

ESTUDO ULTRAESTRUTURAL SOBRE A DISTRIBUIÇÃO DO VÍRUS DO ANEL DO  
PIMENTÃO DURANTE A MICROSPOROGENESE DE TOMATEIRO INFECTADO

JOSÉ OSMAR GASPAR

Orientador: DR. ÁLVARO SANTOS COSTA

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

CAMPINAS  
Estado de São Paulo-Brasil

1980

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

*Aos meus pais e à Laudimir*

*DEDICO*

## AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. ÁLVARO SANTOS COSTA, pela confiança, pela orientação segura e consciente e pelas lições de atitude científica que, tenho certeza, marcarão profundamente minha formação no campo da pesquisa.
- Ao Engenheiro Agrônomo JORGE VEGA, microscopista eletrônico da Seção de Virologia do Instituto Agronômico de Campinas, pelo treinamento no campo da microscopia eletrônica, esclarecimentos e críticas durante a execução deste trabalho e também pela revisão dos originais.
- Ao Prof. Dr. AVELINO RODRIGUES DE OLIVEIRA, por apontar caminhos, pela dedicação e incentivo durante todos estes anos e pelas sugestões e críticas apresentadas na revisão dos originais deste trabalho.
- Aos Professores Dr. IRINEU J. B. CAMARGO, Dr. HIROSHI AOYAMA e Dra. MARIA EDWIGES HOFFMANN, pelas críticas e sugestões apresentadas na revisão dos originais.
- Ao Prof. Dr. QUIVO S. TAHIN, que tão bem me acolheu em seu laboratório no início do meu curso de Pós-Graduação.
- À LAUDENIR, esposa e amiga, pelo estímulo, pelas sugestões e críticas e pela valiosa ajuda na elaboração das fotografias desta tese.
- Aos funcionários e técnicos da Seção de Virologia pela excelente convivência durante o período de desenvolvimento desta pesquisa.
- Ao Instituto Agronômico de Campinas e em especial à Seção de Virologia pela oportunidade de realização do estágio.

Ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq) pela concessão da bolsa de Mestrado

À todos os amigos que de um modo ou outro contribuíram para a execução deste trabalho e em especial à ANA MARIA MARQUES DA LUZ e EDSON ROSA PIMENTEL.

## ÍNDICE

	Página
1. RESUMO .....	01
2. ABSTRACT .....	03
3. INTRODUÇÃO .....	05
4. REVISÃO DA LITERATURA .....	06
4.1. Considerações gerais sobre a transmissão de fitovírus por semente .....	06
4.2. Considerações gerais sobre o vírus do anel do pimentão (VAP) .....	11
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	14
5.1. Vírus/hospedeira .....	14
5.2. Preparo do material para microscopia eletrônica .....	15
5.3. Testes de viabilidade de grãos de pólen .....	16
6. RESULTADOS .....	17
6.1. Comportamento do VAP em tecidos foliares e de anteras de tomateiro .....	17
6.2. Distribuição do VAP em tecidos de antera de tomateiro.	18
6.2.1. Presença do VAP nas células que se encontram em diferentes estágios de formação dos grãos de pó- len .....	19
6.2.1.1. Estágio pré-meiótico .....	19
6.2.1.2. Estágio meiótico com formação de tétrade ....	20

	Página
6.2.1.3. Estágio de micrôsporos pré-mitóticos .....	20
6.2.1.4. Estágio de primeira divisão mitótica em mi- crôsporos .....	21
6.3. Viabilidade de pólen sadio e infectado pelo VAP .....	22
7. DISCUSSÃO .....	23
8. CONCLUSÕES .....	32
9. LITERATURA CITADA .....	33

## 1. RESUMO

Partículas longas e curtas do vírus do anel do pimentão - VAP - ("Brazilian tobacco rattle virus") foram visualizadas em tecidos foliares e de anteras de tomateiros (*Lycopersicon esculentum* Mill.) infectados. De modo característico, o VAP apareceu formando agregados de partículas sempre associados externamente a mitocôndrias, com exceção para micrôsporos e grãos de pólen maduros, onde também foram encontrados agregados de partículas não associados com essa organela celular e partículas livres no citoplasma. Algumas vezes, partículas longas e curtas do VAP apareceram associadas numa extremidade a uma mitocôndria e na outra ao tonoplasto.

O VAP foi localizado em todos os estágios de maior duração da microsporogênese de tomateiros infectados, ou seja, estágio pré-meiótico, estágio meiótico, estágio de micrôsporo pré-mitótico e estágio de grão de pólen maduro. Em grãos de pólen maduros partículas longas e curtas do VAP foram encontradas tanto nas células vegetativas como nas generativas. Em nenhum caso foram identificados vírions do VAP no núcleo celular, nem associação das partículas virais com paredes celulósicas, paredes de calose ou parede envolvente dos grãos de pólen.

A quantidade relativamente pequena do vírus em células-mães dos grãos de pólen e micrôsporos pré-mitóticos e o acúmulo de partículas longas e curtas em grãos de pólen maduros, levam-nos a acreditar que ocorre síntese do VAP durante o período de amadurecimento dos grãos de pólen.

Sob o aspecto morfológico o VAP parece não interferir no desenvolvimento normal da antera e nem nos processos de meiose e mitose que ocorrem para produção de grãos de pólen. Entretanto, os grãos de pólen oriundos de plantas infectadas, germinam em taxas menores do que aqueles de plantas sadias.

## 2. ABSTRACT

### AN ULTRASTRUCTURAL STUDY OF PARTICLE DISTRIBUTION IN THE POLLEN DURING MICROSPOROGENESIS OF TOMATO PLANTS INFECTED WITH THE BRAZILIAN TOBACCO RATTLE VIRUS

Long and short particles of the Brazilian tobacco rattle virus (BTRV) were visualized in leaf cells and in cells of the various anther tissues of infected tomato plants. The BTRV appeared mostly as aggregates of parallel particles associated on both ends to mitochondria, though isolated aggregates and individual particles were seen in microspores and mature pollen grains. In a few cases particle aggregates were observed associated with a mitochondria on one end and to the tonoplast of a vacuole on the other end.

The BTRV particles could be seen in the cytoplasm of infected cells during the various phases of microsporogenesis from the stage of pre-meiotic cells until mature pollen grains. In these the short and long particles could be seen in the cytoplasm of both the vegetative and generative cells. No virus particle was ever seen in the nuclei of infected cells; neither associated with the cellulose or callose

walls, nor on the outside wall of pollen grains.

The small number of virus particles present in the pollen mother cells and pre-mitotic microspores on one side, and the great number of short and long particle aggregates in the mature pollen grains on the other, indicate that virus increase must occur during pollen grain maturation and is not the result of only distribution.

Development of infected anthers, as well as meiotic and mitotic processes that lead to pollen grain formation in affected plants, are comparable to those of non-infected controls. However, pollen grains from infected plants showed a lower germination than normal pollen.

### 3. INTRODUÇÃO

A transmissibilidade de vírus por semente adquire grande importância, uma vez que esse fenômeno pode originar fonte de inóculo primário nas plantações ou introdução de vírus em áreas onde não ocorrem. No entanto, a transmissão de um vírus pela semente parece ser mais a exceção do que a regra, o que leva a acreditar que a grande maioria das plantas apresenta uma barreira altamente efetiva à passagem dos vírus da planta infectada para o embrião da semente.

Muito embora diversos trabalhos demonstrem a presença de partículas virais em diferentes partes da semente, parece evidente que, na grande maioria dos casos, a transmissibilidade de vírus por semente para a geração seguinte é dependente da invasão do embrião em algum estágio de sua formação.

A introdução de vírus no saco embrionário através do pólen constitui uma via de invasão do embrião e um estudo a nível de microscopia eletrônica da distribuição de vírus durante as fases de formação e maturação de grãos de pólen, torna-se de interesse. No presente trabalho, esse estudo foi feito com o vírus do anel do pimentão - VAP - durante a microsporogênese em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.).

#### 4. REVISÃO DA LITERATURA

##### 4.1. Considerações gerais sobre transmissão de fitovírus por semente

A transmissão dos vírus causadores de moléstias de plantas através das sementes não é um fenômeno dos mais frequentes na epidemiologia das fitoviroses (BAWDEN, 1964). Entretanto, quando isso ocorre, torna-se evento importante, pois é uma das maneiras de introdução do vírus tanto em região onde não ocorria antes, como também nas plantações de regiões onde já era conhecido. É, muitas vezes, a única ou a principal alternativa responsável pelas fontes de vírus que aparecem nas plantações e a partir das quais ocorre a disseminação dentro da área plantada.

Na grande maioria dos casos, a semente oferece uma efetiva barreira contra a passagem da maioria dos vírus, mesmo no caso daqueles que são altamente infectivos. Apesar desta proteção, um apreciável número de vírus passa de uma geração para a seguinte através da semente (BENNETT, 1969; SHEPHERD, 1972).

Os fatores que levam à transmissão de um vírus de planta através da semente não são bem conhecidos. Muitas teorias têm sido propostas para explicar o fenômeno da transmissão de vírus pela semente

(DUGGAR, 1930; CALDWELL, 1934, 1962; BENNETT, 1940, 1969; CROWLEY, 1955, 1957; PARTRIDGE *et al.* 1974), mas aquelas relacionadas com a distribuição do vírus nos tecidos infectados e principalmente naqueles associados com a formação dos gametas e da semente são as que recebem maior apoio, embora não haja evidência conclusiva a respeito.

A maioria dos vírus transmitidos pela semente são encontrados em seus vários tecidos, mas ao que tudo indica o fator crítico para transmissão à progênie é sua habilidade em invadir e sobreviver no embrião em algum estágio de sua formação. Testes de polinização cruzada têm mostrado que transmissão de vírus pelo embrião pode ocorrer quando a planta-mãe infectada é polinizada com pólen oriundo de planta sadia ou quando a planta-mãe sadia é polinizada com pólen de planta infectada (NELSON e DOWN, 1933; MEDINA e GROGAN, 1961; LISTER e MURANT, 1967; YANG e HAMILTON, 1974). Tais dados sugerem que a invasão do embrião provavelmente ocorre através de uma das três maneiras seguintes: a) introdução do vírus no saco embrionário pelo pólen, b) invasão do saco embrionário por vírus provenientes da planta-mãe, c) invasão direta do embrião.

É opinião da maioria dos investigadores que, de uma maneira geral, a invasão do saco embrionário pelo vírus que infecta a planta-mãe é a que com maior frequência leva à presença do vírus no embrião (BENNETT, 1969; YANG e HAMILTON, 1974; CARROLL e MAYHEW, 1976 a,b). Algumas determinações de frequências com que determinados vírus foram encontrados no pólen e no óvulo de plantas infectadas foram computados por BENNETT (1969) e SHEPHERD (1972), encontrando-se valores geralmente maiores para o óvulo.

A primeira sugestão de que vírus poderiam estar presentes em grãos de pólen foi dada por REDDICK e STEWART (1918) que sugeriram a possível transmissão do vírus do mosaico comum através do pólen do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Posteriormente, REDDICK (1931), NELSON e DOWN (1933), MEDINA e GROGAN (1961), através de experimentos de polinização cruzada, mostraram haver efetiva transmissão do vírus do mosaico comum através do pólen de feijoeiro. Mais recentemente, GASPAR *et al.* (1979 b) examinando ao microscópio eletrônico secções ultrafinas de anteras de feijoeiros da variedade Jalo infectados pelo vírus do mosaico comum, demonstraram a presença de feixes de partículas e inclusões típicas desse vírus no citoplasma de células vegetativas de grãos de pólen maduros.

Os vírus que infectam plantas podem ser carregados externamente ou internamente nos grãos de pólen. No primeiro caso, evidências diretas através da microscopia eletrônica foram apresentadas por HAMILTON *et al.* (1977), que demonstraram a presença do vírus do mosaico em capim bromo ("bromegrass mosaic virus"), vírus do mosaico sulino do feijoeiro ("southern bean mosaic virus") e do mosaico comum do fumo ("tobacco mosaic virus") na exina de grãos de pólen maduros das plantas infectadas. Testes de transmissão mecânica mostraram que as partículas de vírus ainda estavam infectivas. Os autores sugerem a possibilidade de que os tubos polínicos originados de grãos de pólen contaminados poderiam tornar-se infectados ou infectados por inoculação mecânica, durante o processo de germinação, levando à transmissão do vírus ao saco embrionário. É também possível que o estigma floral torne-se infectado como consequência da deposição de pólen contaminado, podendo levar à invasão dos integumentos do óvulo. YANG e HAMILTON (1974) detectaram a presença do vírus da mancha

anular do fumo ("tobacco ringspot virus") na parede celular de células generativas e na intina de grãos de pólen de soja (*Glycine max* Merr.).

Quando internos, os vírus podem estar localizados na célula vegetativa e/ou na célula generativa. Podem ainda, quando presentes nesta última, passar às duas células espermáticas que irão fecundar, separadamente, a oosfera e os núcleos polares. Dessa maneira, um vírus pode chegar até o saco embrionário carregado internamente nas células espermáticas ou como contaminante externo, presente no citoplasma da célula vegetativa. YANG e HAMILTON (1974) através do exame de secções ultrafinas de anteras e grãos de pólen de soja infectada pelo vírus da mancha anular do fumo, detectaram a presença do vírus no citoplasma e parede de células generativas mas não nas células vegetativas, provavelmente devido à baixa concentração do vírus ou porque as partículas estivessem espalhadas ao acaso confundindo-se com ribossomos. No entanto, segundo os autores, o papel do pólen infectado na transmissão desse vírus pela semente de soja parece ser desprezível devido à sua pequena capacidade de germinação e lento alongamento do tubo polínico. CAMARGO *et al.* (1972) observaram que partículas curtas e longas do vírus do anel do pimentão estavam presentes em célula-mãe do pólen, tétrades, pólen jovem e pólen maduro de tomateiro. CARROLL (1974) demonstrou a presença do vírus do mosaico-em-faixa da cevada ("barley stripe mosaic virus") no citoplasma e núcleo das células vegetativas e espermáticas de pólen de plantas de cevada (*Hordeum vulgare* L.) infectadas.

Posteriormente, CARROLL e MAYHEW (1976 a) estudaram a distribuição do vírus do mosaico-em-faixa da cevada nos tecidos formadores de grãos de pólen. O exame ao microscópio eletrônico de secções

ultrafinas de anteras e grãos de pólen, revelou que o vírus invade primeiramente o meristema floral da hospedeira e subsequentemente invade desde células-mães dos grãos de pólen até células espermáticas. As evidências apresentadas pelos autores do trabalho sustentam a hipótese de BENNETT (1969) de que a transmissão pela semente pode depender da capacidade do vírus em infectar primeiramente o meristema floral e subsequentemente invadir os gametófitos, masculino e feminino, de sua hospedeira.

Evidências diretas da invasão do óvulo por vírus provenientes da planta-mãe têm sido dadas por YANG e HAMILTON (1974) que mostraram a presença do vírus da mancha anular do fumo nos integumentos, nucelo, parede do saco embrionário, parede celular das sinérgides, parede celular entre sinérgide e oosfera e citoplasma de antípodas de flores de soja infectada. MAYHEW e CARROLL (1974) e CARROLL e MAYHEW (1976 b) mostraram, através da microscopia eletrônica, a presença do vírus do mosaico-em-faixa da cevada nas células que compõem o saco embrionário (inclusive oosfera) de flores de cevada infectada. Este vírus infecta o meristema floral e é encontrado em todos os estágios de formação do saco embrionário.

Estudos eletrônico-microscópicos mostrando a presença de partículas virais em células de embriões da semente têm sido feitos com cevada e feijoeiro. CARROLL (1969) demonstrou a presença do vírus do mosaico-em-faixa em citoplasma de células de embriões de cevada e HOCH e PROVVIDENTI (1978) mostraram a presença do vírus do mosaico comum em células de embriões de feijoeiro. Este vírus, ou inclusões a ele associadas, foram encontrados, inclusive, nas células meristemáticas da radícula e ápice vegetativo do embrião.

Embora as evidências indiquem que, via de regra, a transmissão pela semente é dependente da invasão do embrião por vírus que tenham invadido o saco embrionário, parece que alguns vírus são capazes de invadir o embrião em formação, sem antes ter invadido o óvulo ou saco embrionário. CROWLEY (1959) demonstrou que o vírus do mosaico sulino infectando feijoeiro e o vírus da mancha anular do fumo infectando soja foram capazes de invadir o embrião de suas hospedeiras, tanto pela invasão dos gametas masculino e feminino como pela invasão direta do embrião nas primeiras fases de sua formação, embora nenhum dos dois vírus invadissem embriões em estágios mais adiantados de formação. No entanto, YANG e HAMILTON (1974) que estudaram a nível de microscopia eletrônica o mecanismo de transmissão do vírus da mancha anular do fumo por semente de soja, acreditam que para ocorrer tal invasão, esse vírus deveria passar do nucelo, o qual sofre degeneração na época de fertilização, para o saco embrionário através de uma espessa parede celular, o que seria um evento pouco provável. Segundo esses autores, uma interpretação mais provável é que a infectividade detectada por CROWLEY ocorria em flores tardias do cacho.

#### 4.2. Considerações gerais sobre o vírus do anel do pimentão (VAP)

O vírus do anel do pimentão ("Brazilian tobacco rattle virus") foi encontrado no Brasil infectando pimentão (*Capsicum annuum* L.) sendo caracterizado por COSTA *et al.* (1961) como integrante do grupo "rattle" do fumo (VAN DER WANT e ROZENDAAL, 1948). O vírus possui dois tipos de partículas em forma de bastonetes com comprimento normal de 55 e 200 nm e com diâmetro da ordem de 20-25 nm (KITAJIMA, 1967; KITAJIMA

*et al.*, 1969). Análises químicas feitas com preparações purificadas do VAP revelaram que as partículas virais têm 95% de proteína e 5% de ácido ribonucleico (SILVA, 1965).

SILVA (1965) e OLIVEIRA (1967) verificaram que somente as partículas longas são infectivas, de onde se pode presumir carregam a informação genética para um sistema RNA-replicase. As partículas curtas não são infectivas isoladamente, mas quando uma mistura dos dois tipos de partículas, longas e curtas, é usada como inóculo, há infecção com a produção de partículas virais completas (vírions). Quando uma mistura de partículas curtas e longas originadas de diferentes estirpes é usada como inóculo, as partículas de ambos os tamanhos produzidas na progênie, têm composição de aminoácidos e especificidade serológica relacionadas com as partículas curtas usadas como inóculo. O RNA das partículas curtas carrega então o gene para a capa proteica (GHABRIAL e LISTER, 1973).

Tecidos diversos de diferentes hospedeiras infectadas pelo VAP mostram agregados de partículas virais de 200 nm de comprimento dispostas paralelamente no citoplasma, em estreita associação com mitocôndrias (KITAJIMA, 1967; HARRISON e ROBERTS, 1968; KITAJIMA e COSTA, 1969). Agregados de partículas curtas (55 nm) estreitamente relacionadas com mitocôndrias, semelhantemente às partículas longas, foram encontrados em grãos de pólen de tomateiro por CAMARGO *et al.* (1969), em tecido foliar de fumo por SILVA e NOGUEIRA (citado em NOGUEIRA, 1978) e em tecido foliar e de antera de tomateiro por GASPARGO *et al.* (1979 a).

NOGUEIRA (1978) estudou o local de replicação do RNA do vírus do anel do pimentão através de técnicas de auto-radiografia e microscopia eletrônica, sugerindo que "embora alguma síntese do RNA ou ácidos

nucléicos devidos a presença do VAP possa ocorrer no núcleo da célula infectada, o nucléolo é o local principal da biossíntese do RNA do VAP".

A transmissibilidade do vírus do anel do pimentão através da semente de tomateiros infectados alcança até 30% (COSTA e KITAJIMA, 1968) sendo que o vírus é também transmitido pelo pólen.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Vírus/hospedeira

O vírus do anel do pimentão, isolado São Carlos, pertencente à coleção da Seção de Virologia do Instituto Agronômico de Campinas, SP, local onde foi efetuado o presente trabalho, foi mecanicamente inoculado em grupos de quatro plantas de tomateiro da variedade Santa Cruz com vinte dias de idade e mantidos em casa de vegetação. O controle foi feito com tomateiros da mesma idade não inoculados com o vírus.

As amostras para microscopia eletrônica foram coletadas durante o período de primeira floração a partir de plantas que apresentavam sintomas típicos do VAP. Pedacos de folhas retirados de regiões cloróticas foram cortadas em pequenos segmentos (1-2 mm<sup>2</sup>) a fim de facilitar a penetração de fixadores e resina. Com a mesma finalidade, as anteras também foram cortadas em pequenos pedacos (1-2 mm de comprimento).

## 5.2. Preparo do material para microscopia eletrônica

Todo material foi fixado por 2-3 h à temperatura ambiente (26-28°C) em mistura formaldeído/glutaraldeído (KARNOVSKI, 1965), com a seguinte composição: paraformaldeído 4%, glutaraldeído 5%, cloreto de magnésio 5,0 mM, tampão cacodilato de sódio 0,02 M, pH 7,0.

Após a fixação, o material foi lavado durante 2 h (3 x 40 min.) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,0 e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão, a 4°C, durante aproximadamente 12 h. Lavagens com água destilada (3 x 20 min. e 2 x 30 min.) precederam a contrastação "in bloco" com acetato de uranila 2% em tampão maleato de sódio 0,05 M, pH 6,0 durante 2-5 h (KARNOVSKY, 1967).

Posteriormente, o material foi lavado em água destilada (3 x 10 min. e 2 x 30 min.) e desidratado em gradiente de acetona, como se segue: 30% - 10 min., 50% - 10 min., 70% - 15 min., 100% - 3 x 20 min..

A inclusão do material foi feita com resina epoxy (MOLLENHAUER, 1964) seguindo-se a composição: Epon-812 25,0%, anidrido dodecnilsuccínico (DDSA) 55,0%, araldite-6005 15,0%, dibutil ftalato (DBP) 0,5%, benzildimetilamina (BDMA) 4,5%.

Como solvente para essa mistura utilizou-se acetona nas seguintes proporções (resina:acetona): 1:3 - 15 min., 1:1 60 min., 3:1 ± 12 h. O material foi então colocado em resina pura e deixado durante 24 h a 38°C, sendo posteriormente colocado em estufa a 60°C durante 48 h.

Cortes finos para microscopia óptica e ultrafinos para microscopia eletrônica foram feitos com navalhas de vidros em um ultramicrotomo Porter-Blum MT1. Os cortes finos foram corados com azul de toluidina

0,5% em solução de bórax 1% e observados em um microscópio óptico. As seções ultrafinas montadas em telinhas de cobre, previamente revestidas com uma película de Formvar e reforçadas com uma leve deposição de carbono, foram contrastadas com citrato de chumbo (VENABLE e COGGESHALL, 1965) e examinadas em um microscópio eletrônico Siemens Elmiskop I operando a 80 KV.

### 5.3. Testes de viabilidade de grãos de pólen

Para estes testes, uma única antera madura e deiscente de cada flor foi mergulhada numa gota de sacarose 30% em solução de ácido bórico 120 ppm (YANG e HAMILTON, 1974), sobre uma lâmina de vidro. O material foi colocado para germinar a 25°C durante aproximadamente 12 h. Foram utilizadas anteras de dez flores de plantas diferentes (dez sadias e dez infectadas) e a contagem de grãos de pólen germinantes ou não, foi feita em um microscópio óptico com aumento total de 100X. A porcentagem de germinação foi estimada pela observação de três campos diferentes e consecutivos de uma mesma gota da solução. Grãos de pólen que produziram tubos polínicos, independente do comprimento, foram considerados como germinados.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Comportamento do VAP em tecidos foliares e de anteras de tomateiro

Foi possível verificar a presença do vírus do anel do pimentão somente nos estágios da microsporogênese de tomateiro que apresentam maior duração, visto que aqueles com curta duração, tais como metáfase I e II, anáfase I e II, etc., são, obviamente, de difícil observação. As secções ultrafinas (60-80 nm) de tecidos foliares e de anteras em diferentes estágios de desenvolvimento mostraram a presença de partículas longas (200 nm) e curtas (55 nm) do VAP, caracteristicamente associadas a mitocôndrias. Tais partículas agregavam-se ordenadamente lado a lado, com o eixo maior das partículas perpendicular ou ligeiramente inclinado à membrana externa das mitocôndrias (Figuras 1,2,8 e 16). Quanto à associação com mitocôndrias não se verificou diferença entre partículas longas e curtas e em nenhum caso foram encontradas partículas longas ou curtas do VAP no interior desse orgânulo celular, nem associação deste vírus com outras organelas citoplasmáticas ou núcleo celular. Ambos os tipos de partículas aparecem como agregados em camada simples ou, às vezes, em camada dupla (Figuras 3 e 4). Cortes transversais de partículas do VAP

"in situ" (figura 5) mostraram que o diâmetro das mesmas é da ordem de 20-25 nm, o que está de acordo com o trabalho de KITAJIMA (1967) que estudou o diâmetro das partículas em preparações purificadas e contrastadas negativa ou positivamente. Às vezes, tanto partículas longas como curtas apareciam associadas numa extremidade a uma mitocôndria e na outra ao tonoplasto (Figuras 6 e 7). Em alguns cortes de tecidos foliar e de antera foi possível observar uma aparente associação de partículas do VAP com uma estrutura semelhante a cristal cuja natureza não foi determinada (Figura 8).

Embora não fosse de ocorrência geral, notou-se que a organização das mitocôndrias de plantas infectadas apresentava-se modificada quando comparada com mitocôndrias de plantas sadias (Figura 9). Em plantas infectadas (Figuras 4, 6, 10, 17 e 23) o sistema de cristas mitocondriais apresentava-se desorganizado e às vezes até inexistente, a matriz mitocondrial bem menos densa e a região fibrilar, geralmente considerada correspondente ao DNA mitocondrial, bem mais alargada que as de mitocôndrias de plantas sadias.

Sob o aspecto morfológico o VAP parece não interferir no desenvolvimento normal da antera e nem nos processos de mitose e meiose.

## 6.2. Distribuição do VAP em tecidos de antera de tomateiro

Em todos os estágios estudados, as partículas do VAP, longas e curtas, apresentavam-se distribuídas genericamente pelos diferentes tecidos das anteras. Assim, o VAP foi encontrado em células da epiderme (Figura 12), do conectivo (Figura 11), do tecido parietal (Figura 13), do tapetum (Figura 10) e células relacionadas com formação de grãos de pólen.

### 6.2.1. Presença do VAP nas células que se encontram em diferentes estágios de formação dos grãos de pólen

O vírus do anel do pimentão foi visualizado somente nos estágios de maior duração da microsporogênese, ou seja, estágio pré-meiótico, estágio meiótico, estágio de microsporo pré-mitótico e estágio de grão de pólen maduro. Através do estudo de um grande número de flores de tomateiros infectados pudemos verificar que a invasão e distribuição do VAP nas diversas anteras de uma mesma flor não é uniforme. Mesmo numa única antera invadida pelo vírus, a distribuição deste pelas diferentes células não é uniforme. Assim, em todos os estágios de maior duração estudados, nunca foram encontrados 100% de invasão das células, sejam elas, esporogênicas, microsporócitos, microsporos imaturos ou grãos de pólen maduros.

#### 6.2.1.1. Estágio pré-meiótico

O vírus do anel do pimentão pode ser visualizado já em células esporogênicas pré-meióticas, as quais aparecem em anteras bem jovens como um conjunto celular em forma de meia-lua rodeado por células do tapetum (Figuras 14 e 15). Cada célula esporogênica é circundada pela parede primária, com plasmodesmos conectando as células esporogênicas entre si (Figura 17) e estas com o tapetum (Figura 16). Em tomateiro, as células esporogênicas funcionam diretamente como microsporócitos ou células-mães dos grãos de pólen.

#### 6.2.1.2. Estágio meiótico com formação de tetrade

Pouco antes do início da meiose, cada microsporócito começa a secretar calose ao redor de sua superfície externa, de modo que, paulatinamente, as conexões citoplasmáticas entre essas células tornam-se escassas e por fim desaparecem (Figuras 18 e 19) como também verificado para outras plantas (ESAU, 1965; HESLOP-HARRISON, 1966; HORNER e ROGERS, 1974; HORNER, 1977).

Os microsporócitos, também denominados células-mães dos grãos de pólen, começam a adquirir neste estágio forma arredondada e cada vez mais se separam uns dos outros e do tapetum, tanto pela presença da espessa parede de calose como pelo alargamento do lóculo da antera (Figuras 20 e 21). Tanto partículas longas como curtas do VAP são encontradas em células-mães dos grãos de pólen em meiose (Figuras 22 e 23).

Como consequência da meiose, a partir de cada célula-mãe do grão de pólen (microsporócito) formam-se quatro micrôsporos (tetrade), que continuam envolvidos por espessa parede de calose (Figura 24).

#### 6.2.1.3. Estágio de micrôsporos pré-mitóticos

Após a meiose segue-se um longo período de intérfase durante o qual ocorrem, sucessivamente, os seguintes eventos: formação da exina, desaparecimento da calose que envolve a tetrade com aumento do volume dos micrôsporos e formação da intina. Exina e intina constituem a parede envolvente dos micrôsporos.

Partículas longas e curtas do VAP associadas a mitocôndrias foram encontradas em citoplasma desses micrôsporos pré-mitóticos (Figuras 25 e 26).

Situação bem característica foi encontrada em muitos micrôsporos pré-mitóticos, os quais mostravam partículas longas e curtas do VAP soltas no citoplasma e agregados de partículas não associadas a mitocôndrias (Figuras 27 e 28). Não foi identificada desorganização nem perturbações visíveis no citoplasma desses micrôsporos.

É interessante notar que em muitas anteras observadas, as células do tapetum apresentavam-se infectadas pelo VAP, com partículas do vírus livres ou associadas a mitocôndrias, embora os micrôsporos próximos a esse tecido não apresentassem partículas virais nem distúrbios citoplasmáticos visíveis (Figura 29).

#### 6.2.1.4. Estágio de primeira divisão mitótica em micrôsporos

Ao final da intérfase os núcleos dos micrôsporos dividem-se mitoticamente formando micrôsporos com duas células: a vegetativa e a generativa, sendo que esta última acaba por tornar-se totalmente envolvida pelo citoplasma da célula vegetativa (Figura 34). Segue-se um armazenamento de reservas nutritivas, particularmente evidenciado pelo acúmulo de amido, com a conseqüente produção de grãos de pólen maduros.

Partículas longas e curtas do VAP foram encontradas no citoplasma de células vegetativas de grãos de pólen maduros (Figuras 30 e 31), os quais de maneira geral possuíam alta concentração de partículas. As Figuras 32 e 33 mostram um grão de pólen maduro infectado pelo VAP, apresentando grande concentração de partículas, destacando-se agregados constituídos por várias fileiras de partículas curtas dispostas lado a lado e não associadas a mitocôndrias. Tanto partículas longas como curtas

do vírus do anel do pimentão foram encontradas, sempre associadas a mitocondrias, no citoplasma de células generativas (Figuras 35 e 36). Em nenhum caso foram encontrados virions do VAP no núcleo de células vegetativas ou generativas ou em associação com paredes celulares destas células.

### 6.3. Viabilidade de pólen sadio e infectado pelo VAP

Observando-se grãos de pólen de anteras de dez flores de plantas diferentes (dez sadias e dez infectadas), colocados para germinar durante toda a noite, verificou-se que aqueles oriundos de plantas sadias apresentavam 62% de germinação, ou seja, de um total de 1560 grãos de pólen observados, 970 estavam germinados. Grãos de pólen de plantas infectadas pelo VAP apresentavam 39% (440/1120) de germinação. Foram considerados como grãos de pólen germinados, aqueles que produziram tubos polínicos, independente do comprimento.

## 7. DISCUSSÃO

O presente trabalho constitui evidência favorável à hipótese de BENNETT (1969) sobre transmissão de vírus por semente. Segundo BENNETT, na grande maioria dos casos a transmissibilidade dos fitovírus por semente é dependente da sua capacidade em invadir os gametófitos masculino e feminino quando em estágios iniciais de formação. Tal capacidade seria determinada pela habilidade do vírus em invadir tecidos meristemáticos podendo portanto, atingir as células-mães dos grãos de pólen e/ou células-mães dos megásporos. A não invasão viral destas células resultaria, respectivamente, em grãos de pólen e sacos embrionários livres de vírus. Desta maneira, teríamos de admitir que todos os vírus com capacidade de invadir tecidos meristemáticos poderiam ser transmitidos por semente e vice-versa, devido ao fato deles poderem invadir as células-mães dos grãos de pólen e do megásporo. Embora o número de evidências diretas através da microscopia eletrônica seja escasso, isso mostra ser verdadeiro para o vírus da mancha anular do fumo (CROWLEY *et al.*, 1969; ROBERTS *et al.*, 1970; YANG e HAMILTON, 1974), vírus do mosaico-em-faixa da cevada (CARROLL e MAYHEW, 1976 a,b) e vírus do mosaico comum do feijoeiro (HOCH e PROVVIDENTI, 1978; GASPAR *et al.*, 1979 b).

Neste presente estudo, foi possível verificar que partículas longas e curtas do VAP invadem as células esporogênicas pré-meióticas de anteras de tomateiro e, a partir destas, alcançam os grãos de pólen. Esta observação e a de KITAJIMA (1967), que mostrou partículas longas do VAP em células meristemáticas de raiz e ápice vegetativo de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) infectadas, acrescentam o VAP aos vírus anteriormente citados.

A transmissão do VAP por grãos de pólen de tomateiro provavelmente ocorre através da invasão e distribuição do vírus nas células de meristemas apicais e axilares, as quais, durante a atividade reprodutiva destes meristemas, originarão os botões florais. Uma vez presentes nas células destes botões florais, é de se esperar que o vírus seja distribuído pelos diferentes órgãos da flor, fazendo-se presente nas células de anteras em início de formação. Nestas anteras estão localizadas as células iniciais hipodermais as quais, por mitoses, originarão as células esporogênicas. Pode-se então considerar duas suposições quanto a presença do vírus nessas células esporogênicas: 1) as partículas virais estariam presentes nas células iniciais hipodermais e, a partir destas, seriam distribuídas para as células esporogênicas, 2) por algum motivo, partículas do vírus não estariam presentes nessas células iniciais da antera. Ocorrendo esta segunda suposição ainda haveria duas possibilidades de invasão das células que darão origem aos grãos de pólen: a) invasão das próprias células esporogênicas por vírus presentes em células circunvizinhas, b) invasão das células-mães dos grãos de pólen até, no máximo, as primeiras sub-fases da prófase meiótica, por vírus também presentes em células vizinhas. É mesmo bastante provável que a presença de partículas

do VAP em grãos de pólen seja devido a utilização, por parte do vírus, de todas essas vias de invasão. Pode-se supor que a translocação do VAP em todos os casos propostos dar-se-ia a curta distância pelos plasmodesmos e a distâncias maiores através de vasos do floema.

Invasão e distribuição desigual do vírus nas células meristemáticas que darão origem ao botão floral poderiam explicar a desuniformidade na presença do VAP nas diversas anteras de uma mesma flor e nas células esporogênicas e microsporócitos. Além disso, é possível que uma vez presentes nas células-mães dos grãos do pólen, através da utilização de qualquer uma das vias descritas anteriormente, as partículas do VAP sejam distribuídas ao acaso para as células resultantes da meiose. É mesmo possível que nem todos os quatro microsporos originados de uma mesma célula-mãe infectada possuam partículas do vírus, devido a uma distribuição não equitativa das mesmas.

A limitação do tempo para invasão das células-mães dos grãos de pólen até no máximo as primeiras sub-fases da prófase meiótica, deve-se à deposição de calose ao redor da superfície externa dos microsporócitos, fazendo com que as conexões entre eles e deles com as células do tapetum desapareçam. Parece-nos bastante improvável que partículas do VAP, presentes em células do tapetum, consigam atravessar a espessa camada de calose que envolve as células-mães dos grãos de pólen desde o início da meiose até a produção de tétrades. De acordo com HESLOP-HARRISON (1966) a função da parede de calose é atuar como um filtro molecular pelo menos para macromoléculas. Há indicações de que durante a microsporogênese de lírio (*Lilium longiflorum* Thumb.) a formação da parede de calose coincide com a interrupção na incorporação de compostos radioativos no

RNA e proteínas dos meiócitos (TAYLOR, 1959). Tal incorporação volta a ocorrer após a dissolução da parede de calose. HESLOP-HARRISON e MACKENZIE (1967) verificaram que  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -timidina é incorporada em maior escala nos estágios pré-meiótico e primeiras sub-fases da prófase meiótica. Após este estágio nenhuma incorporação foi verificada, a não ser a partir do momento em que desaparece a parede de calose que envolve a tétrede de micrósporos, quando então  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -timidina foi absorvida pelos micrósporos embora não fosse incorporada.

O fato de que material marcado seja absorvido pelos micrósporos após o desaparecimento da calose, leva-nos a pensar que a parede destas células, constituída inicialmente de exina e posteriormente de intina mais exina, permita de alguma maneira a penetração de moléculas no interior dos micrósporos. No caso particular de vírus, não há evidências diretas da passagem destes através da parede celular a não ser via plasmodesmos (ESAU *et al.*, 1967; CROWLEY *et al.*, 1969; KITAJIMA e LAURITIS, 1969; ESAU e HOEFERT, 1972; WEINTRAUB *et al.*, 1974, 1976). YANG e HAMILTON (1974) demonstraram a presença de agregados do vírus da mancha anular do fumo impregnando a intina de grãos de pólen de soja sem, no entanto, especularem sobre a origem do vírus nessa estrutura celulósica.

Em relação ao VAP, não observamos nenhum tipo de associação entre o vírus, parede de calose e parede envolvente dos grãos de pólen. Foi observado, no entanto, partículas do VAP em células do tapetum embora os micrósporos próximos a esse tecido não apresentassem partículas virais nem distúrbios citoplasmáticos visíveis. O evento pode representar um caso de invasão tardia da antera, ou mesmo distribuição não equitativa do vírus entre células do tapetum e células-mães dos grãos de pólen.

Em nenhum caso estudado foram encontradas partículas longas ou curtas do vírus do anel do pimentão como contaminante externo da exina de grãos de pólen. Este fato excluiria a possibilidade de contaminação externa do tubo polínico ou possível invasão do estigma floral como consequência da deposição de grãos de pólen contaminados como descrito por HAMILTON *et al.* (1977) para o vírus do mosaico em capim bromo, vírus do mosaico sulino do feijoeiro e vírus do mosaico do fumo, que infectam externamente exina de grãos de pólen maduros de plantas infectadas.

Todos esses fatos levam a crer que a transmissão do vírus do anel do pimentão pelo pólen de tomateiro somente seja possível se houver invasão e distribuição do vírus nas anteras em estágios iniciais de formação e não em estágios mais adiantados.

Quantitativamente, não se verificou nenhuma diferença notável na concentração de partículas do VAP presentes nas células-mães dos grãos de pólen e grãos de pólen imaturos, os quais quando infectados, não apresentavam grande acúmulo de partículas. No entanto, os grãos de pólen maduros, ricos em reservas, geralmente possuíam alta concentração de partículas longas e curtas do VAP. MASCARENHAS (1975), revisando trabalhos pertinentes, comenta que nenhum RNA ribossomal, RNA de transferência e proteínas ribossomais são sintetizadas após a primeira divisão mitótica que ocorre nos micrósporos. Todas essas moléculas utilizadas na síntese de proteínas requeridas para divisões mitóticas dos micrósporos e desenvolvimento do tubo polínico, são sintetizadas durante o período de maturação dos micrósporos, principalmente no período que precede a primeira divisão mitótica. Desse modo, os micrósporos tornar-se-iam locais muito apropriados para a síntese viral, devido a alta atividade de síntese

existente nesse período. A observação de uma diferença quantitativa de partículas do VAP — presentes em maior concentração nos grãos de pólen maduros em relação às células-mães dos grãos de pólen — e o aparecimento de partículas isoladas e agregados do VAP soltos no citoplasma de micrôsporos pré-mitóticos e grãos de pólen maduros, levam-nos a acreditar que ocorre replicação do VAP durante o período de amadurecimento dos grãos de pólen. Deve-se ressaltar, e isto corrobora nossa suposição, que tais agregados de partículas longas e curtas do VAP, não associados a mitocôndrias, somente são visualizados a partir do estágio de micrôsporos pré-mitóticos. Os agregados não associados a mitocôndrias encontrados já nos micrôsporos pré-mitóticos podem indicar um início de acúmulo de partículas do VAP no citoplasma dessas células.

Os resultados dos testes de viabilidade de pólen sadio e infectado pelo VAP, tornaram evidente que a capacidade de formação de tubos polínicos é bastante diminuída em grãos de pólen de tomateiro infectado pelo VAP. Os testes mostraram que os grãos de pólen sadios tem uma taxa de germinação de 62% enquanto pólen de plantas infectadas apresentaram 39% de germinação. A influência de vírus sobre a capacidade de germinação de grãos de pólen tem sido descrita por YANG e HAMILTON (1974) para o vírus da mancha anular do fumo infectando soja, por CARROLL e MAYHEW (1976 a) para o vírus do mosaico-em-faixa infectando cevada e por VEGA (1979) para o vírus do mosaico comum da soja. Em todos os casos os vírus diminuem a taxa de germinação dos grãos de pólen.

Em relação à transmissão do vírus do anel do pimentão do pólen para o embrião duas suposições, não exclusivas, podem ser feitas: a) estando presentes na célula generativa, partículas do VAP podem passar

às duas células espermáticas resultantes de mitose da célula generativa e então, durante a fertilização, serem incorporados ao zigoto e consequentemente ao embrião, b) uma vez presentes na célula vegetativa, partículas do VAP poderiam ser carregadas como contaminante externo pelas células espermáticas para a oosfera e consequentemente ao zigoto e embrião. O fato de observarmos partículas longas e curtas do VAP no citoplasma de células generativas favorece grandemente a primeira suposição. Essas duas suposições tornam-se também válidas para uma possível invasão do endosperma da semente, o qual tem sua origem na união de uma célula espermática com os dois núcleos polares do saco embrionário.

Os exames de seções ultrafinas de tecido foliar e de antera de plantas infectadas pelo VAP mostraram um comportamento celular do vírus semelhante ao descrito por KITAJIMA (1967) e KITAJIMA e COSTA (1969). Na grande maioria dos tecidos examinados, o vírus do anel do pimentão aparece caracteristicamente associado a mitocôndrias, exceção feita para micrôsporos pré-mitóticos e grãos de pólen maduros que apresentaram também agregados de partículas do vírus sem associação com mitocôndrias e livres no citoplasma. A ocorrência de partículas curtas do VAP (55 nm) "in situ" ficou patente tanto em tecido foliar como em tecidos de antera. Anteriormente, a presença dessas partículas havia sido descrita por CAMARGO *et al.* (1969) na célula vegetativa de grãos de pólen maduros de tomateiro e por SILVA e NOGUEIRA (citado em NOGUEIRA, 1978) em tecido foliar de fumo. Pudemos verificar em nosso trabalho, que a ocorrência das partículas curtas em tecido foliar é realmente rara, em contraposição às longas que apresentam vasta distribuição. No entanto, em anteras de tomateiros infectados, agregados de partículas curtas são

encontrados tão comumente como os de partículas longas. Considerando-se o tecido foliar os resultados obtidos são conflitantes quando comparados com aqueles obtidos através das técnicas de "leaf-dip" ou de purificação do VAP (KITAJIMA, 1967; KITAJIMA *et al.*, 1969) a partir de folhas com sintomas desse vírus. A proporção de partículas longas e curtas em preparações "leaf-dip" foi de 3:1 e em preparações purificadas essa proporção foi alterada com predomínio das partículas curtas sobre as longas. Sendo as partículas curtas de baixa ocorrência em tecido foliar, torna-se difícil explicar sua alta frequência em preparações "leaf-dip" ou purificada. Em relação a esta última técnica, é possível pensar-se em quebra das partículas longas (KITAJIMA, 1967; KITAJIMA *et al.* 1969), uma vez que o método é relativamente brusco, o que aumentaria a frequência das partículas curtas. Obviamente, ter-se-ia que admitir a existência de pontos de ruptura nas partículas longas a intervalos regulares de 50-55 nm. No entanto, o método de "leaf-dip" é bastante suave, o que levaria a excluir a possibilidade de quebra das partículas. Estudos mais detalhados poderiam fornecer possíveis respostas para o evento.

Além da associação do VAP com a superfície externa de mitocôndrias, característica exclusiva deste vírus, foram verificadas associações do mesmo com o tonoplasto e com uma estrutura semelhante a cristal. Estas associações, por não constituírem regra, são tidas como meramente ocasionais. Estudos citoquímicos, a serem realizados futuramente, poderão elucidar a constituição e possível papel dessas estruturas semelhantes a cristais.

Em relação a possíveis modificações na estrutura mitocondrial induzidas pelo VAP, KITAJIMA (1967) e KITAJIMA e COSTA (1969),

mostraram haver, embora de maneira não radical, alteração na ultraestrutura das mitocôndrias de plantas infectadas (maria preta - *Solanum nigrum* L., fumo - *Nicotiana tabacum* L. e pimentão - *Capsicum annuum* L.).

Relatam os autores um sensível desenvolvimento das cristas intramitocôndriais, particularmente bem evidenciado na região central da mitocôndria, onde as cristas formavam dobras sinuosas as quais, em algumas secções, apareciam como anéis concêntricos. Este tipo de alteração não foi identificado em nosso trabalho, baseado em observações de secções ultrafinas de tecidos foliares e de anteras de tomateiros, embora tivéssemos notado outras alterações nas mitocôndrias de células infectadas. Embora não fosse de ocorrência geral, verificou-se que as mitocôndrias associadas a partículas de vírus, apresentavam-se com o sistema de cristas mitocôndriais desorganizado e às vezes até inexistente, com a matriz mitocôndrial bem menos densa. As regiões fibrilares da matriz onde se concentraria o DNA mitocondrial mostravam-se bem mais alargadas que as de mitocôndrias de plantas saudáveis. Este alargamento pode ser devido a um aumento na quantidade de DNA da mitocôndria ou a uma possível desorganização da matriz mitocondrial. Uma observação semelhante foi descrita por LUNGER e CLARK (1978) em relação ao vírus intramitocôndrial ("intramitochondrial virus" - IMV) infectando culturas de células do baço de víbora da linha VSW (Viper Spleen Warm). As mitocôndrias que contêm o IMV são frequentemente inchadas, comparadas com aquelas livres de vírus, além de apresentar um considerável grau de desorganização das cristas mitocôndriais. As possíveis inter-relações, diretas ou indiretas, entre a multiplicação desses vírus e as mudanças na estrutura mitocondrial são ainda obscuras.

## 8. CONCLUSÕES

1. As partículas curtas (55 nm) do VAP ocorrem tanto em tecido foliar como em tecidos de anteras, não havendo diferença quanto à associação com mitocôndrias, entre partículas longas e curtas.
2. O VAP não é encontrado no núcleo celular como vírion.
3. O VAP está presente em células esporogênicas pré-meióticas, células-mães dos grãos de pólen, microsporos imaturos e grãos de pólen maduros.
4. A alta concentração de partículas do VAP no citoplasma de células vegetativas de grãos de pólen maduros é resultado de distribuição e multiplicação local do vírus.
5. Partículas longas e curtas do VAP são encontradas tanto na célula vegetativa como na generativa de grãos de pólen maduros.

## 9. LITERATURA CITADA

- BAWDEN, F.C. 1974. *Plant viruses and virus diseases*. The Ronald Press Company. New York. 361 p.
- BENNETT, C.W. 1940. The relation of viruses to plant tissues. *Bot. Rev.* 6:427-473.
- BENNETT, C.W. 1969. Seed transmission of plant viruses. *Adv. Vir. Res.* 14:221-261.
- CALDWELL, J. 1934. The physiology of virus diseases in plants. V. The movement of the virus agent in tobacco and tomato. *Ann. Appl. Biol.* 21:191-205.
- CALDWELL, J. 1962. Seed transmisssion of viruses. *Nature* 193:457-459.
- CAMARGO, I.J.B., KITAJIMA, E.W. and COSTA, A.S. 1969. Visualization of the pepper ringspot virus in tomato pollen. *Phytop. Z.* 64:282-285.
- CAMARGO, I.J.B., KITAJIMA, E.W. e COSTA, A.S. 1972. O vírus do anel do pimentão durante a microsporogênese do pólen de tomateiro. In: 24<sup>a</sup> *Reunião Anual da S.B.P.C.*. São Paulo. Resumo H-53.
- CARROLL, T.W. 1969. Electron microscopic evidence for the presence of barley stripe mosaic virus in cells of barley embryos. *Virology* 37: 649-657.

- CARROLL, T.W. 1974. Barley stripe mosaic virus in sperm and vegetative cells of barley pollen. *Virology* 60:21-28.
- CARROLL, T.W. and MAYHEW, D.E. 1976 a. Anther and pollen infection in relation to the pollen and seed transmissibility of two strains of barley stripe mosaic virus in barley. *Can. J. Bot.* 54:1604-1621.
- CARROLL, T.W. and MAYHEW, D.E. 1976 b. Occurrence of virions in developing ovules and embryo sacs of barley in relation to the seed transmissibility of barley stripe mosaic virus. *Can. J. Bot.* 54:2497-2512.
- COSTA, A.S., KITAJIMA, E.W. e OLIVEIRA, A.R. 1961. Vírus do anel do pimentão: um integrante do grupo "rattle" do fumo (Dados não publicados).
- COSTA, A.S. e KITAJIMA, E.W. 1968. Transmissão do vírus do anel do pimentão através da semente do tomate. *Revista da Soc. Bras. de Fitopatologia* 2:25-32.
- CROWLEY, N.C. 1955. The effect of seed extracts in the infectivity of plant viruses and its bearing on seed transmission. *Australian J. Biol. Sci.* 8:56-67.
- CROWLEY, N.C. 1957. Studies on the seed transmission of plant virus diseases. *Australian J. Biol. Sci.* 10:449-464.
- CROWLEY, N.C. 1959. Studies on the time of embryo infection by seed transmitted viruses. *Virology* 8:116-123.
- CROWLEY, N.C., DAVISON, E.M., FRANCKI, R.I.B. and OWUSU, G.K. 1969. Infection of bean root-meristems by tobacco ringspot virus. *Virology* 39:322-330.
- DUGGAR, B.M. 1930. The problem of seed transmission of the typical mosaic of tobacco. *Phytopathology* 20:133 (Abstr.).

- ESAU, K. 1965. *Plant Anatomy*. Wiley International Edition. New York. 767 p.
- ESAU, K., CRONSHAW, J. and HOEFERT, L. 1967. Relation of beet yellows virus to the phloem and to movement in the sieve tube. *J. Cell Biol.* 32:71-87.
- ESAU, K. and HOEFERT, L. 1972. Ultrastructure of sugarbeet leaves infected with beet western yellows virus. *J. Ultrastruct. Res.* 40:556-571.
- GASPAR, J.O., VEGA, J. e COSTA, A.S. 1979 a. Agregados de partículas pequenas do vírus do anel do pimentão associados a mitocôndrias em tecido foliar e de antera do tomateiro. *II Congresso Paulista de Fitopatologia*. Instituto Biológico. Campinas. Resumos.
- GASPAR, J.O., VEGA, J. e COSTA, A.S. 1979 b. Observação eletrônico-microscópica do vírus do mosaico comum em pólen de feijoeiro. (Dados não publicados).
- GHABRIAL, S.A. and LISTER, R.M. 1973. Coat protein and symptom specification in tobacco rattle virus. *Virology* 52:1-12.
- HAMILTON, R.I., LEUNG, E and NICHOLS, C. 1977. Surface contamination of pollen by plant viruses. *Phytopathology* 67:395-399.
- HARRISON, B.D. and ROBERTS, I.M. 1968. Association of tobacco rattle virus with mitochondria. *J. Gen. Virol.* 3:121-124.
- HESLOP-HARRISON, J. 1966. Cytoplasmic continuities during spore formation in flowering plants. *Endeavour* 25(95):65-72.
- HESLOP-HARRISON, J. and MACKENZIE, A. 1967. Autoradiography of soluble 2-<sup>14</sup>C-Thymidine derivatives during meiosis and microsporogenesis in lily anthers. *J. Cell Sci.* 2:387-400.

- HOCH, H.C. and PROVVIDENTI, R. 1978. Ultrastructural localization of bean common mosaic virus in dormant and germinating seeds of *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology* 68:327-330.
- HORNER, H.T., Jr. and ROGERS, M.A. 1974. A comparative light and electron-microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male-sterile pepper (*Capsicum annuum*). *Can. J. Bot.* 52: 435-441.
- HORNER, H.T., Jr. 1977. A comparative light and electron-microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male-sterile sunflower (*Helianthus annuus*). *Amer. J. Bot.* 64(6):745-759.
- KARNOVSKI, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27:137.
- KARNOVSKY, M.J. 1967. The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. *J. Cell Biol.* 35:213-236.
- KITAJIMA, E.W. 1967. Morfologia das partículas do vírus do anel do pimentão e ultraestrutura dos tecidos infectados. Piracicaba, ESAQL / USP. 54 p. (Tese de Doutorado).
- KITAJIMA, E.W. and COSTA, A.S. 1969. Association of pepper ringspot virus (Brazilian tobacco rattle virus) and host cell mitochondria. *J. Gen. Virol.* 4:177-181.
- KITAJIMA, E.W. and LAURITIS, J.A. 1969. Plant virions in plasmodesmata. *Virology* 37:681-684.
- KITAJIMA, E.W., OLIVEIRA, A.R. e COSTA, A.S. 1969. Morfologia das partículas do vírus do anel do pimentão. *Bragantia* 28:1-22.
- LISTER, R.M. and MURANT, A.F. 1967. Seed-transmission of nematode-borne viruses. *Ann. Appl. Biol.* 59:49-62.

- LUNGER, P. D. and CLARK, H.F. 1978. Reptilia-related viruses. *Adv. Virus Res.* 23:159-204.
- MASCARENHAS, J.P. 1975. The biochemistry of angiosperm pollen development. *Bot. Rev.* 41(3):259-314.
- MAYHEW, D.E. and CARROLL, T.W. 1974. Barley stripe mosaic virus in the egg cell and egg sac of infected barley. *Virology* 58:561-567.
- MEDINA, A.C. and GROGAN, R.G. 1961. Seed transmission of bean common mosaic virus. *Phytopathology* 51:452-456.
- MOLLENHAUER, H.A. 1964. Plastic embedding mixtures for use in electron microscopy. *Stain Technology* 39:111-114.
- NELSON, R. and DOWN, E.E. 1933. Influence of pollen and ovule infection in seed transmission of bean mosaic. *Phytopathology* 23: 25 (Abstr.).
- NOGUEIRA, N.L. 1978. Determinação do sítio intracelular de síntese do RNA do vírus do anel do pimentão através de autoradigrafia a nível de microscopia eletrônica. Piracicaba, ESALQ/USP. 74 p. (Tese de Doutoramento).
- OLIVEIRA, A.R. 1967. Serologia aplicada ao vírus do anel do pimentão. Piracicaba, ESALQ/USP. 40 p. (Tese de Doutoramento).
- PARTRIDGE, J.E., SHANNON, L.M., GUMPF, D.J. and COLBANGH, P. 1974. Glycoprotein in the capsid of plant viruses as a possible determinant of seed transmissibility. *Nature* 247:391-392.
- REDDICK, D. and STEWART, V.B. 1918. Varieties of beans susceptible to mosaic. *Phytopathology* 8:530-534.
- REDDICK, D. 1931. La transmission du virus de la mosaïque du haricot par le pollen. 10th Congr. Intern. Pathol. Comp. p.363-366.

- ROBERTS, D.A., CHRISTIE, R.G. and ARCHER, M.C. Jr. 1970. Infection of apical initials in tobacco shoot meristems by tobacco ringspot virus. *Virology* 42:217-220.
- SHEPHERD, R.J. 1972. Transmission of viruses through seed and pollen. In: KADO, C.I., AGRAWAL, H.O., Eds. *Principles and techniques in plant virology*. Van Nostrand-Reinhold Co., New York, 688 p.
- SILVA, D.M. 1965. Estudos sobre purificação, composição e algumas propriedades do vírus do anel do pimentão. Piracicaba, ESALQ/USP. 106 p. (Tese de Livre Docência).
- TAYLOR, J.H. 1959. Autoradiographic studies of nucleic acids and proteins during meiosis in *Lilium longiflorum*. *Amer. J. Bot.* 46(7): 477-484.
- VAN DER WANT, J.P.H. und ROZENDAAL, A. 1948. Electronenmicroscopische onderzoek van het virus, dat de ratelziekten van de tabak en het stengelbont van de aardappel veroorzaakt. *Tijdschr. Plziekten* 54:134-141.
- VEGA, J. 1979. Diminuição do poder germinativo do pólen de soja (*Glycine max*) infectada pelo vírus do mosaico comum. (Dados não publicados).
- VENABLE, J. and GOGGESHALL, R. 1965. The use of a simple lead citrate stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 25:407-408.
- WEINTRAUB, M., RAGETLI, H.W.J. and LO, E. 1974. Potato virus Y particles in plasmodesmata of tobacco leaf cells. *J. Ultrastruct. Res.* 46:131-148.
- WEINTRAUB, M., RAGETLI, H.W.J. and LEUNG, E. 1976. Elongated virus particles in plasmodesmata. *J. Ultrastruct. Res.* 56:351-364.
- YANG, A.F. and HAMILTON, R.I. 1974. The mechanism of seed transmission of tobacco ringspot virus in soybean. *Virology* 62:26-37.

Figuras 1 e 2. Micrografias eletrônicas mostrando porções de células do tecido foliar de tomateiro infectado pelo VAP. Figura 1. Partículas curtas do VAP (vc) associadas a mitocôndrias (m) em célula epidérmica. pc, parede celular. 54.600X. Figura 2. Partículas longas (vl) e curtas (vc) do VAP em associação com mitocôndrias (m) em célula de parênquima clorofiliano. cl, cloroplasto. 65.200X.

Figuras 3 e 4. Secções ultrafinas de células de antera onde se observam agregados em fileiras simples e duplas, tanto de partículas longas (vl)\* como curtas (vc) do VAP. Notar, na figura 4, a desorganização mitocondrial com cristas pouco desenvolvidas e matriz escassa. m, mitocôndria. 50.500X.

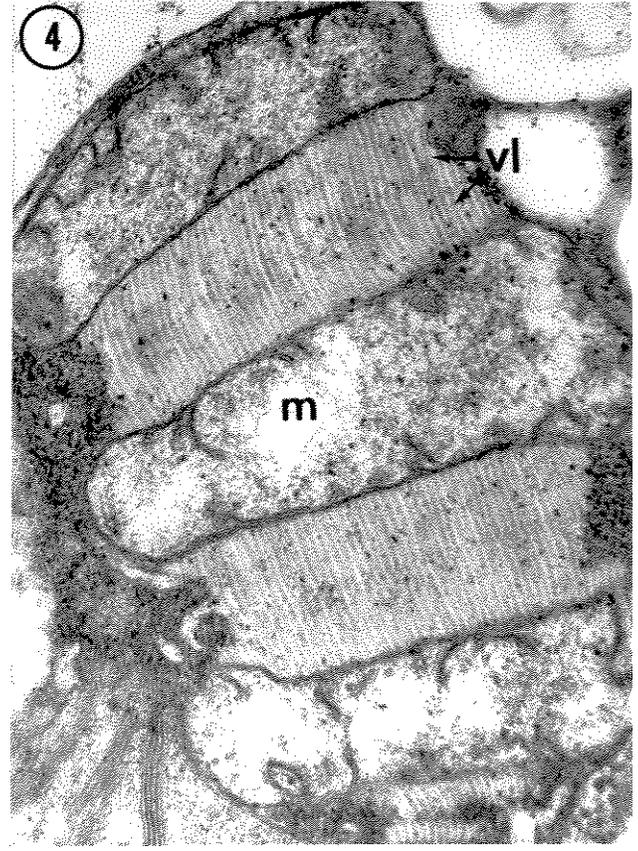
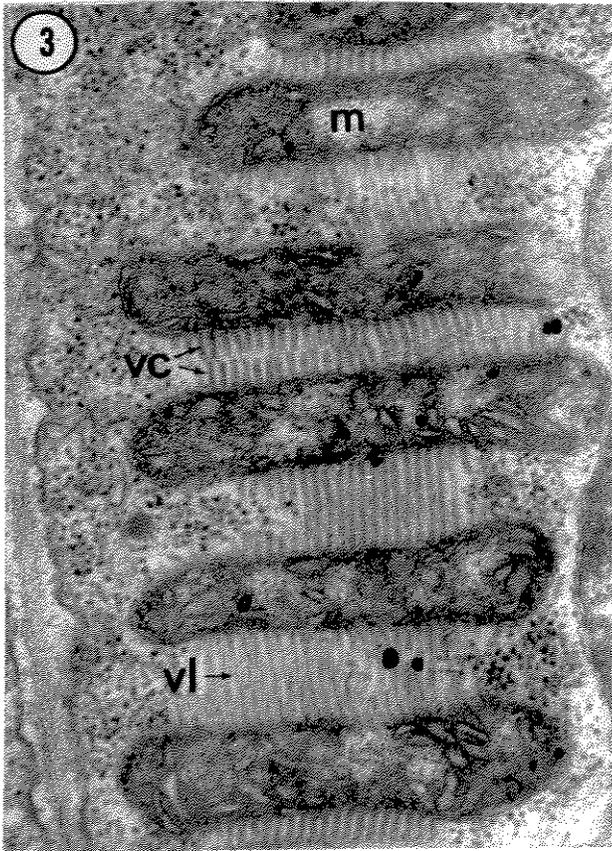
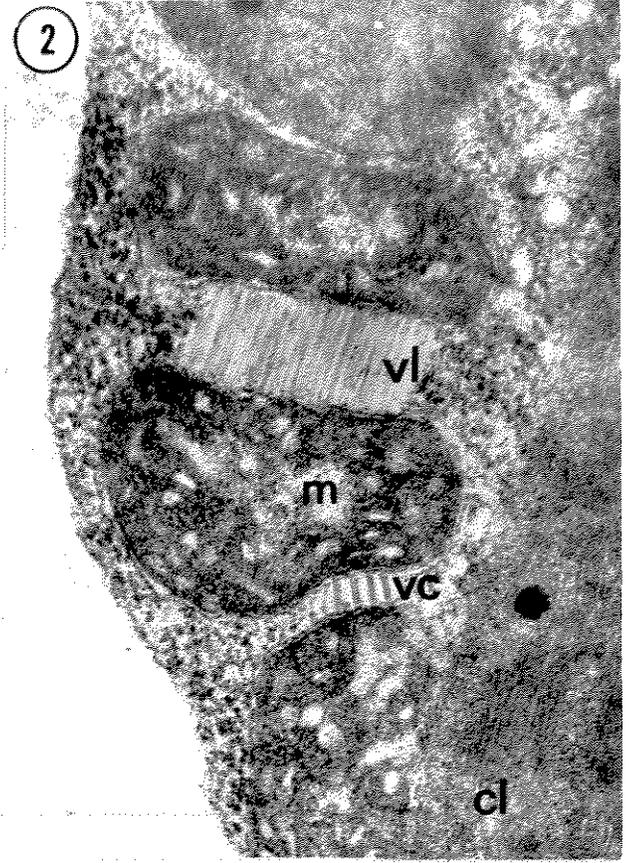
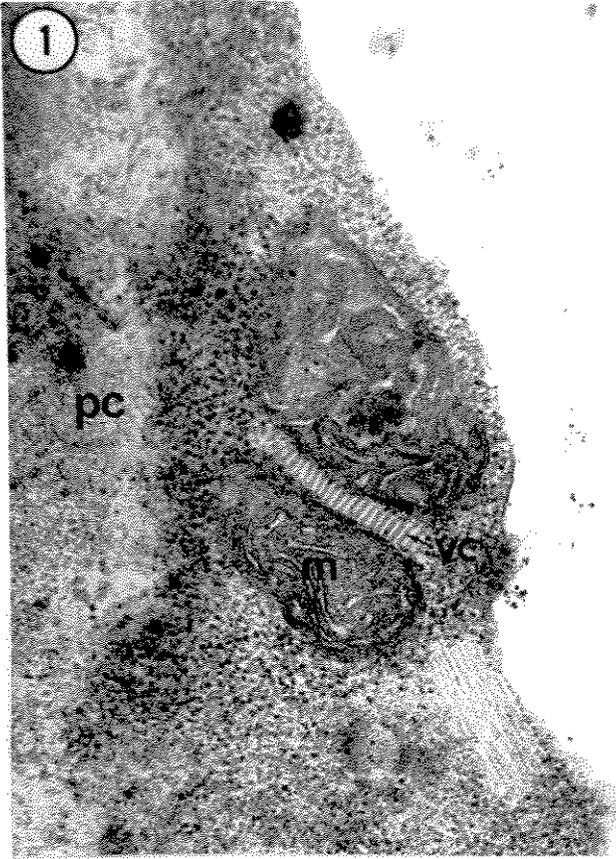
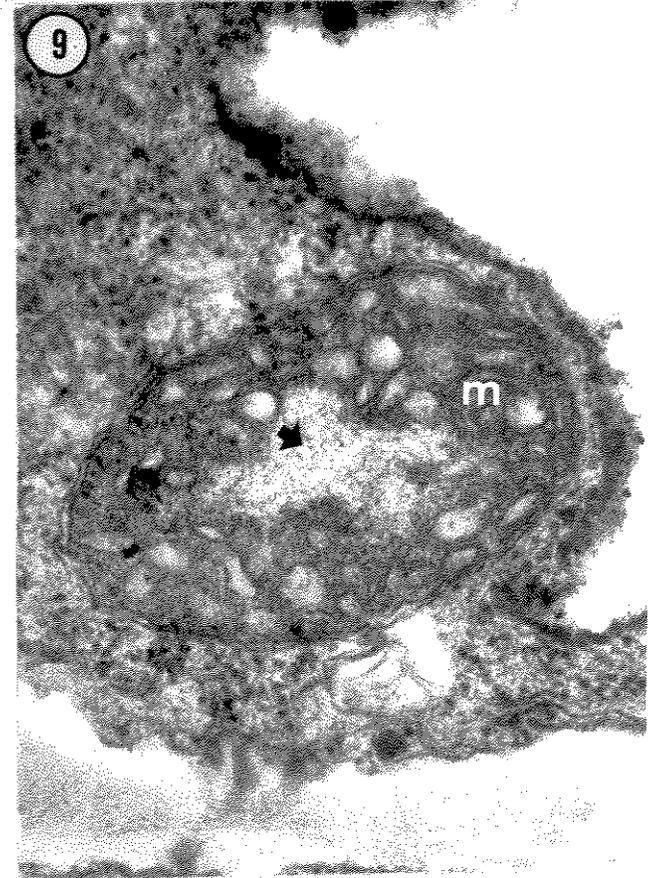
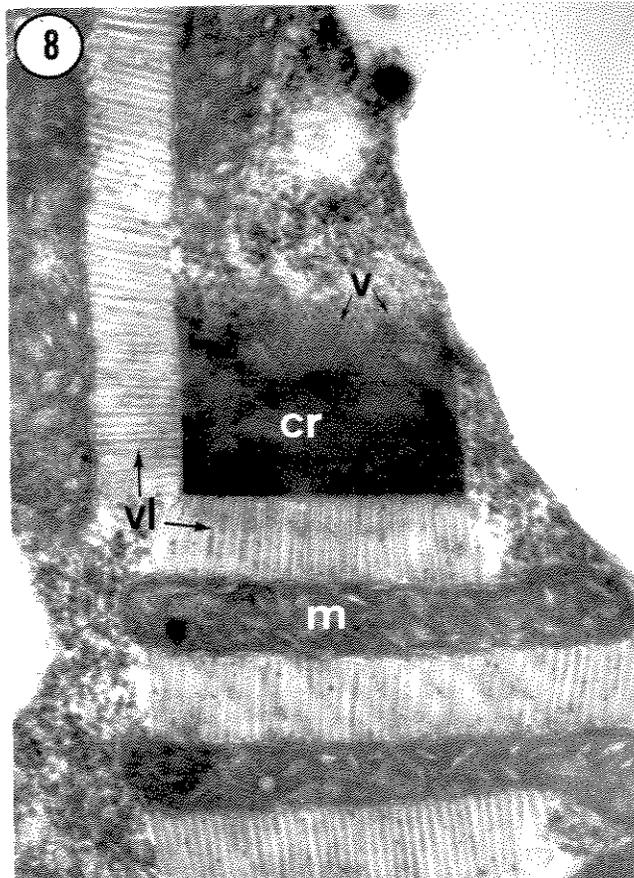
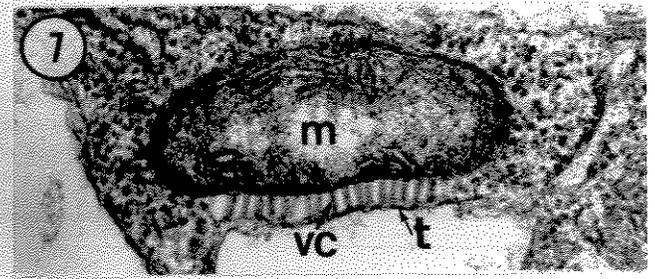
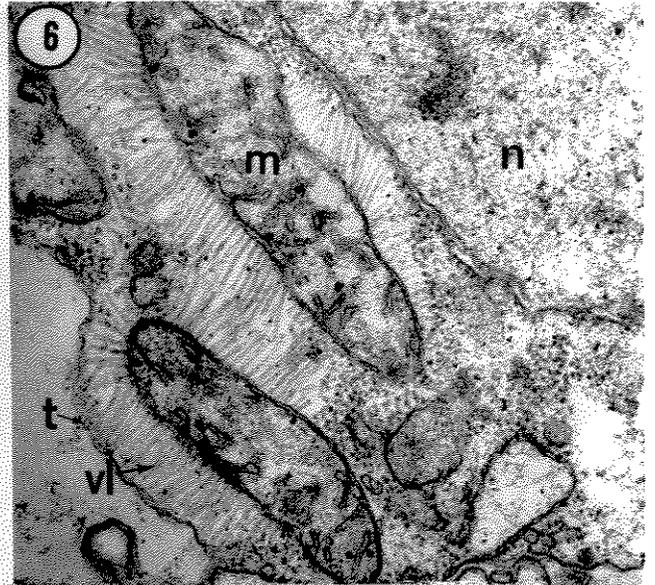


Figura 5. Secção ultrafina de célula de tecido parietal de antera de tomateiro mostrando algumas partículas do VAP (v) cortadas transversalmente e outras cortadas obliquamente. m, mitocôndria; g, complexo de Golgi. 52.000X.

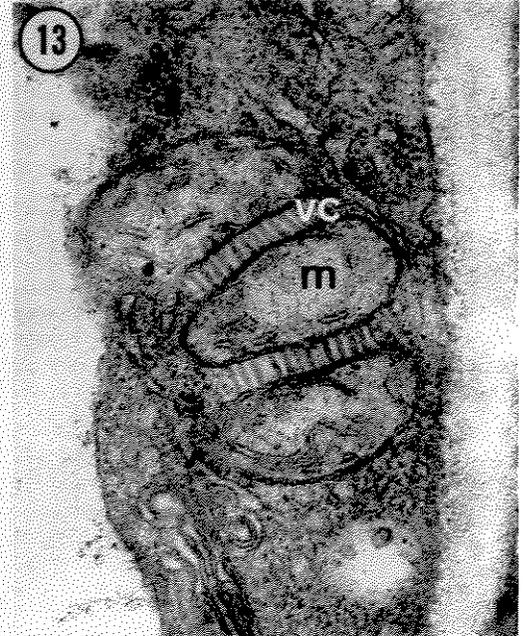
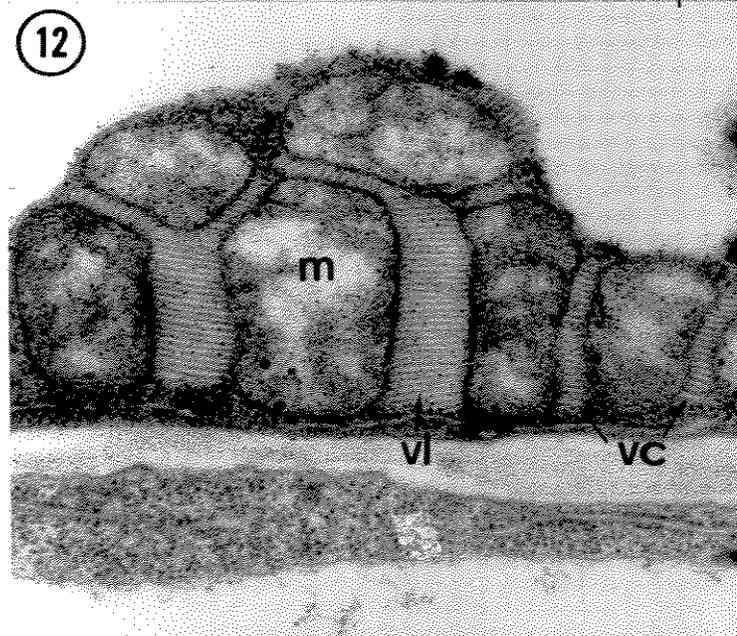
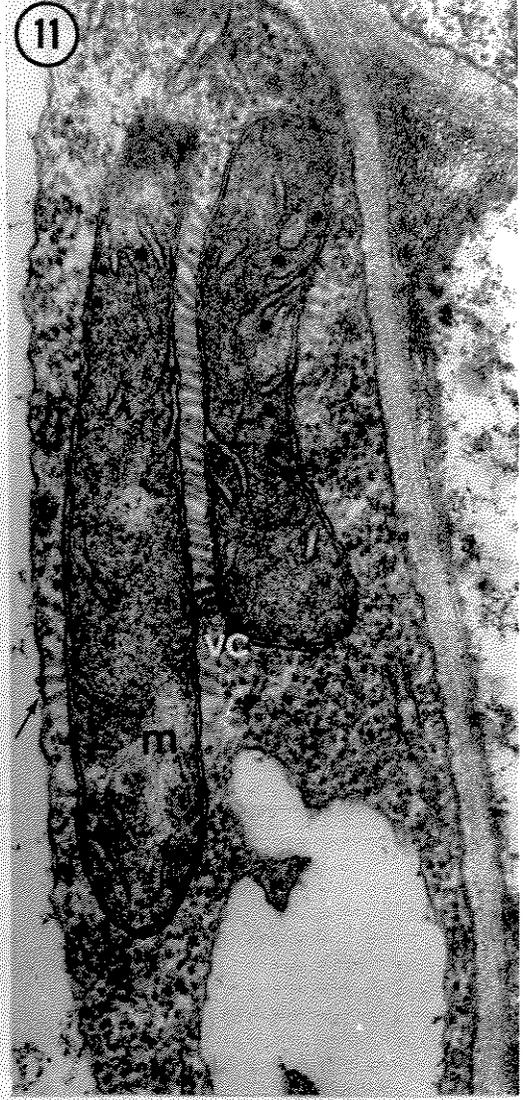
Figuras 6 e 7. Secções de células de tecido conectivo de antera. Figura 6. Ocorrência de partículas longas do VAP (vl) associadas numa extremidade com mitocôndria (m) e na outra com tonoplasto (t). n, núcleo. 35.100X. Figura 7. Partículas curtas do VAP em dupla associação com mitocôndria (m) e tonoplasto (t). 54.500X.

Figura 8. Porção de uma célula do parênquima clorofiliano foliar de tomateiro onde ocorre uma aparente associação de partículas longas do VAP (vl) com uma estrutura semelhante a cristal (cr). m, mitocôndria. Observar que as partículas virais (v) aparentam constituir, pelo menos em parte, o cristal. 55.000X.

Figura 9. Detalhes de mitocôndria (m) oriunda de planta sadia. Cristas mitocondriais, matriz e região portadora do DNA (➡). Comparar com figuras 4, 6, 10, 17 e 23. 65.900X.

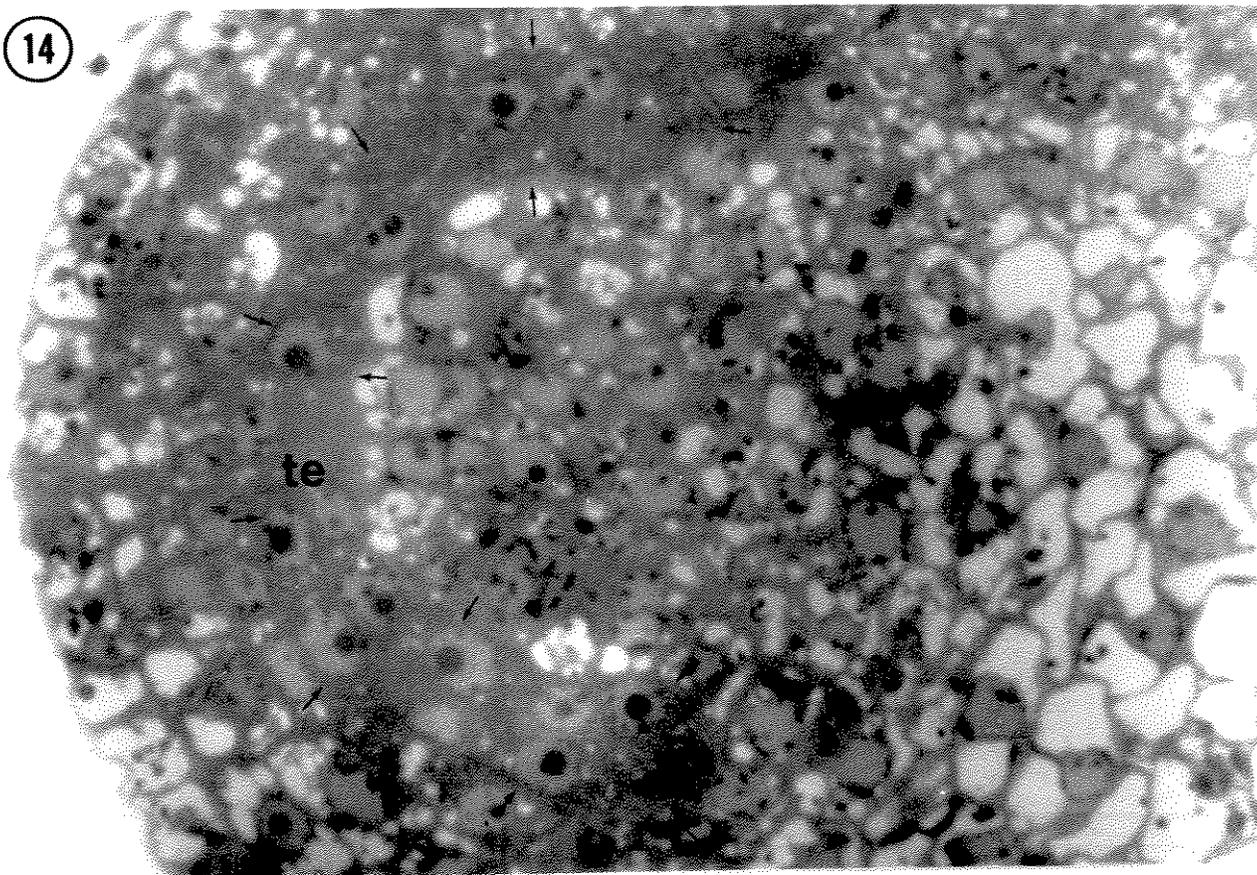


Figuras 10 a 13. Secções ultrafinas de diferentes tecidos de anteras de tomateiros. Figura 10. Presença do VAP (v1) em célula do tapetum (tap). Notar a desorganização estrutural das mitocôndrias (m). cmp, célula-mãe do grão de pólen. 21.000X. Figura 11. Partículas pequenas do VAP (vc) em associação com mitocôndrias (m) e tonoplasto (→) em uma célula do tecido conectivo. 54.600X. Figura 12. Ocorrência de partículas longas (vl) e curtas (vc) do VAP associadas a mitocôndrias (m) em célula da epiderme da antera. 45.000X. Figura 13. Partículas curtas do VAP (vc) em associação com mitocôndrias (m) em célula do tecido parietal de antera. 55.500X.



Figuras 14 e 15. Tecido esporogênico evidenciado em cortes de antera jovem de tomateiro. Figura 14. Fotomicrografia mostrando a camada de células esporogênicas (setas) em forma de meia-lua. te, tecido esporogênico. 1.750X. Figura 15. Micrografia eletrônica de antera jovem mostrando células esporogênicas (ce) pré-meióticas com citoplasma bastante denso e células do tapetum (tap) com citoplasma vacuolado. Notar a presença do VAP (v) em uma das células esporogênicas. n, núcleo.10.050 X.

14



15

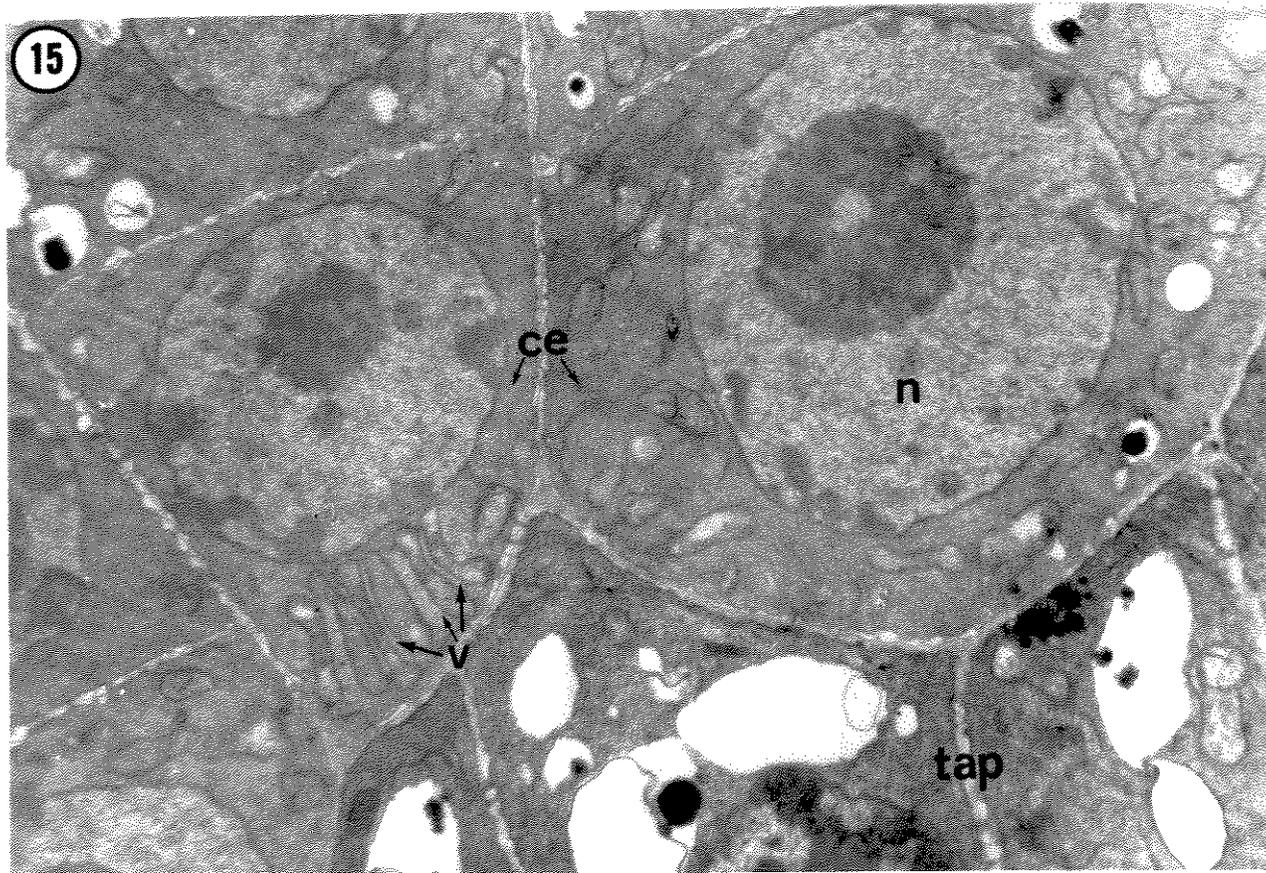
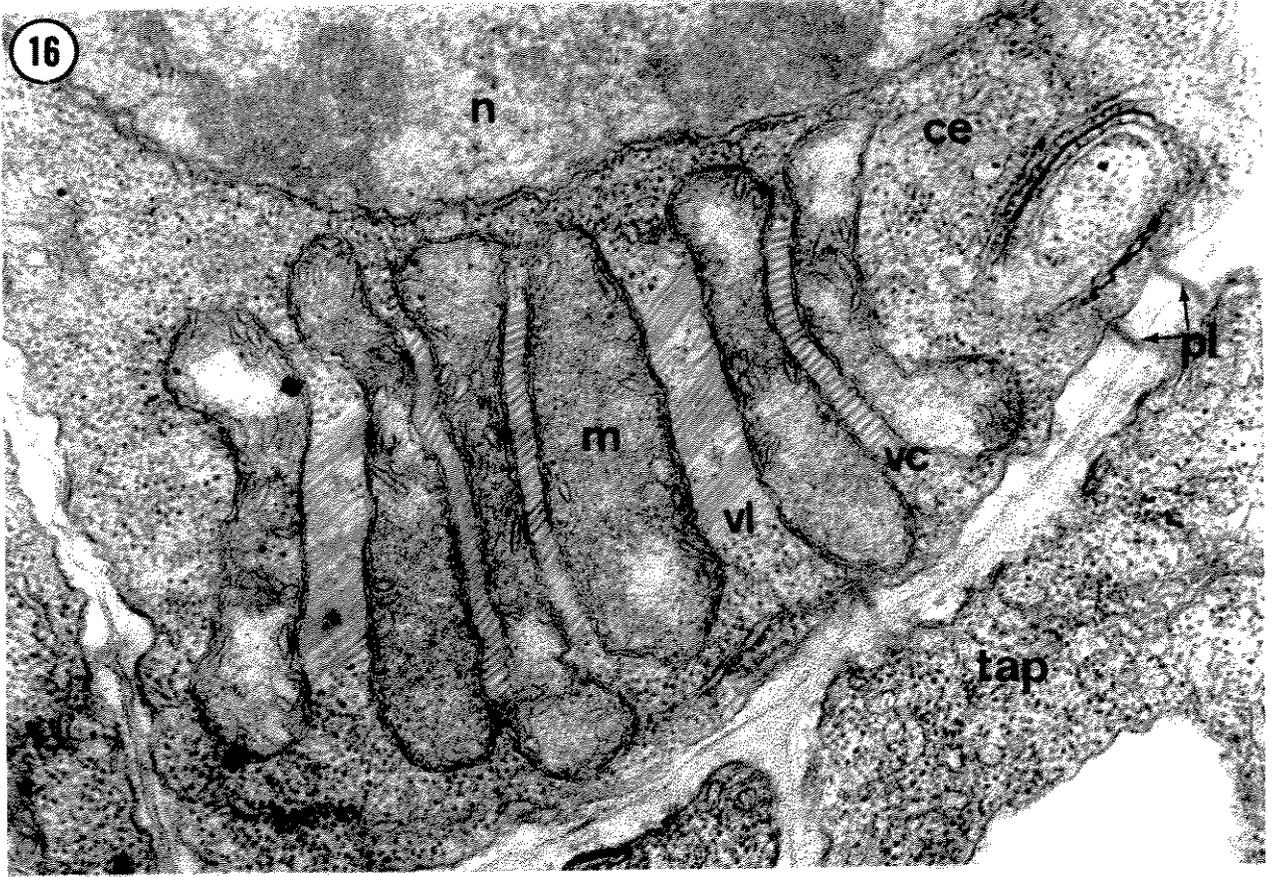


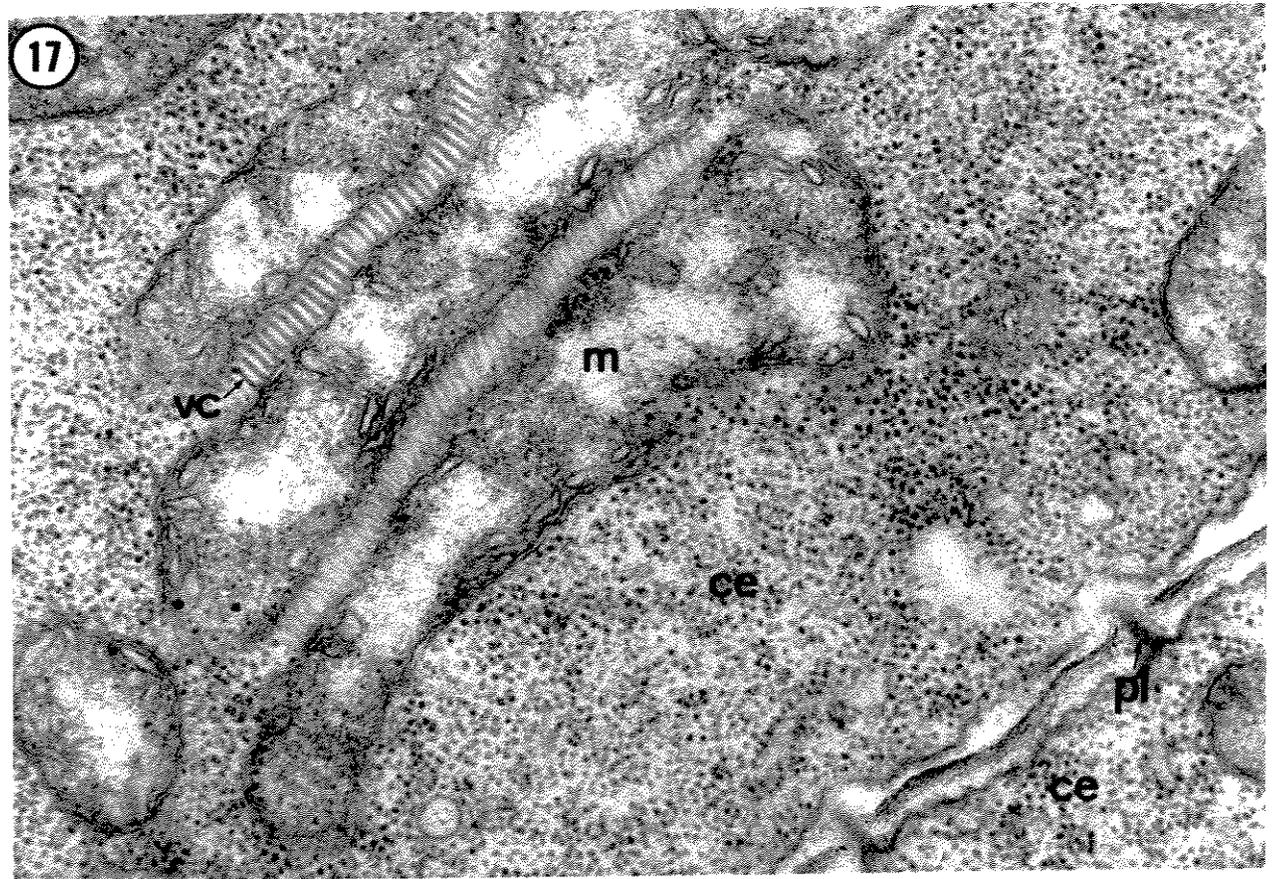
Figura 16. Detalhe de uma das células esporogênicas mostradas na figura 15. Observar a presença de partículas longas (vl) e curtas (vc) do VAP em associação com mitocôndrias (m) com o eixo maior das partículas ligeiramente inclinado em relação à membrana externa das mitocôndrias. Notar a presença de plasmodesmos (pl) conectando a célula esporogênica (ce) com uma célula do tapetum (tap). n, núcleo. 52.500X.

Figura 17. Secção ultrafina de células esporogênicas pré-meióticas mostrando partículas curtas do VAP (vc) caracteristicamente associadas a mitocôndrias (m). Observar o estado de desorganização mitocondrial. Notar a presença de plasmodesmos (pl) conectando duas células esporogênicas (ce) entre si. 72.500X.

16

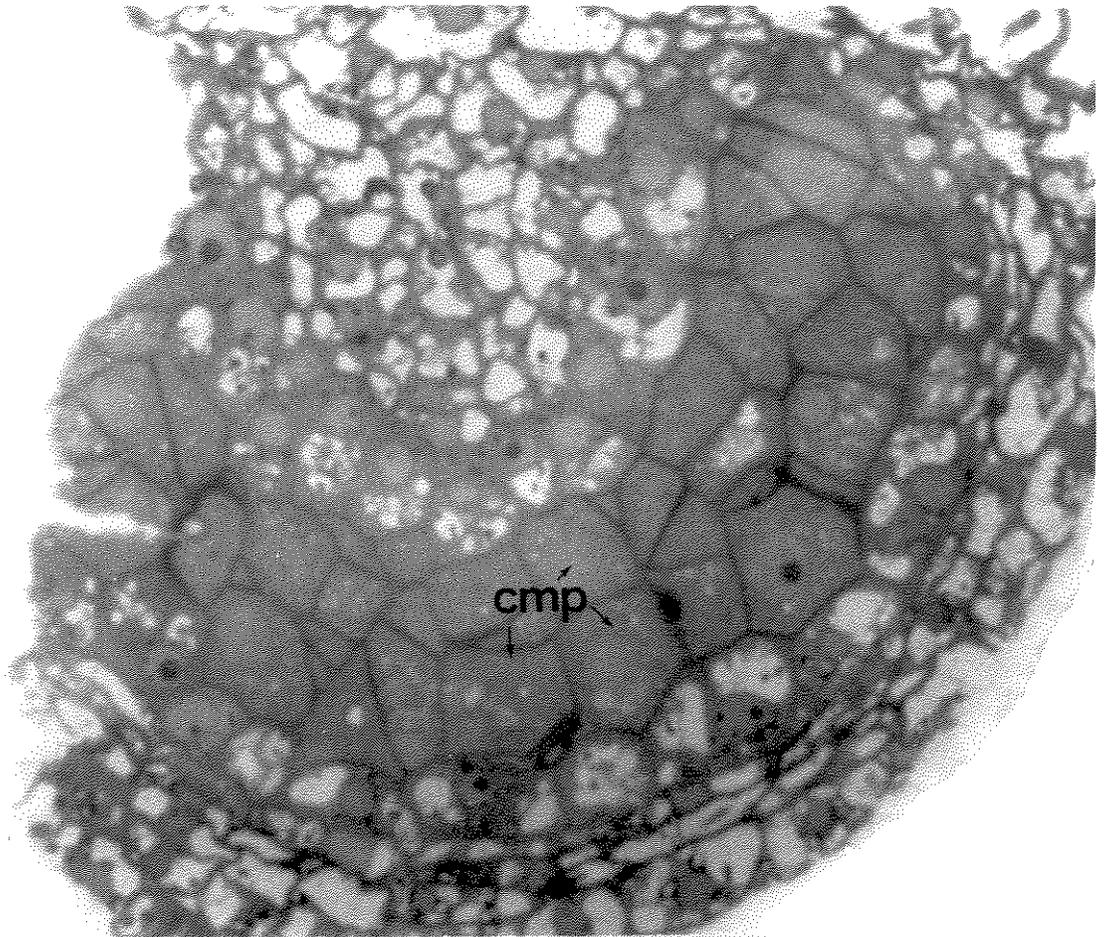


17

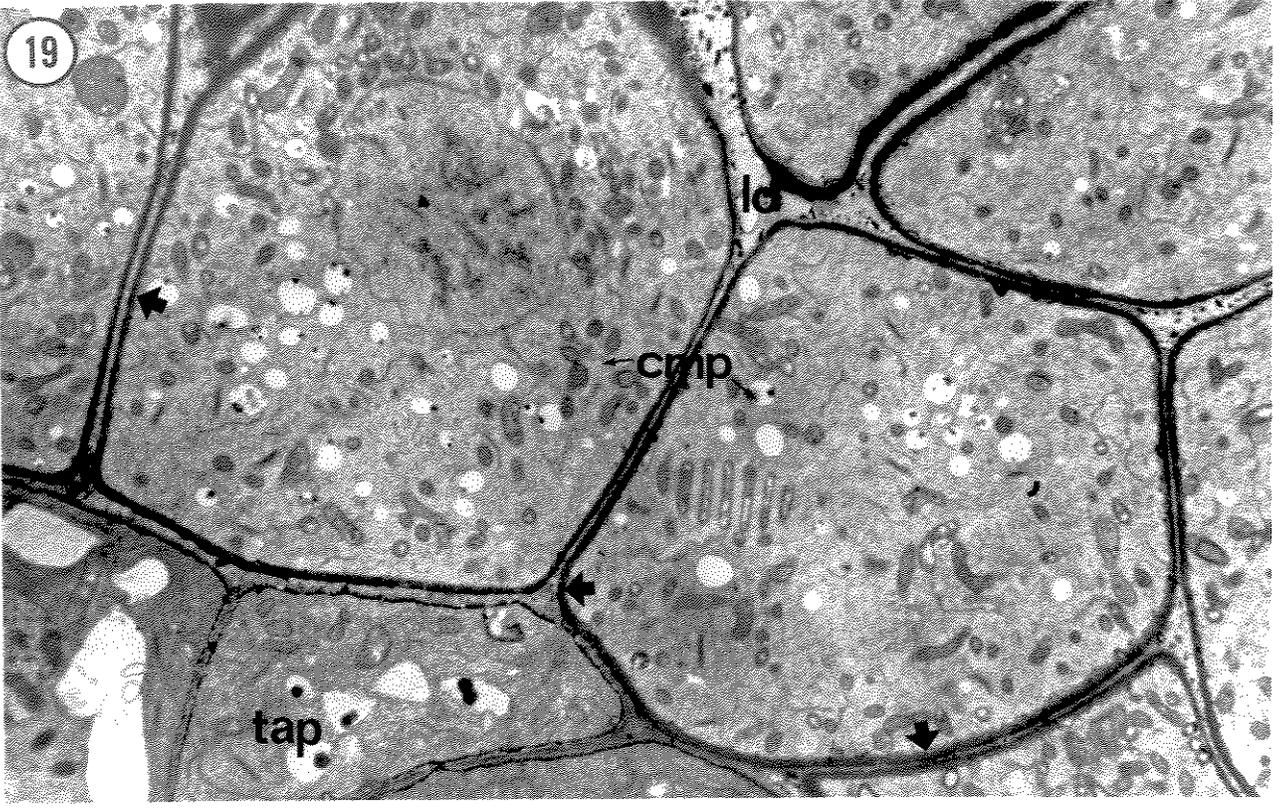


Figuras 18 e 19. Células-mães dos grãos de pólen evidenciadas em cortes de antera jovem de tomateiro. Figura 18. Fotomicrografia mostrando a presença do conjunto celular em forma de meia-lua constituído pelas células-mães dos grãos de pólen (cmp). 2.600X. Figura 19. Micrografia eletrônica mostrando células-mães dos grãos de pólen (cmp). Notar a presença de calose (➡) ao redor dessas células e a inexistência de plasmodesmos entre elas. Início de alargamento do lóculo (lo) da antera. tap, tapetum. 6.030X.

18



19



Figuras 20 e 21. Micrografias eletrônicas que ilustram o desenvolvimento das células-mães dos grãos de pólen. Figura 20. Aumento do lóculo da antera e presença da parede de calose (➡) ao redor das células-mães dos grãos de pólen (cmp). 4.500X. A figura 21 evidencia o arredondamento das células-mães dos grãos de pólen (cmp), aumento do lóculo (lo) da antera e presença de uma grossa parede de calose (➡) ao redor de cada célula-mãe do grão de pólen. 4.450X.

Figuras 22 e 23. Secções de anteras mostrando células-mães dos grãos de pólen em meiose. Figura 22. Presença de partículas longas do VAP (círculo) em célula-mãe do grão de pólen (cmp) totalmente envolvida por calose (➡). A presença da parede de calose caracteriza a célula-mãe do grão de pólen em meiose. 5.000X. A inserção mostra detalhe da associação de partículas longas do VAP (v1) com mitocôndrias(m).. 23.000X. Figura 23. Porção de uma célula-mãe do grão de pólen em meiose, evidenciando a presença de partículas longas (v1) e curtas (vc) do VAP em associação com mitocôndrias (m). 34.000X.

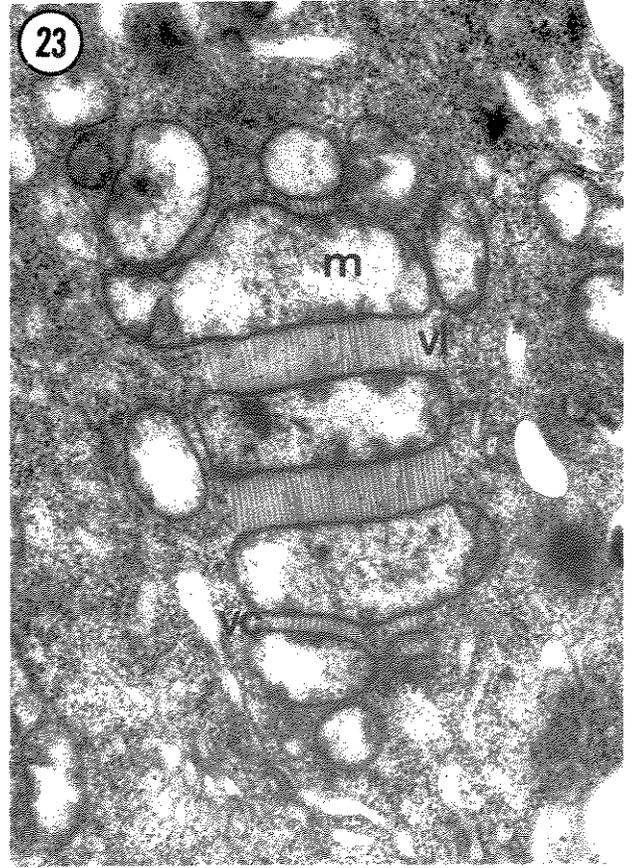
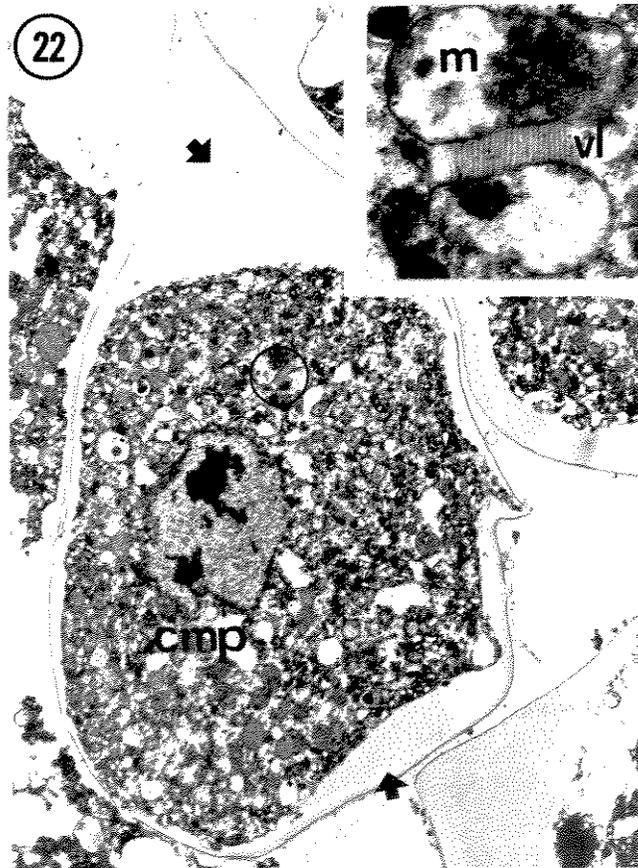
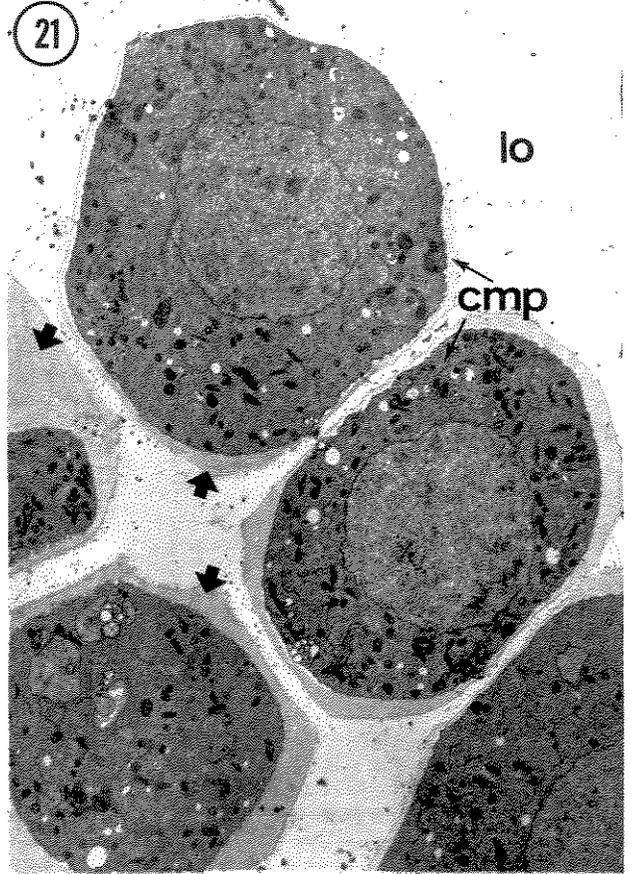
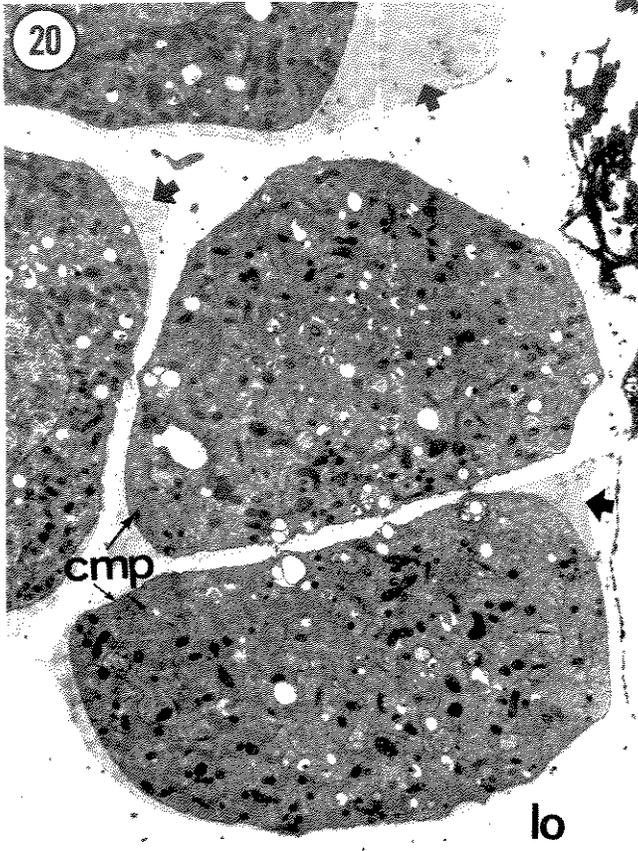
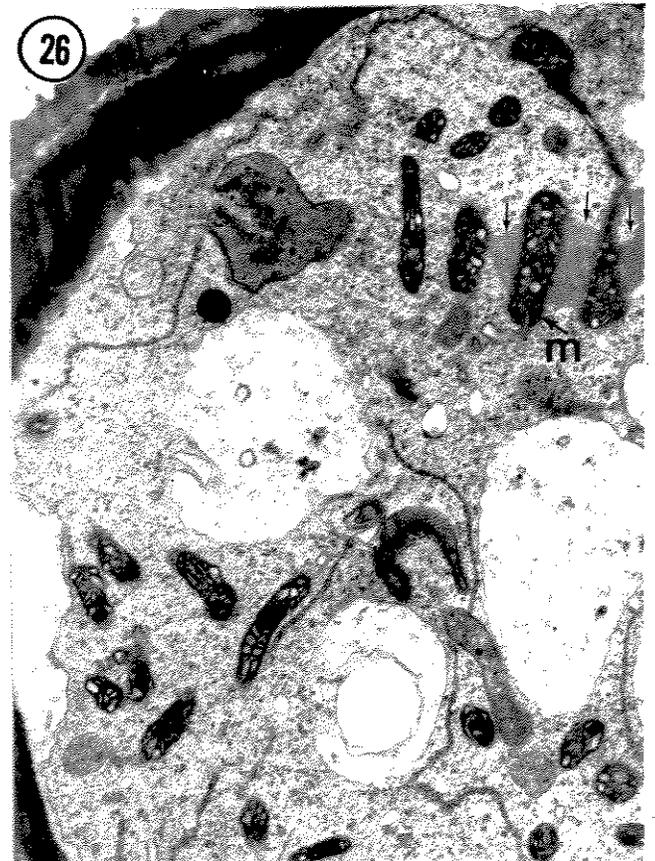
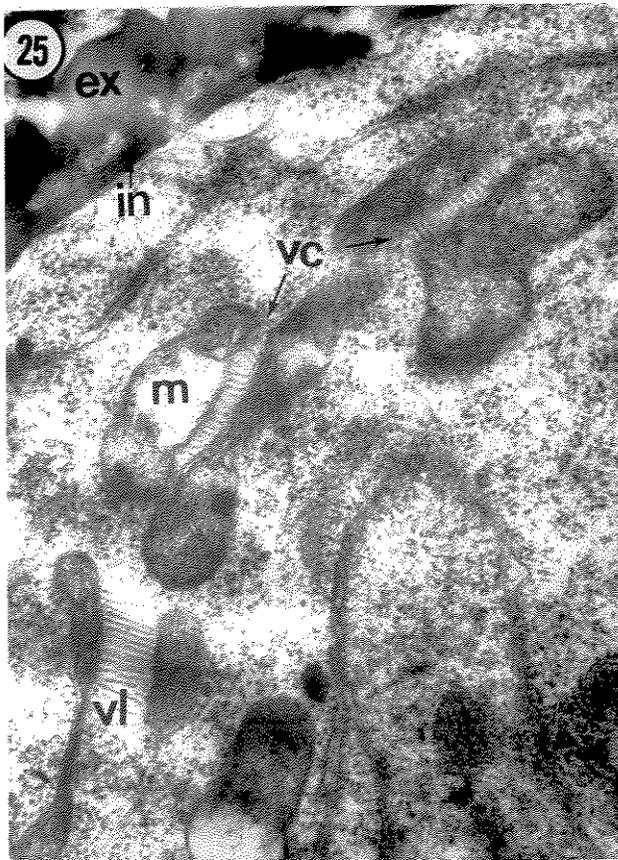
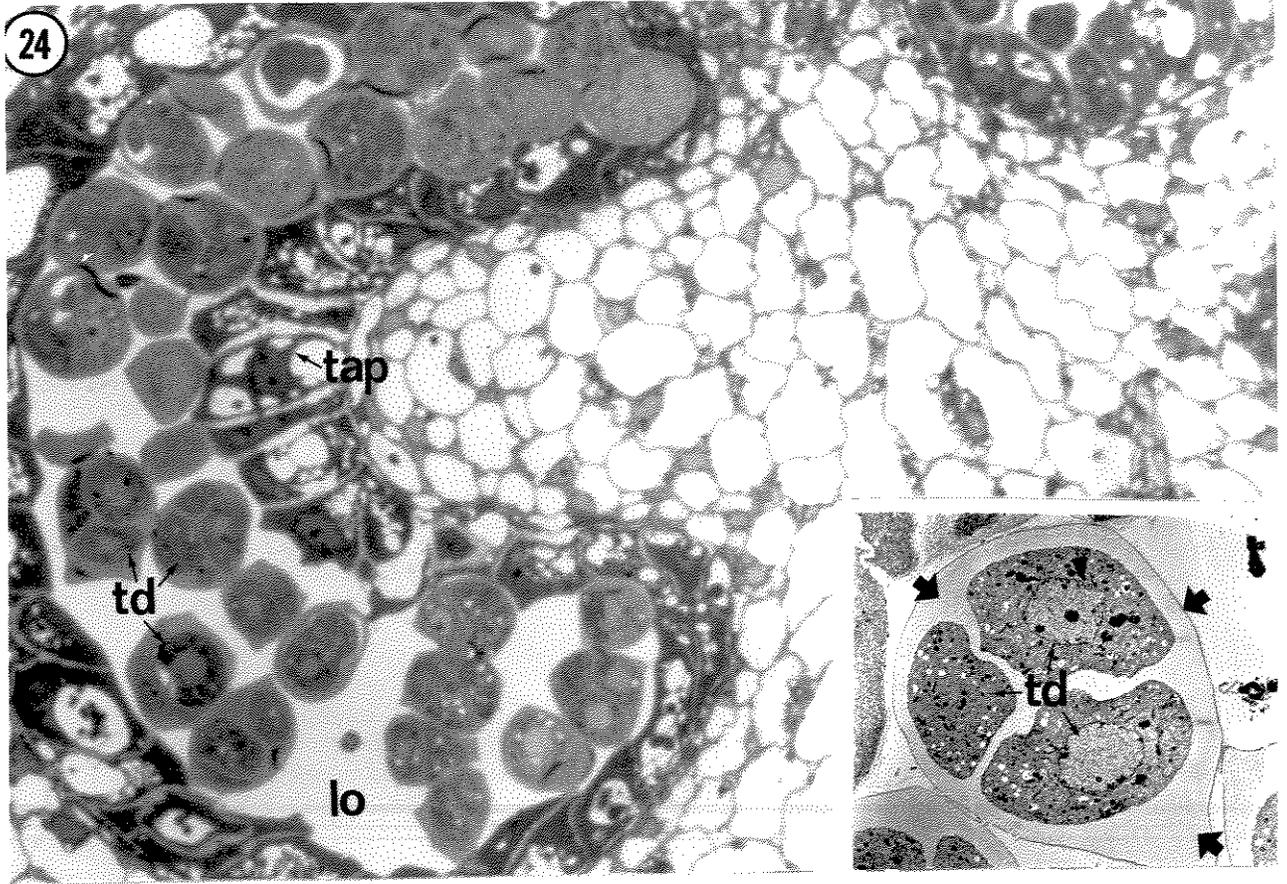


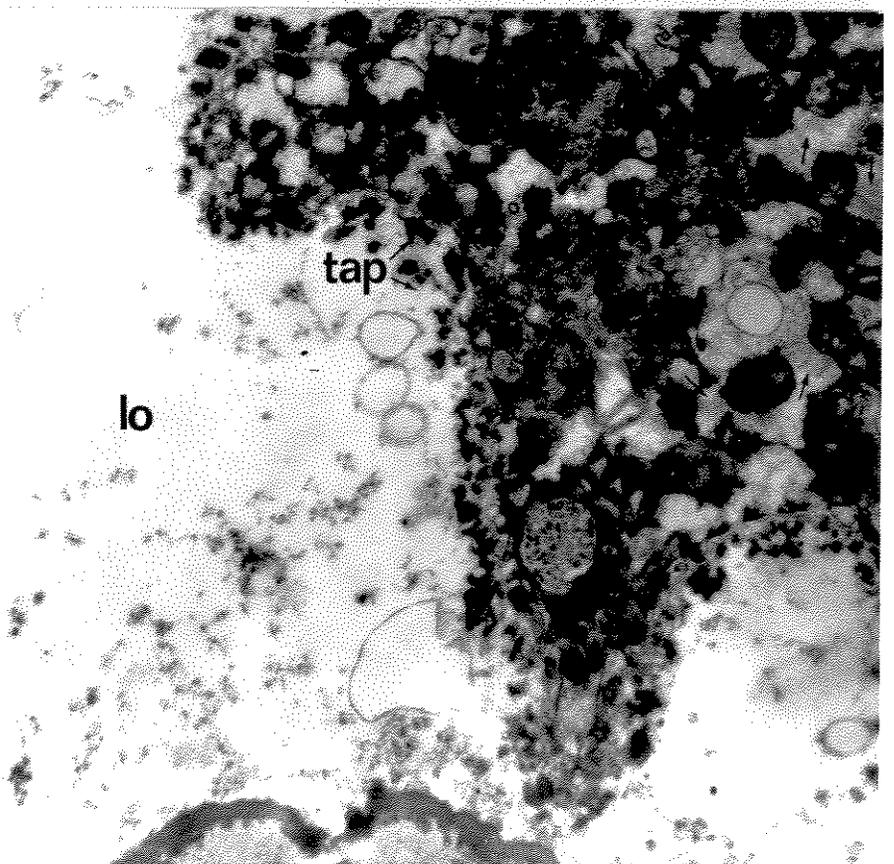
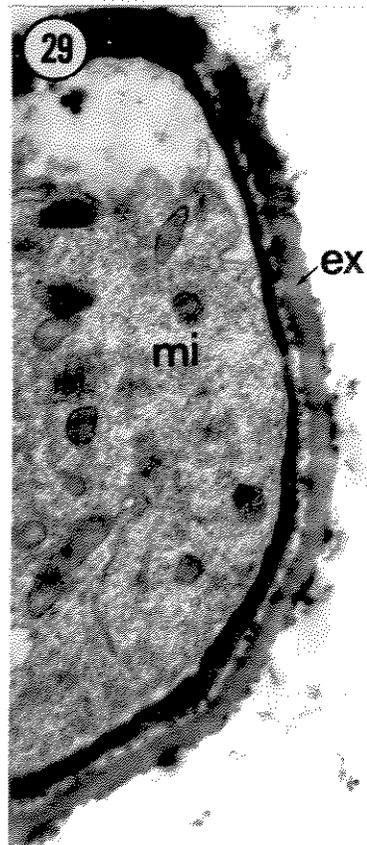
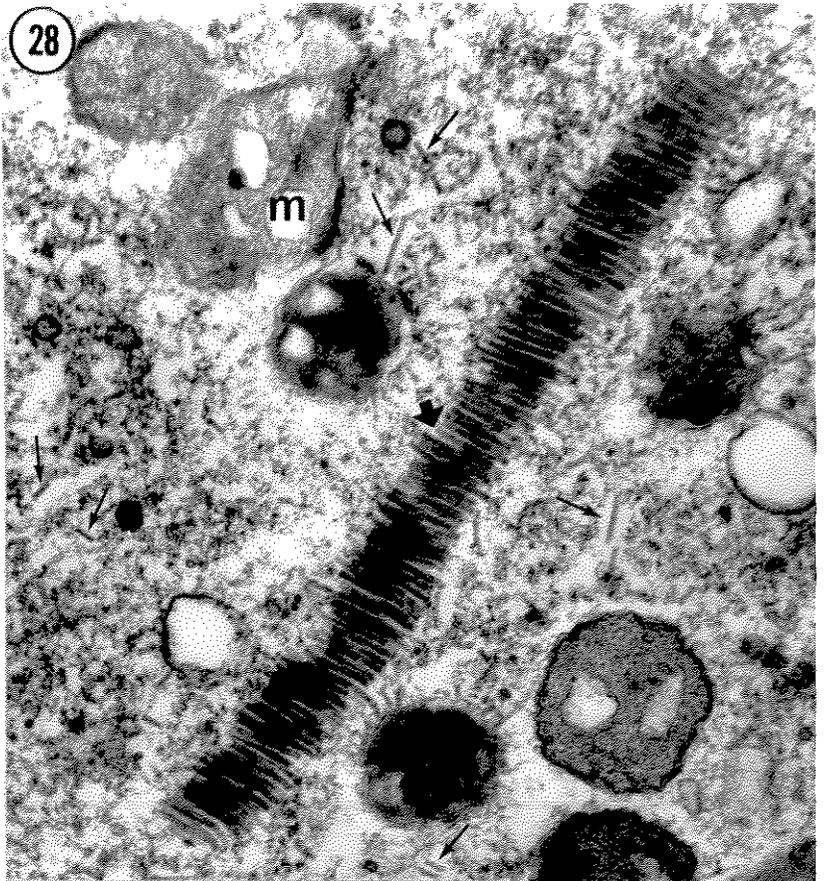
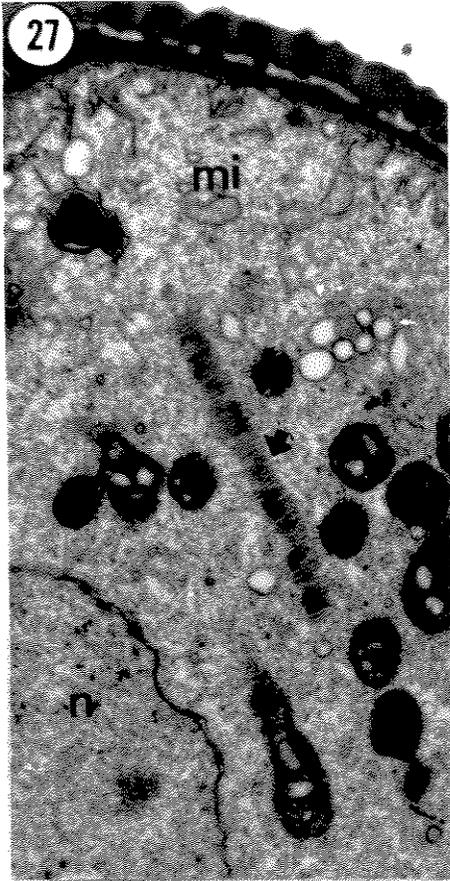
Figura 24. Fotomicrografia mostrando tétrades (td) originadas a partir da meiose ocorrida nas células-mães dos grãos de pólen. lo, lóculo; tap, tapetum. 2.330X. A inserção mostra micrografia eletrônica de uma téttrade (td) onde se pode notar a espessa parede de calose (➡) que envolve os micrôsporos da téttrade. 3.000X.

Figuras 25 e 26. Micrôsporos pré-mitóticos mostrando partículas longas e curtas do VAP em associação com mitocôndrias. Notar o citoplasma bastante denso sem distúrbios aparentes. Figura 25. Partículas longas (vl) e curtas (vc) do VAP presentes. m, mitocôndria; ex, exina; in, intina. 34.500X. Figura 26. Partículas do VAP indicadas (→). m, mitocôndria. 12.100X.



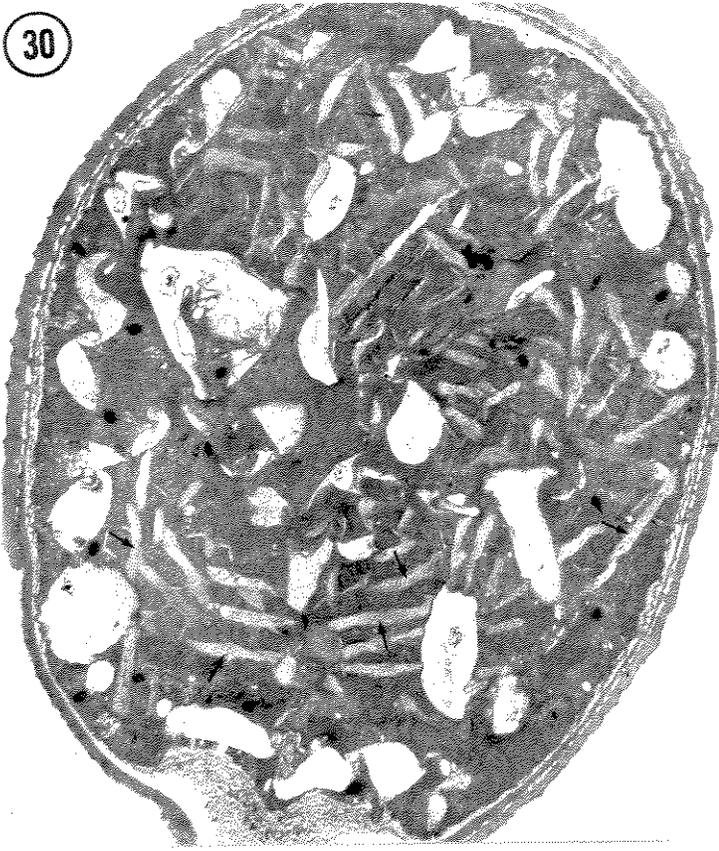
Figuras 27 e 28. Microsporo imaturo pré-mitótico mostrando a ocorrência de partículas do VAP sem associação com mitocôndrias. Figura 27. Visão geral do microsporo (mi) apresentando um feixe de partículas longas (➡) sem associação com mitocôndrias. Notar que o citoplasma apresenta-se bastante denso e não mostra evidências de desorganização. n, núcleo. 18.000X. Figura 28. Detalhe da figura anterior mostrando o feixe de partículas longas do VAP (➡) sem associação com mitocôndrias e partículas longas e curtas do vírus distribuídas ao acaso pelo citoplasma do microsporo (setas). m, mitocôndria. 51.000X.

Figura 29. Secção ultrafina de antera mostrando partículas do VAP (→) no tapetum (tap) e não ocorrência de partículas virais no microsporo (mi) próximo. A exina (ex) apresenta-se livre de partículas. lo, lóculo. 15.500X.

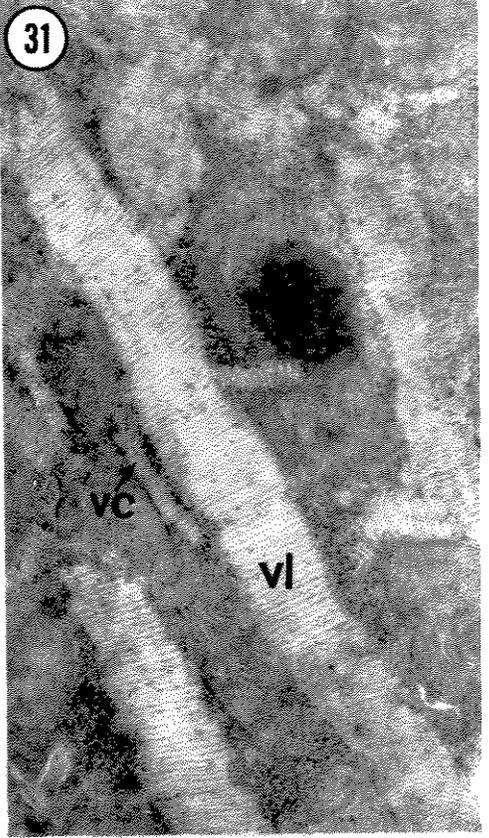


Figuras 30 a 33. Grãos de pólen maduros com ocorrência de alta concentração de partículas longas e curtas do VAP no citoplasma da célula vegetativa. Figura 30. Alguns agregados de partículas do VAP são mostrados (→). 7.700X. A figura 31 mostra um detalhe da figura anterior onde se nota alta concentração de partículas longas (vl) e curtas (vc) do VAP. 50.500X. Figura 32. Agregados constituídos por várias fileiras de partículas curtas do VAP sem associação com mitocôndrias. Também ocorrem partículas curtas associadas a esta organela celular. 12.750X. Figura 33. Detalhe da figura anterior (círculo) mostrando um agregado de partículas curtas do VAP constituído por quatro fileiras de partículas dispostas paralelamente. 109.000X.

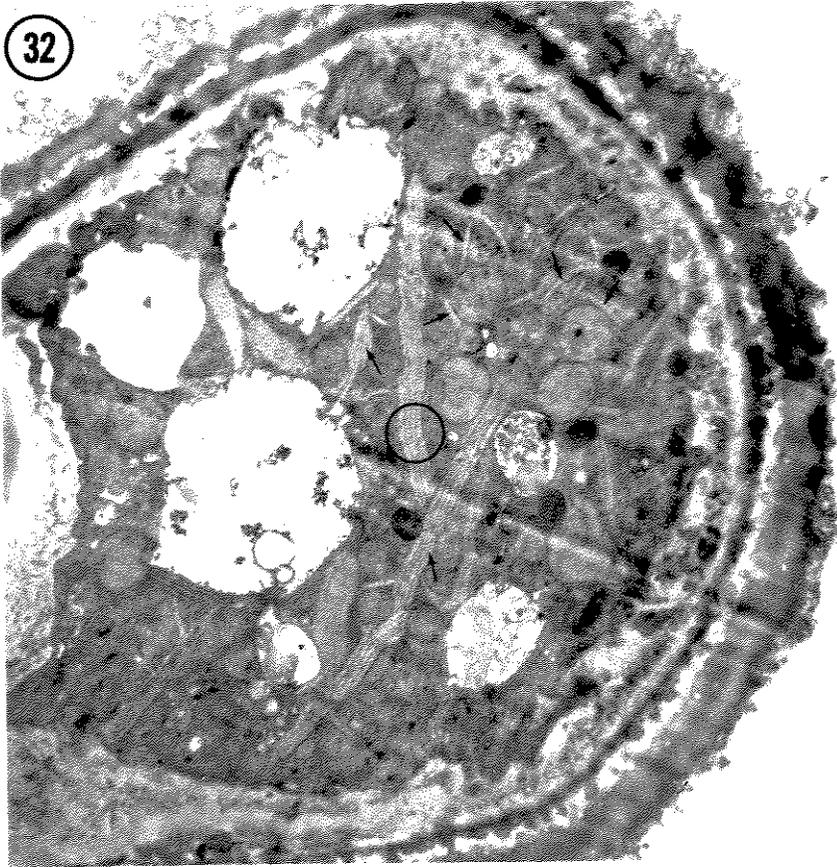
30



31



32



33

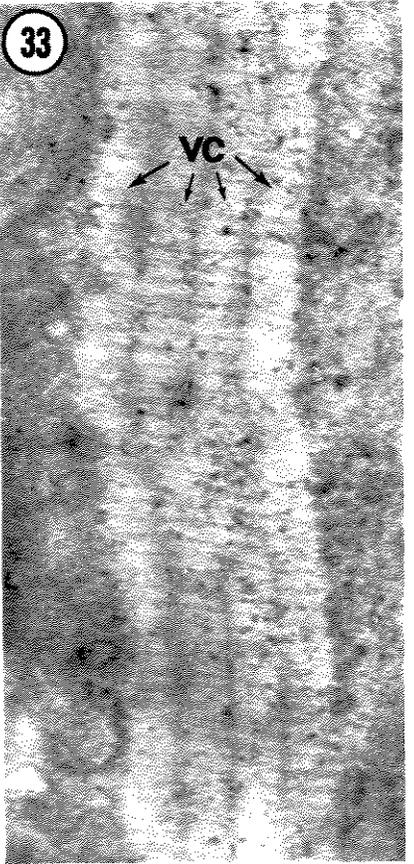


Figura 34. Grão de pólen pós-mitótico. A célula generativa (cg), fusiforme, é envolvida pelo citoplasma da célula vegetativa (cv). Presença de amido (a) como substância de reserva. n, núcleo. 8.850X.

Figuras 35 e 36. Grãos de pólen pós-mitóticos evidenciando a presença do VAP no citoplasma de células generativas. Figura 35. Partículas do VAP (v) associadas a mitocôndrias (m) no citoplasma de uma célula generativa. A parede envolvente desta célula está indicada (➡).

50.200X. Figura 36. Porção de um grão de pólen maduro onde aparece parte da célula generativa (cg) envolvida pelo citoplasma da célula vegetativa (cv). Partículas longas do VAP (vl) ocorrem associadas a mitocôndrias (m) na célula vegetativa. Partículas longas (vl) e curtas (vc), também associadas a mitocôndrias (m), são localizadas na célula generativa (cg). As setas (➡) indicam a parede envolvente da célula generativa. n, núcleo. 35.200X.

