; Van Pelt, J.A. Knoester, M.; Laan, R.; Gerrits, N.; Weisbeek, P.J.; Van Loon, L.C. 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1571-1580.
- Price, M.; Schell, J.; Grosser, J.; Pappu, S.S.; Pappu, H.R.; Febres, V.; Manjunath, K.L.; Niblett, C.L.; Derrick, K.S.; Lee, R.F. 1996. Replication of citrus tristeza closterovirus in citrus protoplasts. *Phytopathology* 86: 830-833.
- Price, W.C. 1966. Flexuous rods in phloem infected cells of lime plants infected with citrus tristeza virus. *Virology*, 29: 285-294.
- Price, W.C. 1968. Review of research on mechanical transmission, purification and morphology of citrus viruses. In: J.F.L. Childs, (Ed.). *Proc. 4th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol*, Univ. Florida Press, Gainesville, 248- 255.
- Ride, J. P. 1978. The role of cell wall alterations in resistance to fungi. *Ann. Appl.Biol.* 89: 302-306.
- Roistacher, C.N. & Bar-Joseph, M. 1987. Transmission of citrus tristeza virus (CTV) by *Aphis gossypii* and by graft inoculation to and from *Passiflora* species. *Phytophylactica*, 19: 178-182.
- Romeiro R.S. & Kimura, O. 1997. Induced resistance in pepper leaves infiltrated with purified elicitors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Phytopathol.* 145: 495-498.
- Rosner, A. & Bar-Joseph, M. 1984. Diversity of citrus tristeza virus strains indicated by hybridization with cloned e DNA sequences. *Virology*, 139: 189-193.
- Rosner, A.; Ginzburg, I.; Bar-Joseph, M. 1983. Molecular cloning of complementary DNA sequences of citrus tristeza virus RNA. *J. Gen. Virol.* 64: 1757-1763.
- Ross, A.F. 1961. Systemic acquired resistance induced by localized virus infection. *Virology* 14: 340-358.

- Roth, R.; Boudet, A.M.; Pont-Lezica, R. 1997. Lignification and cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in developing stems of tomato and poplar: a spatial and kinetic study through tissue printing. *Journal of Experimental Botany*, 48 (307), 247-254.
- Schneider, H. 1959. The anatomy of tristeza-virus-infected citrus. In: *Citrus virus disease*, ed. J. M. Wallace. Berkeley, CA: Univ. Calif. Press. pp 73-84.
- Schneider, H., Bitancourt, A.A.; Rossetti, V. 1947. Similarities in the pathological anatomy of quick-decline and tristeza-diseased orange trees. *Phytopathology* 37: 845-846.
- Shah, J.; Tsui, F.; Klessig, D.F. 1997. Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (sai 1) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tms2* gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 69-78.
- Shulaev, V.; Leon, J.; Raskin, I. 1995. Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? *Plant Cell* 7: 1691-1701.
- Shulaev, V.; Silvermann, P.; Raskin, I. 1997. Methyl salicylate-an airborne signal in pathogen resistance. *Nature* 385: 718-721.
- Silva, D.M.; Oliveira, A.R.; Kitajima, E.W. 1965. Partial purification of tristeza virus. In: W.C. PRICE, (Ed.), *Proc. 3th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol.* Univ. Florida Press, Gainesville, 10-13.
- Southerton, S.G. & Deverall, B.J. 1990. Changes in phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activities in wheat cultivars expressing resistance to the leaf rust fungus. *Plant Pathology* 39: 223-230.
- Stadnik, M.J. 1999. Induction of resistance in wheat by benzothiadiazole derivative against the powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *Triticum*): practical aspects and mechanisms of action. Universität Hohenheim, Stuttgart, Alemanha, Tese de Doutorado.
- Sticher, L.; Mauchi-Mani, B.; Métraux, J.P. 1997. Systemic acquired resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 35: 235-270.

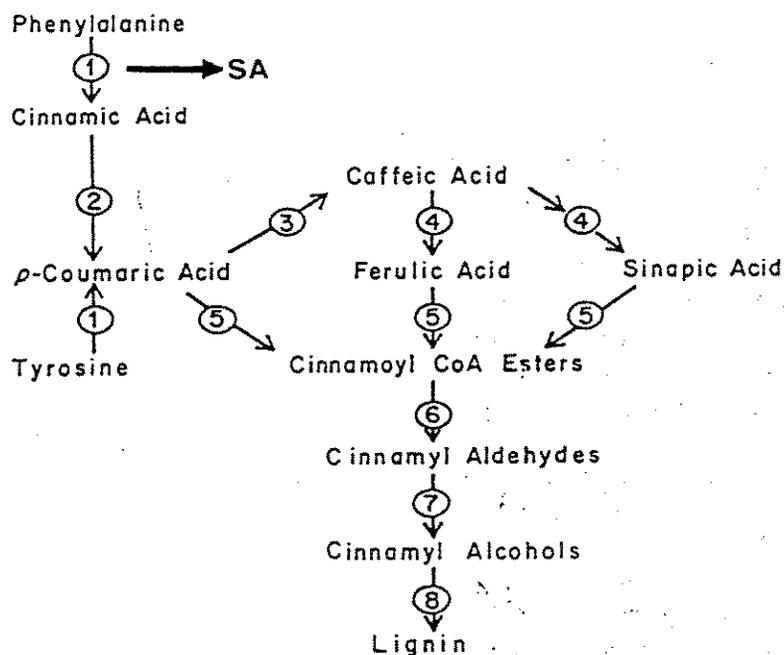
- Stumpf, P.K. & Conn, E.E.E. 1981. The biochemistry of plants - secondary plants products. New York: Academic Press, 798p.
- Targon, M.L.P.N. 1997. Expressão e análise do gene do capsídeo do vírus da tristeza de diferentes espécies e variedades de citros. 142p. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas.
- Tsuchizaki, T.; Sasaki, A.; Saito, Y. 1978. Purification of citrus tristeza virus from diseased citrus fruits and the detection of the virus in the citrus tissues by fluorescent antibody techniques. *Phytopathology*, 68: 139-142.
- Uknes, S.; Dincher, S.; Friedrich, L.; Negrotto, D.; Williams, S.; Thompson Taylor, H.; Potter, S.; Wards, E.; Ryals, J. 1992. Regulation of pathogenesis-related protein 1a gene expression in tobacco. *Plant Cell* 5: 159-169.
- Uknes, S.; Winter, A.; Delaney, T.; Vernooij, B.; Friedrich, L.; Morse, A.; Potter, S.; Ward, E.; Ryals, J. 1993. Biological induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 692-698.
- Van Loon, L.C. 1983. The induction of pathogenesis-related proteins by pathogens and specific chemicals. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 89: 265-273.
- Van Loon, L.C. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal Plant Pathology* 103: 753-765.
- Van Loon, L.C.; Bakker, P.A.H.M.; Pieterse, C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 36: 453-483.
- Vance, C. P.; Kirk, T. K.; Sherwood, R. T. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Ann. Rev. Phytopatol.* 18: 259-288.
- Vega, J.; Müller, G.W.; Cambra, M. 1993. Diferenciação de isolados brasileiros do vírus da tristeza dos citros através de anticorpos monoclonais. *Fitopatologia Brasileira*, 18: 273.

- Vela, C.; Cambra, M.; Cortes, E.; Moreno, P.; Miguet, J.G.; Perez De San Roman, C.; Sanz, A. 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for citrus tristeza virus and their use for diagnoses. *J. Gen. Virol.* 67: 91-96.
- Vernooij, B.; Friedrich, L.; Goy, R.A.; Staub, T.; Kessman, H.; Ryals, J. 1995. 2,6-Dichloroisonicotinic acid-induced resistance to pathogens without the accumulation of salicylic acid. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 228-234.
- Wallace, J .M. Virus and virlike diseases. 1978. In: Reuther, W.; Calavan, E.C.; Carman, G.E. (Eds.). *The Citrus Industry*, 4th vol. Univ. Calif. Div. Agr. Sci. Riverside, 67-184.
- Wallace, J. M. & Fawcett, H. S. 1947. Quick decline of oranges trees - a virus disease. *Science.* 105 :315-316.
- Wallace, J. M. 1968. Tristeza and seedling yellows. In: *Indexing procedures for 15 virus diseases of citrus trees.* Agriculture Handbook 333, USDA.
- Whenham, J.R.; Fraser, R.S.S.; Snow, A. 1985. Tobacco mosaic virus-induced increase in abscisic acid concentration in tobacco leaves: intracellular location and relationship to symptom severity and to extent of virus multiplication. *Physiol. Plant Pathol.* 3: 341-345.
- Whetten, R. & Sederoff, R. 1995. Lignin Biosynthesis. *The Plant Cell* 7: 1001-1013.
- White, R.F. 1979. Acetyl salicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* 99: 410-412.
- Woobe, K.K.; Klessig, D.F. 1996. Salicylic acid - a important signal in plants. In: *Signal transduction in plant growth and development* (E.S. Dennis; B. Hohn; T. Meins; J. Schell; D.P.S. Verma, eds) Springer-Verlag, Wien, New York, pp. 167-196.
- Wood, K. R. 1989. Physiological alterations. In: *Plant viruses. Vol.2, Pathology.* Mandahar, C. L., editor. CRC Press, 23-63.

- Yalpani, N.; Shualev, V.; Raskin, I. 1993. Endogenous salicylic acid levels correlate with accumulation of pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Phytopathology* 83: 702-708.
- Zeineh, R.A.; Kyriakids, G.; Acey, R.; Smith, C. 1986. Detection and assessment of citrus tristeza virus antigens by computer-aided scanningdensitometry. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 13: 119-125.
- Zeman, V. 1930. Una enfermedad nueva in los naranjales de Corrientes. *Physis*,19: 410-411.
- Zhang, L.; Robbins, M.P.; Carver, T.L.W.; Zeyen, R.J. 1997. Induction of phenylpropanoid gene transcripts in oat attacked by *Erysiphe graminis* at 20oC and 10oC. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51: 15-33.

8. APÊNDICE

Apêndice I. Rota metabólica e enzimas envolvidas na biossíntese de lignina. 1- fenilalanina amônia-liase (PAL); 2 - ácido -4- cinâmico hidroxilase; 3- ácido *p*-coumarico hidroxilase; 4- *o*-metil transferase; 5- ácido cinamato CoA-ligase; 6- cinamoil-CoA-oxidoreductase; 7- cinamil-álcool desidrogenase (CAD); 8- peroxidase. (Vance *et al.*, 1980).



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE