

MARCOS C. GONÇALVES

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO LUTEOVIRUS
ASSOCIADO AO AMARELECIMENTO FOLIAR DA
CANA-DE-AÇÚCAR E ASPECTOS
FISIOPATOLÓGICOS NA PLANTA HOSPEDEIRA.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
marcos cesar
gonçalves
e aprovada pela Comissão Julgadora.

10/06/98

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

Orientador: Prof. Dr. Jorge Vega

Campinas - SP

1998

9820257

N.º UNICAMP	
G586c	
V.	Ex.
TOMBO BC/	35203
PROC.	395/98
C	☐ D ☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/09/98
N.º CPD	

CM-00117174-5

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Gonçalves, Marcos Cesar

G586c Caracterização parcial do luteovirus associado ao amarelecimento foliar da cana-de-açúcar e aspectos fisiopatológicos na planta hospedeira / Marcos Cesar Gonçalves. -- Campinas, SP: [s.n.],1998.
92f.: illus.

Orientador: Jorge Vega
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. Vírus de planta. 2. Fotossínteses. 3. Carboidratos. I. Vega, Jorge.
II. Universidade Estadual de Campinas.Instituto de Biologia. IV. Título.

Campinas, 10 de junho de 1998

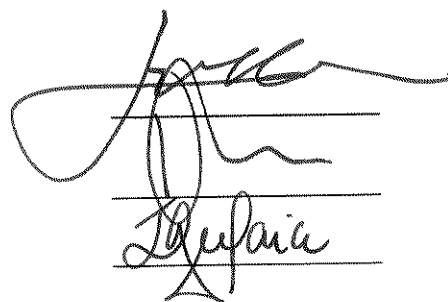
BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

Prof. Dr. Jorge Vega (Orientador)

Prof. Dr. Paulo Mazzafera

Dr. Ivan de Godoy Maia



Three handwritten signatures are present, each written over a horizontal line. The top signature is a cursive 'Jorge Vega'. The middle signature is a cursive 'Paulo Mazzafera'. The bottom signature is a cursive 'Ivan de Godoy Maia'.

SUPLENTE:

Prof. Dr. Antônio C. N. Magalhães



A single horizontal line is provided for the signature of the substitute member.

*em memória de minha mãe,
Irene.*

AGRADECIMENTOS

- Ao professor Jorge Vega, meu orientador, pela oportunidade da realização deste trabalho, por todos os conhecimentos transmitidos e pela amizade e incentivo.
- Aos professores Dr. Paulo Mazzafera, Dr. Ivan Maia e Dr. Antonio Celso N. Magalhães, pela revisão e valiosas sugestões apresentadas durante a pré-banca.
- À COPERSUCAR, em especial ao Dr. Eugênio Cesar Ulian e ao Dr. Carlos Gonzaga de Almeida;
- Ao Dr. Pedro Luis da Costa A. Alves, da UNESP/Jaboticabal;
- Ao Dr. Eduardo Caruso Machado, da Seção de Fisiologia Vegetal do IAC;
- Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP, em especial ao Dr. Ivany Ferraz Marques Válio, ao Dr. Ladaslav Sodek e à bióloga Dulce Regina Joaquim;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida;
- Aos amigos e colegas de curso, pela ajuda e sugestões no decorrer do trabalho, em especial ao Renato, à Daniele, à Mara, ao Jurandi e ao Camilo.
- À minha irmã, Carmem, pela ajuda nos períodos difíceis;
- Agradecimento especial à tia Bela, D. Isabel Gonçalves de Godoy, por todo o auxílio e carinho;
- Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desse trabalho.

ÍNDICE

RESUMO.....	i
SUMMARY.....	iii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A SÍNDROME DO AMARELECIMENTO FOLIAR DA CANA-DE-AÇÚCAR.	1
1.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS LUTEOVIRUS.....	5
1.3. ASPECTOS FOTOSSINTÉTICOS DA INFECÇÃO POR FITOVIROSES	11
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA PURIFICAÇÃO.	17
3.2. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DAS PURIFICAÇÕES.	19
3.3. PRODUÇÃO E PREPARO DE ANTI-SOROS.....	20
3.4. AVALIAÇÃO DOS ANTI-SOROS.	23
3.4.1. <i>Procedimentos para ELISA</i>	24
3.4.2. <i>Detecção imuno-histoquímica em membranas de</i> <i>nitrocelulose</i>	27
3.5. MEDIÇÕES DE FLUORESCÊNCIA.....	28
3.6. DOSAGEM DE PIGMENTOS E AÇÚCARES.....	31
3.7. MEDIÇÕES DA TAXA DE TROCA LÍQUIDA DE CO ₂	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. PURIFICAÇÕES DO VÍRUS	34
4.2. AVALIAÇÃO DOS ANTI-SOROS.	40
4.3. ALTERAÇÕES NOS TEORES DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS.	44
4.4. AVALIAÇÕES DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A.....	48
4.4.1. <i>Parâmetros da fluorescência da clorofila</i>	48

4.4.2. Cinética Transitória da Indução da Fluorescência da	
Clorofila.....	55
4.5. AVALIAÇÕES DAS TAXAS DE TROCA LÍQUIDA DE CO ₂	61
4.6. ALTERAÇÕES NOS TEORES DE AÇÚCARES	67
5. CONCLUSÕES.	74
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	76

RESUMO

A síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar constitui hoje uma preocupação mundial para a produtividade da cultura. Contudo, controvérsias ainda são levantadas sobre a sua origem e principalmente sobre a natureza do agente causal da moléstia.

Visando contribuir para o estabelecimento da etiologia da doença, o presente trabalho apresenta a purificação do luteovirus identificado em plantas com sintomas e a tentativa de produção de um anti-soro policlonal para o estabelecimento de um método seguro de diagnóstico.

As alterações na fisiologia da planta provocadas pelo patógeno, refletindo ou não em sintomas visíveis, foram estudadas por monitoramento da eficiência fotossintética e dos conteúdos de pigmentos fotossintetizantes e carboidratos fotoassimilados.

O método de purificação avaliado ofereceu uma boa eficiência, sendo obtidas razões $A_{260}/A_{280}=1,8$ e concentrações de $100\mu\text{g/ml}$ de partículas virais de formato isométrico de ca. 25nm . Os anti-soros policlonais produzidos, porém, não foram úteis para detecção serológica do vírus, sendo constatada uma forte reação cruzada com plantas sadias em testes PTA-ELISA, DAS-ELISA e "Tissue-Blotting".

Foram encontradas reduções nos teores de pigmentos fotossintetizantes e na razão $\text{Cl}a/\text{Cl}b$, indicando alterações na estrutura e função dos cloroplastos em plantas infectadas.

Ocorreu diminuição da atividade fotossintética, em termos da taxa de troca líquida de CO_2 , principalmente sob altos níveis de radiação fotossinteticamente ativa.

As plantas infectadas também apresentaram fotoinibição e alterações em algumas etapas do transporte eletrônico no PSII durante o preenchimento do "pool" de PQ.

Houve acúmulo de açúcares nas folhas de plantas infectadas, provavelmente devido à presença do vírus nas células do floema foliar. O açúcar de maior acúmulo foi a sacarose, devido à interferência no seu carregamento e/ou transporte no floema. Essas alterações nas relações fonte-dreno aliadas à queda na eficiência fotossintética foram interpretadas como os principais responsáveis pela quebra de produção da cultura.

SUMMARY

PARTIAL CHARACTERIZATION OF SUGARCANE LEAF YELLOWING
ASSOCIATED LUTEOVIRUS AND PHYSIOPATHOLOGICAL ASPECTS OF THE
HOST PLANT.

The sugarcane yellow leaf disease has become a serious problem in most sugarcane growing countries. In recent studies, luteovirus-like particles present in the phloem companion cells have been found in symptomatic plants (VEGA et al., 1997).

This work was intended to obtain adequate amounts of purified particles to immunize animals against the virus, along with additional studies for its characterization. Polyclonal antisera were obtained by injecting rabbits and chickens with purified virus. Physiological aspects of the infected plants were also studied by monitoring photosynthetic processes using chlorophyll fluorescence and gas exchange analysis, changes in photosynthetic pigment levels and carbohydrate determinations in the leaves.

The best purifications were obtained using a final centrifugation for 3 hours at 35000 rpm in density gradients of 5 and 10% sucrose, 5,10,15 and 20% Cs_2SO_4 in a 10% sucrose solution. Concentration of particles were around 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and the 260/280 ratio of 1,8. Absorbance spectra at UV, after fractionating, presented curves characteristic of polyhedral particles with peaks at 260nm. Electron microscopy of fractions with higher A_{260} showed a great number of isometric

isometric particles of ca. 25nm. Antisera obtained did not offer a good tool for diagnosis, since cross-reaction against healthy plants were frequently found in PTA-ELISA, DASI-ELISA and Tissue-Blotting.

Levels of chlorophylls *a* and *b*, and carotenoids were reduced in infected plants as well as the ratio chl*a*/chl*b*. It seems likely that these alterations are partially responsible for the reductions found in net rates of gas exchanges, by the photoinhibition and modifications on redox state of primary and secondary electron acceptors of photosystem II, QA and QB, during the filling up of the plastoquinone pool (PQ).

Accumulations of carbohydrates, especially sucrose, were found in the leaves. The presence of the virus in phloem cells is thought to impair the loading and/or transport of sugars in the phloem, inducing their accumulations in the leaves.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar.

O amarelecimento foliar da cana-de-açúcar (AFCA) (VEGA, 1994; VEGA & SCAGLIUSI, 1994) se tornou um problema preocupante para a cultura canavieira no Brasil nos últimos anos. No estado de São Paulo, onde foram relatados os primeiros casos de amarelecimento, a variedade SP71-6163, lançada comercialmente em 1983 pela COPERSUCAR, foi a primeira a apresentar os sintomas da moléstia. Essa variedade, uma das mais susceptíveis ao amarelecimento, teve seu plantio expandido no estado a partir dos anos de 1987/88, quando divulgado o seu elevado teor de sacarose (RENÉ A. SORDI, dados não publicados).

Em 1989 deram-se os primeiros relatos dos sintomas típicos da moléstia - amarelecimento da nervura central na face abaxial, seguido do limbo foliar e seca progressiva das folhas do ápice para a base - na região de Ourinhos, no sul do estado (RENÉ A. SORDI, dados não publicados). No ano seguinte, a mesma sintomatologia foi verificada na Estação Experimental COPERSUCAR em Piracicaba, constatando-se também um pequeno desenvolvimento radicular e um conseqüente nanismo das plantas afetadas. Em 1991 esses sintomas já expandiam-se por vários talhões comerciais na região de Piracicaba.

Em 1992, quando a SP71-6163 já alcançava 470.000 ha plantados, o que equivalia a 22% da área total da cultura no

estado, o amarelecimento atingia novos municípios, como Araraquara, Jaboticabal e Pradópolis. Mas foi em 1993 que a moléstia assumiu caráter epidêmico, com proporções alarmantes na SP71-6163 e já incidindo sobre outras variedades. Nesse mesmo ano houve o primeiro caso fora de São Paulo, no estado do Espírito Santo. Nos anos seguintes novos casos começaram a ser relatados nos diversos estados brasileiros produtores de cana-de açúcar, constituindo-se atualmente uma preocupação nacional.

O acompanhamento da evolução dos sintomas da moléstia na variedade SP 71-6163 revela que as folhas mais jovens não apresentam sintomas visíveis, os quais evidenciam-se apenas nas folhas inteiramente formadas. Segundo VEGA *et al.* (1997), o intenso amarelecimento da nervura central na face abaxial (Figura 1) inicia-se normalmente a partir da quarta folha mais jovem. Folhas mais velhas, sexta ou sétimas a partir do ápice, também mostram uma coloração vermelha (Figura 2) na face adaxial da nervura central. Subseqüentemente, uma perda de pigmentação distribui-se pela lâmina foliar, progredindo do ápice para a base da folha, sendo eventualmente seguida pela necrose do tecido. As raízes e colmos mostram crescimento reduzido e, conseqüentemente, a produção é significativamente prejudicada. Sintomatologia similar tem despertado preocupação em outras partes do globo, tendo sido descrita para algumas variedades no Havaí (SHENK & HU, 1991), Austrália (Anônimo, 1994) e em outros países produtores de cana-de-açúcar (VEGA *et al.*, 1997).

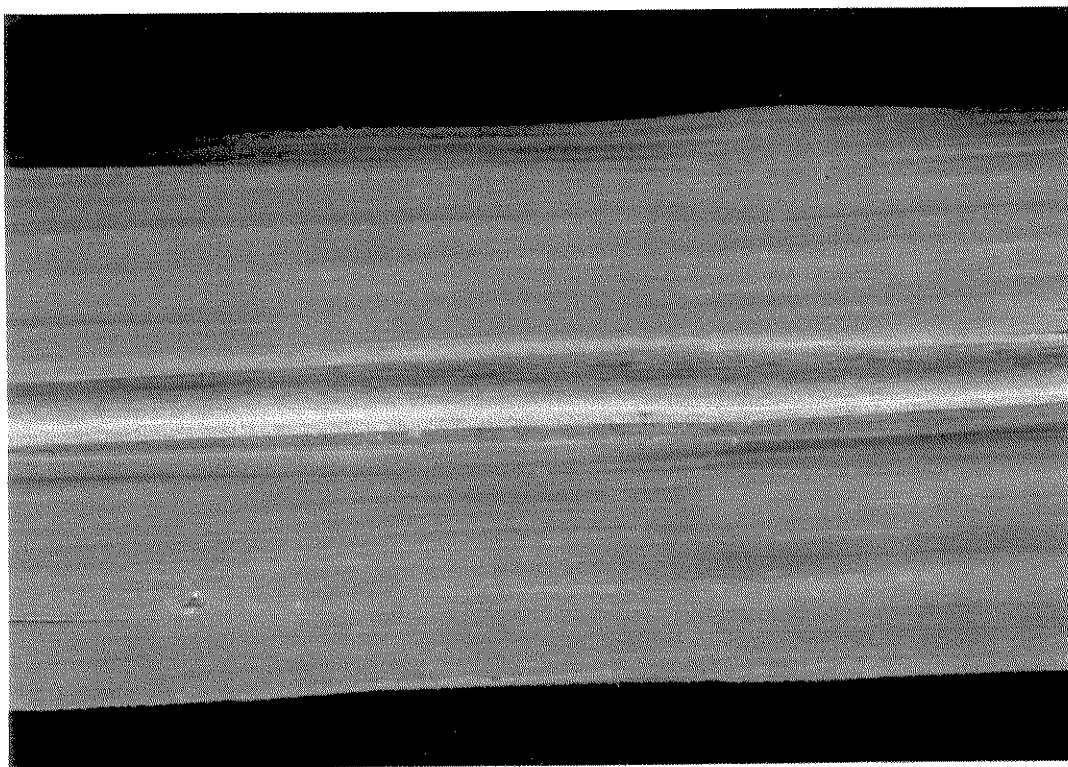


Figura 1. Folha de cana-de-açúcar da variedade SP71-6163 com o sintoma típico da moléstia: amarelecimento da nervura central na face abaxial da folha.



Figura 2. Folha de cana-de-açúcar da variedade SP71-6163 com sintomas avançados da infecção: coloração vermelha da nervura central na sua face adaxial.

Na tentativa do estabelecimento da etiologia da doença várias hipóteses têm sido levantadas, variando desde fatores edafoclimáticos à infestação por patógenos diversos, como fungos e nematóides. Estudos recentes realizados por VEGA (1994) e VEGA *et al.* (1997) em plantas com sintomas, mostraram a presença de alterações no floema que sugerem o envolvimento de um patógeno associado a esse tecido condutor. Microscopia de luz usando iluminação de epifluorescência evidenciou um material fluorescente verde-amarelo anormal no floema, raramente observado em plantas controle. Tentativas de purificação permitiram a observação ao microscópio eletrônico, de partículas isométricas de cerca de 25nm de diâmetro, em concentração muito baixa. O exame de seções finas de tecido floemático mostrou que as células-companheiras continham partículas semelhantes a vírus e apresentavam alterações citológicas aparentemente relacionadas ao desenvolvimento da infecção por vírus. Testes de microscopia eletrônica de imunoadsorção (ISEM) denotaram uma fraca reação serológica dessas partículas com um anti-soro para o vírus do nanismo amarelo da cevada serotipo PAV ("Barley Yellow Dwarf Virus-PAV", BYDV-PAV), espécie tipo do gênero Luteovirus (WATERHOUSE *et al.*, 1988). Imunolocalização em membranas de nitrocelulose com a técnica de "Tissue Printing" usando o mesmo anti-soro, mostrou uma reação fraca, mas claramente positiva no floema. Análises de PTA-ELISA ("Plate-trapped Antigen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay") com o anti-soro BYDV-PAV também indicaram uma fraca reação serológica entre esse luteovírus e o vírus associado ao AFCA.

1.2. Características gerais dos luteovirus.

Os luteovirus foram inicialmente reconhecidos como um grupo pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Viroses em 1976 (SHEPHERD et al., 1976), a partir de três viroses com características em comum. Desde então, muitos vírus foram e continuam sendo classificados como espécies do gênero Luteovirus com base no círculo de hospedeiras, relações com os vetores, morfologia das partículas, relações serológicas e, mais recentemente, estrutura das partículas e homologias no ácido nucléico (WATERHOUSE et al., 1988; DARCY et al., 1989; MARTIN & D'ARCY, 1990 apud MARTIN et al., 1990). As partículas virais têm formato poliédrico, com diâmetro entre 25 e 30 nm, com o capsídeo formado por um único polipeptídeo de 22 a 23 kDa e o genoma constituído de uma molécula RNA fita simples (ssRNA) de senso positivo com 5,7-5,8 kb (KITAJIMA et al., 1997, MILLER & RASOCHOVÁ, 1997)

O nome do gênero, previamente denominado grupo luteovirus (FRANCKI et al., 1991), é derivado do latim *luteus*, que significa amarelo, uma alusão aos sintomas de amarelecimento provocados nas suas hospedeiras (FRANCKI et al., 1985). Os sintomas induzidos por luteoviroses são freqüentemente difíceis de distinguir de sintomas causados por outros patógenos, deficiências nutricionais, ou períodos de temperaturas baixas (D'ARCY, 1995 apud MILLER & RASOCHOVÁ, 1997). Essas viroses ocorrem em grande número de espécies cultivadas amplamente distribuídas pelo globo, provocando perdas econômicas significativas em vários países - dois dos

exemplos mais conhecidos são o vírus do nanismo amarelo da cevada ("Barley Yellow Dwarf Virus"- BYDV), que pode ser de grande impacto e é um fator limitante para produção de cereais nos Estados Unidos (MILLER & RASOCHOVÁ, 1997); e o vírus do enrolamento da folha da batata ("Potato Leaf-roll Virus"- PLRV), principal responsável pela importação de batata-semente no Brasil (SOUZA-DIAS & COSTA, 1983). Outras espécies menos conhecidas são o "Beet Western Yellow Virus" (BWYV), o vírus do nanismo da soja ("Soybean Dwarf Virus" - SDV), o vírus do enrolamento da folha do feijoeiro ("Bean Leafroll Virus"- BLRV), o vírus do nanismo necrótico do fumo ("Tobacco Necrotic Dwarf Virus - TNDV"), o "Carrot Redleaf Virus" (CRLV), entre outras.

A taxonomia recente dos luteovirus subdivide o gênero em 24 espécies e 14 espécies tentativas (RANGLES & RATHJEN, 1995 apud MAYO & ZIEGLER GRAFF, 1996), sendo que algumas viroses na lista de espécies já foram relatadas por outros autores como sendo estirpes de uma mesma espécie (WATERHOUSE et al., 1988). A espécie tipo do gênero é o barley yellow dwarf virus (BYDV), a qual é dividida em dois subgrupos: subgrupo I, composto pelos serotipos BYDV-PAV, BYDV-MAV e BYDV-SGV; subgrupo II, composto pelos serotipos BYDV-RGV, BYDV-RMV, BYDV-RPV (RANGLES & RATHJEN, 1995 apud KITAJIMA, 1997; MILLER & RASOCHOVÁ, 1997).

Os luteovirus foram inicialmente classificados por suas propriedades biológicas; eles são transmitidos por afídeos numa relação persistente, circulativa e, aparentemente, não propagativa, multiplicando-se exclusivamente nos tecidos do

floema das plantas infectadas (WATERHOUSE *et al.*, 1988, KITAJIMA *et al.*, 1997). Nenhuma dessas viroses é transmitida por inoculação mecânica e não há relatos da transmissão por sementes. Os afídeos vetores de diferentes luteoviroses variam expressivamente, sendo que mais de doze gêneros de afídeos contém uma ou mais espécies que são vetores (ROCHOW & DUFFUS, 1981 apud MAYO & ZIEGLER-GRAFF, 1996), porém individualmente os luteovirus são transmitidos eficientemente por uma ou poucas espécies de afídeos (WATERHOUSE *et al.*, 1988). O círculo de hospedeiras varia marcadamente. Devido ao tipo de relação com os vetores e à freqüente infecção de plantas perenes invasoras e gramíneas, que podem servir como fonte de inóculo, as luteoviroses podem tornar-se difíceis de se controlar (MARTIN *et al.*, 1990).

O exame microscópico de tecidos infectados com luteovirus mostra que o vírus acumula-se quase que exclusivamente nos elementos crivados e células companheiras do floema e, ocasionalmente, no parênquima floemático (MAYO & ZIEGLER-GRAFF, 1996). Essa restrição à multiplicação dos luteovirus às células do floema provavelmente não se deve ao fato desses vírus não poderem se replicar em outros tipos de células, uma vez que a replicação foi mostrada em protoplastos do mesófilo isolados e em algumas células fora do tecido vascular. A replicação foi demonstrada em protoplastos do mesófilo inoculados com o BYDV-PAV (BARNETT *et al.*, 1981; DINESH-KUMAR *et al.*, 1992), BYDV-RPV (SILVER *et al.*, 1994), PLRV (KUBO & TAKANAMI, 1979), BWYV (VEIDT *et al.*, 1992) e TNDV (KUBO, 1981). O TNDV também foi demonstrado

replicar-se em células epidérmicas inoculadas (IMAIZUMI & KUBO, 1980), além do BYDV ter sido algumas vezes encontrado em células do parênquima xilemático (GILL & CHONG, 1981). Ainda em plantas de *Nicotiana clevelandii* infectadas com o PLRV, algumas células do mesófilo tornaram-se invadidas (BARKER, 1987).

A detecção de partículas virais em células infectadas por luteovirus apresenta dificuldades, pois as mesmas assemelham-se a ribossomos citoplasmáticos quando visualizadas em cortes finos (FRANCKI *et al.*, 1985). Essa identificação torna-se mais confiável quando as partículas virais formam agregados cristalinos ou amorfos, ou então assumem localizações na célula não características de ribossomos. O problema também pode ser solucionado com a digestão do RNA ribossômico *in situ* com ribonuclease pancreática, depois da fixação com aldeído e antes da pós-fixação com ósmio (HATTA & FRANCKI, 1981 apud FRANCKI *et al.*, 1985). Esse método também permite a detecção de partículas nos plasmodesmas e vacúolos de células infectadas (FRANCKI *et al.*, 1985). Os efeitos que a infecção causa na ultraestrutura celular difere de acordo com o subgrupo ao qual o vírus pertence (GILL & CHONG, 1979). MAYO & ZIEGLER-GRAFF (1996) citam como exemplo a infecção de plantas de aveia com o BYDV-MAV e PAV (subgrupo I), que resultou na formação de vesículas de membranas simples e filamentos densos, os quais pareciam acumular-se no núcleo. As partículas virais acumulavam-se no citoplasma, e no decorrer da infecção o núcleo tornava-se distorcido e deteriorado. Em contraste, a infecção da mesma espécie de

aveia com o BYDV-RPV (subgrupo II) resultou na formação de vesículas e túbulos com membranas duplas, com as partículas virais acumulando-se no núcleo, o qual permaneceu intacto. Outras viroses de genoma enquadrado no subgrupo II provocaram efeitos semelhantes, embora no caso do PLRV nenhuma partícula fosse detectada no núcleo (SHEPARDSON *et al.*, 1980). Ainda em protoplastos isolados, inoculados com o "Pea Enation Mosaic Enamovirus" (PEMV RNA-1), cuja organização genômica se assemelha a dos luteovirus, ocorreu a formação de vesículas, e partículas foram detectadas tanto no núcleo quanto no citoplasma (DEMLER *et al.*, 1994).

Os métodos para diagnóstico dos luteovirus são mais restritos quando os comparamos com outras viroses, devido principalmente à dificuldade na obtenção de grandes quantidades de vírus purificado (MARTIN *et al.*, 1990). Com a introdução da técnica ELISA (Enzyme Lynked Immunosorbent Assay) na virologia vegetal, a serologia de luteovirus avançou drasticamente. O ELISA denominado "Sanduíche de Duplo Anticorpo" (Double Antibody Sandwich ou DAS-ELISA), junto com as variações do método, pode ser usado para estudar as relações entre viroses (KOENIG, 1979). O DAS-ELISA é bastante específico e apenas detecta estirpes de um vírus estreitamente relacionadas. Métodos de ELISA indiretos, nos quais o anticorpo não é conjugado, são menos específicos e detectam estirpes e viroses mais distantemente relacionadas.

O uso de anticorpos monoclonais constitui outra ferramenta importante no diagnóstico e classificação de luteoviroses. Muitos anticorpos monoclonais preparados contra

luteovirus têm sido comparados em sua reação com a maioria dos luteovirus conhecidos (D'ARCY *et al*, 1989). Distintamente dos anticorpos policlonais, com o uso de anticorpos monoclonais, o número de epitopos comuns a diferentes luteovirus pode ser determinado, e os epitopos conservados, identificados.

Com os recentes progressos no âmbito da biologia molecular a diagnose da infecção por luteovírus tem passado por constantes evoluções. MAYO & ZIEGLER-GRAFF (1996) distinguem dois tipos básicos de diagnose de infecção por virus. O primeiro deles caracteriza-se por uma baixa especificidade de detecção, onde mesmo vírus apenas marginalmente relacionados ao padrão de referência são detectados, o que ocorreria com o uso de anticorpos policlonais; o segundo, abrangendo uma detecção altamente específica, é requerido no sentido de discriminar o vírus de estirpes próximas, que seria o caso do uso de anticorpos monoclonais. A obtenção de DNA complementar (cDNA) para o RNA genômico de um grande número de luteovirus e suas estirpes e o conhecimento das respectivas sequências de nucleotídeos, têm permitido o desenvolvimento de sondas baseadas em hibridização de ácido nucléico com diferentes graus de especificidade.

Outro método baseado em técnicas biomoleculares, potencialmente útil para o diagnóstico de luteoviroses, é o uso da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT/PCR), usando primers desenhados com base nas sequências de nucleotídeos do RNA genômico de diferentes

luteovirus (ROBERTSON *et al.*, 1991). Tal detecção seria altamente discriminatória, uma vez que a análise de sequência de nucleotídeos do produto da PCR mostraria o grau de similaridade do luteovírus detectado com luteovirus conhecidos. No entanto, deve-se ressaltar que a maioria das sequências disponíveis atualmente mostram que, ao menos para alguns luteovirus, tais primers universais não funcionam bem, devido ao mal pareamento (MAYO & ZIGLER-GRAFF, 1996).

Outra alternativa para uma detecção mais sensível e específica, combinando métodos serológicos com os biomoleculares, é o uso da imuno-captura com PCR, na qual as partículas virais são ligadas a uma placa coberta com um anticorpo específico e então o RNA é extraído da partícula aderida e submetido à RT-PCR. O método foi efetivo para o PLRV, com sensibilidade suficiente para detectar partículas do vírus circulando em um único afídeo (JOLLY, 1994 apud MAYO & ZIEGLER-GRAFF, 1996).

1.3. Aspectos fotossintéticos da infecção por fitoviroses

A eficiência quântica fotossintética reflete o estado fisiológico e metabólico de células vegetais fotossintetizantes (KRAUSE, 1988). Estresses ambientais que afetam direta ou indiretamente o funcionamento do fotossistema II (PSII) podem conduzir a alterações características na extinção da fluorescência da clorofila em tais células. Essas alterações têm sido amplamente usadas para examinar o funcionamento do aparelho fotossintético e

processos fotoinibitórios. Uma relação linear entre a razão fluorescência variável pela fluorescência máxima (F_v/F_m) e a eficiência quântica foi estabelecida após vários tratamentos fotoinibitórios (BJÖRKMAN & DEMMIG, 1987), cujo uso tornou-se amplamente difundido para indicar fotoinibição e avaliar a performance fotossintética de várias culturas (KRAUSE & WEIS, 1991; SEATON *et al.*, 1995). KRAUSE (1988) identificou dois componentes básicos do processo fotoinibitório. Processos evidentemente fotoprotetivos, cuja característica é a pronta reversibilidade, provocam diminuições nas fluorescências moduladas inicial (F_o) e máxima (F_m), com redução em F_v/F_m . Processos que não são prontamente reversíveis, os quais envolvem dano à proteína D1 e a outros componentes do centro de reação do PSII, conduzem ao aumento em F_o e à diminuição em F_m e F_v/F_m .

Na realidade, os efeitos de fatores de estresse bióticos sobre a fotoinibição e a fotoproteção das plantas têm recebido pouca atenção dos fisiologistas nos últimos anos. Entre esses fatores encontra-se a infecção por fitovirus (van KOOTEN *et al.*, 1990; BALACHANDRAN & OSMOND, 1994; BALACHANDRAN *et al.*, 1997). Esse fato advém em especial da dificuldade no acompanhamento do desenvolvimento da infecção e também da grande variabilidade de conseqüências fisiológicas admissíveis (BRADSHAW, 1987; SEATON *et al.*, 1995).

BALACHANDRAM *et al.* (1997) destacam que após a publicação do primeiro volume do "Annual Review of Phytopathology", no qual a fisiologia de plantas infectadas

por viroses foi caracterizada, a ênfase nas duas últimas décadas tem se voltado para a análise molecular das interações patógeno-hospedeiro. No entanto, o notável progresso que as inovadoras técnicas de biologia molecular trouxeram para o entendimento da estrutura do genoma e da replicação de fitoviroses não foi acompanhado por expansão similar de conhecimento sobre os efeitos da infecção viral na fisiologia de suas hospedeiras (ZAITLIN & HULL, 1987).

Os sintomas clássicos que a infecção por fitoviroses induzem em suas hospedeiras, tais como mosaicos, clareamento de nervuras, clorose e mosqueados, constituem efeitos sobre a síntese de clorofila e ruptura na estrutura e função de cloroplastos (GOODMAN *et al.*, 1986). Mais recentemente, SEATON *et al.* (1995), mostram algumas evidências da alteração na função fotossintética com estudos usando a fluorescência em plantas infectadas com o vírus do mosaico do fumo ("Tobacco Mosaic Virus"- TMV) e o "Peanut Green Mosaic Virus"(PGMV).

Apesar da sintomatologia permanecer uma área complexa na patologia vegetal, BALACHANDRAN *et al.* (1997) tentam esclarecer alguns aspectos sobre os processos fotoquímicos primários, a regulação metabólica, e a expressão gênica no desenvolvimento de sintomas sob a ótica da pesquisa fotossintética contemporânea. Dois aspectos são discutidos.

O primeiro deles propõe que o desenvolvimento dos sintomas pode decorrer de lesões nos processos fotobioenergéticos, e utiliza o modelo de KRAUSE (1988) sobre os dois componentes básicos do processo fotoinibitório,

descritos no início desse subitem: (1) ajuste de mecanismos fotoprotetivos dentro dos eventos fotoquímicos primários para aliviar o excesso de energia, quando uma ou mais lesões prejudicam a dissipação ordenada de energia de excitação através do transporte fotossintético eletrônico; (2) início dos processos fotoinibitórios quando a capacidade para fotoproteção é excedida. Esses processos parecem potencializar a fotoxidação seguindo-se o desbalanço no transporte eletrônico de oxigênio e a geração de espécies tóxicas de oxigênio a taxas excedendo a capacidade de mecanismos de detoxificação no fotossistema I (ASSADA, 1994), podendo estar envolvidos na exacerbação de sintomas dependente de luz.

O segundo aspecto discutido propõe que os sintomas podem desenvolver-se de lesões no metabolismo, seguidas por uma baixa regulação na expressão gênica e conseqüente baixa síntese de pigmentos e proteínas. Essas lesões devem surgir de efeitos da infecção sobre processos não fotossintéticos, tais como compartimentalização e transporte metabólico. Uma analogia com patógenos fúngicos, que induzem invertase extra celular e causam acúmulo localizado de açúcares, propõe que a interferência viral com o particionamento do carbono pode levar à "repressão por açúcar" da expressão gênica, o que pode contribuir para acelerar a senescência e o desenvolvimento de sintomas (BALACHANDRAN *et al.*, 1997). Ao mesmo tempo, a replicação viral e a síntese de ácido nucléico provavelmente monopolizam carbono citoplasmático e causam

altas demandas sobre reservas celulares de açúcares-fosfato e a síntese de ATP (SEATON et al., 1995).

A atividade fotossintética de plantas infectadas também tem sido estudada quanto à taxa de assimilação de CO_2 . Os resultados mais gerais da infecção viral refletem uma redução na atividade fotossintética, porém os relatos sobre a assimilação de CO_2 são bastante variáveis (MATTHEWS, 1991). GOODMAN et al. (1986) relatam que reduções foram encontradas em plantas de fumo infectadas com o TMV ou o "Tobacco Etch Virus" (TEV), cevada infectada com o BYDV e tomate com o "Tomato Aspermy Virus" (TAV). Todavia, alguns estudos não mostraram qualquer diferença significativa entre tecidos de *Nicotiana glutinosa* sadios e infectados com o TMV, fumo com o vírus X da batata ("Potato Virus X"- PVX) e abobrinha infectada com o vírus do mosaico da abobrinha ("Squash Mosaic Virus"- SqMV). DOKE & HIRAI (1970a, 1970b) trabalhando com plantas de fumo infectadas sistematicamente com o PVX e o TMV, encontraram ainda que quando células em diferentes estados de infecção são avaliadas, surgem novas diferenças na assimilação de CO_2 . Houve estímulo na incorporação de CO_2 em células nos estádios iniciais de infecção e declínio em células que haviam sido infectadas por vários dias. As mesmas variações foram encontradas em exemplares de *N. glutinosa* infectados com o TMV.

2. OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram:

- estabelecer um método de purificação para o vírus associado ao amarelecimento foliar da cana-de-açúcar;
- produzir um anti-soro policlonal para diagnóstico;
- caracterizar as partículas virais purificadas por espectrofotometria e microscopia eletrônica;
- estudar as alterações fisiológicas provocadas pelo vírus em plantas infectadas por meio da eficiência fotossintética e dosagens de carboidratos e pigmentos fotossintéticos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Desenvolvimento de um método para purificação.

O primeiro passo na caracterização do vírus foram as tentativas de purificação das partículas virais. A metodologia utilizada teve como base o método de HAMMOND et. al. (1983) para purificação do Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV).

Folhas da variedade SP71-6163, com sintomas evidentes de amarelecimento, foram cortadas em pequenos pedaços de cerca de 1,0 cm² e congelados - alíquotas de 500g desse material foram usadas para cada purificação. O tecido foliar foi congelado e pulverizado em nitrogênio líquido com o uso de um liquidificador e o pó resultante submetido à extração em tampão fosfato (KPB) 0.5M, pH6.0 na relação 2:1 (tampão:tecido) contendo 0.5% de Na₂SO₃, 10mM de DIECA, 1mM do inibidor de proteases PMSF (Phenil Metil Sulfonil Fluoride - C₇H₇FO₂S) e 2% da enzima CELLULAST (1.5 L, BA CCN 030040 - Novo Nordisk, Denmark), por 3 horas, com agitações de 30 segundos a cada 15 minutos. Após esse período foi adicionado ao homogeneizado 0.5% de Triton X-100, agitado por 30 minutos à 4-8°C e filtrado em tecido de nylon. O filtrado foi clarificado com a adição de 1/5 de seu volume, de uma mistura clorofórmio:álcool n-amílico (2:1), por agitação durante 30 minutos em banho de gelo. Após uma centrifugação à 8000rpm por 10 minutos no rotor Beckman JA 14, ao sobrenadante

recuperado , foi adicionado 0.25M de NaCl e 10% de PEG (polietilenoglicol) 6000(PM), seguindo-se agitação por 90 minutos à 4°C. Uma nova centrifugação à 8000rpm (rotor JA 14) por 20 minutos foi realizada e os "pellets" ressuspensos em KPB 0.1M, pH7.0, durante a noite.

Na manhã seguinte o líquido foi passado por um triturador de tecidos de vidro, e a suspensão centrifugada por 10 minutos a 5000rpm no rotor Beckman JA 20. O sobrenadante recuperado foi submetido a um "colchão de sacarose" 30% com ultracentrifugação a 48000rpm por 1h e 45min no rotor Beckman 80 Ti. Os pellets formados foram ressuspensos em KPB 0.1M, pH7.0, em triturador de tecidos e centrifugados por 5 minutos a 7000rpm (rotor Beckman JA 21). O sobrenadante recuperado foi submetido a um gradiente de densidade de sacarose 10% e Cs₂SO₄ 15%, 22.5% e 30% (em sacarose 10%), por ultracentrifugação a 29000rpm durante 2:30h no rotor Beckman SW 41. Na tentativa de concentrar os vírions em faixas mais baixas do gradiente, em novas purificações o mesmo foi modificado para sacarose 5% e 10%, Cs₂SO₄ 5%, 10%, 15% e 20% em sacarose 10%, aumentando a velocidade para 35000rpm e o tempo de centrifugação para 3 horas, no mesmo rotor SW 41. Após a última ultracentrifugação, os gradientes foram fracionados em alíquotas de 600ul.

3.2. Avaliação da eficiência das purificações

As frações de cada gradiente, devidamente identificadas, foram analisadas num espectrofotômetro Hewlett Packard 8452A. Foi realizada uma varredura compreendida entre 220-320nm para cada alíquota de 600µL e plotadas as respectivas curvas de absorbância espectral.

A concentração do vírus (mg/mL) nessas alíquotas foi calculada pela equação $[(Abs_{260} - Abs_{320}) \times \text{fator de diluição}]/8$, assumindo $E^{0.1\%}_{260} = 8,0$. Uma idéia da eficiência das purificações foi obtida pela razão Abs_{260}/Abs_{280} . Purificações com alta concentração de partículas, porém alta porcentagem de impurezas, foram submetidas à diálise em KPB 0.05M, pH7.0, durante aproximadamente 15 horas. Após a diálise, uma centrifugação a baixa velocidade foi realizada e novas análises no espectrofotômetro foram feitas.

O monitoramento das purificações também foi realizado por Microscopia Eletrônica de Imunoadsorção (MEIAD). Para isso, grades de microscopia eletrônica (200-300 mesh) com filme parlodium/carbono foram inicialmente incubadas com o antisoro para o "Barley Yellow Dwarf Virus serotipo PAV" (As-BYDV-PAV), na proporção 1:500 em KPB 0.01M, pH7.0, por 40 minutos. Esse anti-soro já mostrara anteriormente certo grau de reação com vírus do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar em testes de PTA-ELISA (VEGA et al., 1997). Após a lavagem em tampão fosfato 0.1M, as grades foram incubadas com o vírus purificado na proporção 1:1000, em KPB 0.1M, pH

7.0, "overnight" a 4°C. Após a lavagem em água destilada foi feita contrastação com acetato de uranila 1%, as grades foram secas e examinadas ao microscópio eletrônico ZEISS EM-10C. Observações das purificações ao microscópio eletrônico pela técnica de contraste negativo com ácido fosfotúngstico (PTA), sem a prévia incubação com anti-soro, também foram realizadas.

As melhores frações foram devidamente identificadas e congeladas a -80°C em ultrafreezer, ou a -20° no caso de material para uso laboratorial freqüente.

3.3. Produção e preparo de anti-soros

Os animais usados para produção de anti-soros policlonais - 3 coelhos "brancos da Nova Zelândia" e 3 galinhas "Leggorn" - foram mantidos no biotério do Centro de Tecnologia Copersucar (CTC), em Piracicaba. Para a pre-imunização dos animais, as purificações do vírus selecionadas foram emulsionadas com adjuvante de Freund completo, na proporção 1:1, num total de 50µg de vírus por animal. As injeções foram via intradérmica e subcutânea, nos coelhos e galinhas respectivamente. Antes da aplicação dos antígenos, foi realizada uma sangria de prova nos coelhos e coletados 2 ovos de cada galinha.

Decorridos 21 dias da primeira imunização, um "booster" foi realizado com adjuvante de Freund incompleto, na proporção 1:1 com o vírus purificado, com 60µg de vírus

injetado nos coelhos números 1 e 2 e galinhas números 2 e 3, e 90ug de vírus no coelho 3 e galinha 1. Essas concentrações diferenciadas foram baseadas em avaliações dos anti-soros coletados, descritas posteriormente.

Um segundo booster, nos mesmos padrões do primeiro, foi realizado após 21 dias desse. As concentrações de vírus injetadas foram 50µg nos coelhos 1 e 2 e galinhas 2 e 3, e 80ug no coelho 3 e galinha 1.

Os coelhos foram submetidos à 4 sangrias intercaladas entre as imunizações. A primeira foi realizada 10 dias após o primeiro booster. Decorridos 11 dias, junto com segundo booster, realizou-se a segunda sangria. Trinta e um dias e 61 dias após, foram realizadas respectivamente a terceira e quarta sangrias. Logo após a coleta do sangue, esse era resfriado por uma hora para coagulação e a seguir centrifugado a baixa velocidade para separação das hemáceas. Os anti-soros foram armazenados congelados a -20°C.

Os ovos de cada galinha foram coletados diariamente, identificados por animal e data de postura, e armazenados em geladeira até o processamento. Uma das galinhas (nº 3) teve a produção de ovos interrompida logo após a primeira imunização, voltando a produzi-los cerca de 50 dias depois. Os ovos foram usualmente processados em grupos de 2 por animal, com datas de postura próximas. O método inicialmente utilizado para extração dos anticorpos, ou seja, a imunoglobulina (fração IgG) das gemas, foi o da precipitação com PEG 8000 (HARAKAWA, 1993). As gemas foram inicialmente

separadas da clara e lavadas em água corrente, retirando-se em seguida a membrana que as envolve. As mesmas foram diluídas na relação 5:1 em KPB 0.01M, pH7.0, NaCl 0.1M e 0.01% de NaN_3 , acrescentando-se PEG 8000 até a concentração de 3.5% (p/v) e agitado até a completa dissolução. A mistura foi centrifugada por 20 minutos a 4500rpm (rotor Beckman JA 14), desprezando-se o sedimento amarelo. O sobrenadante foi filtrado em funil com algodão para retirada da camada de gordura. Ao filtrado foi adicionado PEG 8000 até a concentração de 12% (p/v), agitado até a completa dissolução e novamente centrifugado por 15 minutos a 4500rpm (rotor JA 14). O pellet foi ressuspensionado em KPB salino 0.01M na mesma proporção do volume original das gemas, adicionando-se igual volume de etanol 50%, com o material mantido em banho de gelo. Após centrifugação por 15 minutos a 4500rpm (rotor JA 14), o pellet foi ressuspensionado em KPB 0.1M, pH7.5, NaCl 0.1M. Para armazenamento a 4°C, foi adicionado 0.02% de azida sódica.

Uma variação desse método de extração da imunoglobulina substituindo a última precipitação com etanol por uma nova precipitação com PEG a 12% (van REGENMOTEL, 1982) foi testada. Após a lavagem e rompimento da membrana envolvente, as gemas foram agora diluídas no tampão fosfato 0.01M, pH7.5 (contendo 0.1M de NaCl e 0.01% de azida sódica), na relação 1:1, acrescentando-se PEG 8000 até a concentração de 3.5%. A velocidade de centrifugação foi aumentada para 10000rpm por 20 minutos. Ao sobrenadante filtrado em funil com algodão foi adicionado PEG 8000 até a concentração de 12% e centrifugado

por 15 minutos a 10000rpm. Os pellets foram ressuspensos em volume de KPB 0.01M igual ao original das gemas, e PEG 8000 foi novamente adicionado até a concentração de 12%. Após a completa dissolução do PEG, a suspensão foi centrifugada por 20 minutos a 10000rpm. Os pellets foram ressuspensos em KPB 0.01M, num volume correspondente a 1/4 do volume original da gema, sendo adicionado 0.02% de azida sódica para armazenamento. Todas as centrifugações foram no rotor Beckman JA 14.

Um método simples de clarificação com clorofórmio (HU *et. al*, 1985) também foi testado para extração da fração IgG. As gemas, inicialmente lavadas em água corrente, foram misturadas com o mesmo tampão fosfato dos métodos anteriores na proporção 1:1. Clorofórmio foi adicionado num volume igual ao da mistura e agitado até a formação de uma emulsão uniforme. A emulsão foi quebrada por centrifugação a 4500rpm por 20 minutos. Ao sobrenadante recuperado foi adicionado 0.02% de azida sódica. As preparações de cada método foram posteriormente comparadas em testes PTA-ELISA.

3.4. Avaliação dos anti-soros

Os anti-soros provenientes das sangrias em diferentes datas foram analisados separadamente, assim como as imunoglobulinas provenientes de ovos postos em datas distantes. A monitoração do título desses antisoros foi feita basicamente por ELISA ("Enzyme-Linked Immunossorbent Assay") e alguns testes de detecção imunohistoquímica de proteínas em

membrana de nitrocelulose ("Tissue-Blotting" - LIN *et al.*, 1990).

3.4.1. Procedimentos para ELISA.

As microplacas de poliestireno utilizadas em todos os testes foram da marca Corning (catálogo nº25880-96), cobertas com 100µL de líquido por orifício em cada etapa. Os testes usados para avaliação dos anti-soros de coelho foram na sua maioria PTA-ELISA. As purificações de vírus selecionadas foram diluídas para 5µg/mL, 1µg/mL e 0.2µg/mL de vírus em tampão carbonato 0.05M, pH 9.6 e incubadas por 1h a 37°C. A seguir um bloqueio com BSA 1% (albumina de soro bovino) em tampão fosfato (KPB) 0.05M, pH 7.0 por 30min. a 37°C foi realizado. Após 3 lavagens com KPB 0.01M, pH 7.4, contendo 0.1M de NaCl e 0.05% de Tween 20 (KPB-Tween), foram adicionados o anti-soro e o soro pré-imune, na diluição 1:1000 em KPB 0.05M, pH 7.0, e incubados por 1h a 37°C. Após 3 novas lavagens com KPB Tween, o conjugado de IgG de cabra contra IgG de coelho com fosfatase alcalina ("Anti-rabbit IgG- Alkaline Phosphatase conjugate", Sigma A-9919) foi adicionado na diluição 1:18000 em KPB 0.05M, pH 7.0 e incubado por 1h a 37°C. Três novas lavagens foram realizadas e o substrato p-nitrofenilfosfato, foi adicionado na proporção 1mg/mL em tampão dietanolamina 10%, pH 9,8. As absorbâncias foram medidas a 405nm após 1 e 2 horas da adição do substrato num aparelho Labsystems Multiskan Bichromatic.

Em testes PTA-ELISA posteriores, além das purificações do vírus para cobertura da placa, foram usados extratos de plantas sadias e doentes diluídos 1:10 em tampão carbonato 0.05M, pH 9.6, adicionado de 0.5% de DIECA.

As imunoglobulinas produzidas em galinha foram testadas inicialmente por DAS-ELISA ("Double Antibody Sandwich Indirect ELISA"). As placas foram cobertas com anti-soro produzido em coelhos na diluição 1:1000 em tampão carbonato 0.05M, pH 9.6 e incubadas durante a noite a 4°C. Após 3 lavagens com KPBTween, amostras de plantas sadias e doentes trituradas em nitrogênio líquido e diluídas 1:10 em KPBTween 0.05M, pH 7.0, adicionado de 0.5% de DIECA, e as purificações de vírus (0.5µg/mL e 1.0µg/mL), também em KPBTween 0.05M, foram incubadas por 1h a 37°C. Após o bloqueio com BSA 1% em KPBTween 0.05M por 30 minutos e três lavagens em KPBTween, a imunoglobulina de galinha (método PEG/Etanol) foi adicionada nas diluições 1:100, 1:250 e 1:500 em KPBTween 0.05M e incubado por 1h a 37°C. Três novas lavagens foram feitas e o conjugado de fosfatase alcalina com IgG de coelho anti IgG de galinha (Anti-chicken IgG Alkaline Phosphatase conjugate Sigma A-9171) diluído 1:35000 em KPBTween 0.05M, foi adicionado e incubado por 1h a 37°C. Após três lavagens, o substrato p-nitrofenilfosfato (1mg/mL em dietanolamina 10%) foi adicionado. As leituras foram feitas após 1 e 2h a 405nm no mesmo aparelho utilizado anteriormente.

A fração IgG de ovos obtidas pelos três métodos distintos de processamento (PEG, PEG/Etanol, e Clorofórmio)

foram testados por PTA-ELISA, no sentido de avaliar a eficiência de cada um. A metodologia foi a mesma usada para o PTA-ELISA com anti-soro de coelho, acrescentando além do vírus purificado para cobertura da placa, amostras sadias e doentes de plantas de cana. As amostras sadias constituíram-se de plantas provenientes de "seedlings" ou limpas por termoterapia no Centro de Tecnologia da Copersucar (EUGÊNIO C. ULIAN, comunicação pessoal).

Devido a ocorrência de reações inespecíficas nos testes de PTA-ELISA com amostras de plantas sadias de cana (a ser abordado nos resultados), foi tentada a pré-absorção dos antisoros com extratos dessas plantas. Os extratos obtidos de seedlings foram submetidos ao mesmo processo usado para purificações do vírus, sendo interrompido antes da ultracentrifugação com colchão de sacarose. Após a centrifugação a 5000rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi recuperado, fracionado em alíquotas de 1mL e congelado. A mesma semi-purificação foi realizada com plantas de cana doentes, para posterior uso nos testes ELISA. Para pré-adsorção os anti-soros foram misturados com o extrato sadio semi-purificado, na proporção 10:1 (antisoro:extrato) e as imunoglobulinas de ovos na proporção 50:1, incubados durante a noite a 4°C e centrifugados a baixa velocidade, recuperando-se o sobrenadante.

Os anti-soros e imunoglobulinas pré-adsorvidos foram avaliados por PTA-ELISA. As amostras consistiram agora de extratos de plantas sadias (seedlings) e doentes diluídas em tampão carbonato 0.05M, pH 9.6 na proporção 1:5; de extratos

semi-purificados de plantas sadias e plantas doentes, diluídos na proporção 1:10 em tampão carbonato; e do vírus purificado (1µg/mL) também diluído em tampão carbonato. As placas foram incubadas por 1h a 37°C, realizando-se a seguir o bloqueio com BSA 1% em KPB 0.05M, pH 7.0, por 30 minutos a 37°C. Após 3 lavagens com KPB-Tween, os anti-soros pré-adsorvidos, na diluição 1:900 e as imunoglobulinas na diluição 1:100, foram incubados por 1h a 37°C. Os respectivos conjugados "anti-rabbit IgG-AP" e "anti-chicken IgG-AP" (Sigma), foram adicionados após 3 novas lavagens e incubados por 1h a 37°C. Novas lavagens foram feitas e o substrato p-nitrofenilfosfato (1mg/mL de dietanolamina 10%) foi adicionado. As absorbâncias foram lidas após 1 e 2 horas no mesmo aparelho previamente mencionado.

3.4.2. Detecção imuno-histoquímica em membranas de nitrocelulose

O procedimento realizado baseou-se na técnica de "Tissue-Blotting" (LIN *et al.*, 1990). As membranas de nitrocelulose foram inicialmente marcadas com a nervura central de folhas de cana por meio de uma leve pressão, produzindo réplicas do tecido em relevo. Essas foram em seguida submetidas a um bloqueio com BSA 2% em tampão Tris-HCl 0.01M, pH 7.4, adicionado de 0.85% de NaCl e 1% de Triton X-100, por 2 horas sob agitação. O anti-soro foi adicionado na diluição 1:1000 em tampão Tris-HCl 0.01M, pH 7.4,

adicionado de NaCl 0.85%, 0.3% de Triton e 0.05% de Tween 20. Após incubação por 1h sob agitação, 5 lavagens foram realizadas em tampão Tris-HCl 0.01M, pH 7.4, 0.85% de NaCl e 0.05% de Tween 20. O conjugado "Anti-rabbit IgG-AP" (Sigma A-8025) na diluição 1:5000 em Tris-HCl 0.01M mais BSA 1% foi adicionado. Decorrido o tempo de incubação de 1h, 5 lavagens em tampão Tris-HCl 0.01M, pH 7.4 (0.85% NaCl e 0.05% de Tween 20) e 2 lavagens em Tris-HCl 0.1M, pH 9.5 adicionado de 0.1M de NaCl e 5mM de $MgCl_2$ foram realizadas. O substrato NBT/BCIP foi finalmente adicionado diluído nas quantidades de 165µg/mL de NBT e 85µg/mL de BCIP em tampão Tris-HCl 0.01M, pH 9.5, NaCl 0.85%. Após incubação sob baixa luminosidade e formação da coloração roxa, característica da ação da enzima sobre o NBT/BCIP, a reação foi parada com tampão Tris-HCl 20mM, pH7.5, adicionado de 5mM de EDTA. As membranas foram examinadas ao microscópio ótico com iluminação por transparência (luz transmitida).

3.5. Medições de fluorescência

Plantas de cana-de-açúcar da variedade SP-716163 foram mantidas em estufa em dois grupos separados, sob as mesmas condições ambientais. Um dos grupos foi constituído de plantas oriundas de mini-toletes infectados com o vírus do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar, e o outro de mini-toletes de plantas livres do vírus por limpeza via termoterapia seguida de cultura de meristema. Foram

realizados dois ensaios com plantio em épocas diferentes e análises em épocas diferentes.

As medições dos parâmetros e curvas da cinética de indução da fluorescência foram feitas com um aparelho modelo PEA (Plant Efficiency Analyzer), da Hansatech, Kings Lynn, Norfolk, UK. Os parâmetros da fluorescência da clorofila fornecidos pelo instrumento são: fluorescência inicial (F_0), fluorescência variável (F_v), fluorescência máxima (F_m), e a razão F_v/F_m . A cinética da fluorescência da clorofila do nível inicial (F_0) ao nível máximo (F_m) foi avaliada com base no trabalho realizado por STRASSER et al (1995). O PEA permite o acúmulo de dados em intervalos de tempo de microsegundos (μs), cuja faixa de leitura foi transformada numa escala de tempo logarítmica, no eixo das abscissas, para a plotagem das curvas da cinética de indução. Os níveis transitórios da curva de indução apresentados no modelo de Strasser - $O(F_0)$, $J(F_j)$, $I(F_i)$ e $P(F_p)$ - foram comparados entre os tratamentos, convencionando a emissão de F_0 no tempo de 60 μs .

As medições foram padronizadas na quarta folha mais jovem de cada planta, na sua porção mediana. Foram feitas várias estimativas para determinação do tempo de tratamento de escuro das folhas necessário para que eficiência fotoquímica máxima fosse alcançada. A partir do tempo inicial de 5 minutos, com intervalos também de 5 minutos, foi encontrado o valor médio de 50 minutos. A intensidade de luz utilizada foi de 600 W/m^2 , equivalente a 100% da intensidade luminosa fornecida pelo fluorímetro, e o tempo de indução de

5 segundos, suficiente para que a fluorescência máxima fosse alcançada.

No primeiro ensaio foram usadas plantas com 8 meses após o plantio, com o grupo infectado já apresentando os sintomas típicos do amarelecimento - diferentes intensidades de amarelecimento da nervura central. Todas as leituras de fluorescência foram realizadas entre 10 e 11 horas da manhã no período de 26 de janeiro a 7 de fevereiro de 1997. Observa-se que ocorreram variações na intensidade de luz entre os diferentes dias de medição, pela condução do experimento em casa de vegetação, todavia procurou-se padronizar os resultados nos dias com condições semelhantes. Nove plantas de cada grupo, sadio e infectado, no mesmo estágio de desenvolvimento, foram usadas para as medições, sendo cada uma delas considerada uma repetição. Todas as medições foram feitas no interior da estufa à temperatura ambiente.

No segundo ensaio foram usadas 9 plantas de cada grupo com cinco meses após o plantio, analisadas durante 29 de setembro à 2 de outubro de 1997. Algumas plantas do grupo infectado ainda não apresentavam sintomas visíveis, porém, todas foram testadas individualmente por DAS-ELISA para constatação da infecção pelo vírus e a real sanidade das plantas sadias. Esses testes foram realizados após uma extensa rotina para o estabelecimento de uma metodologia confiável de diagnóstico (vide resultados). Todas as leituras foram feitas fora da estufa, sob luz solar direta, somente em dias limpos. Três medições foram realizadas, sendo a primeira

delas após 1 hora de adaptação fora da estufa, e as demais após 5 horas sob luz solar direta. Os tempos de tratamento de escuro e leitura do primeiro ensaio foram mantidos.

3.6. Dosagem de pigmentos e açúcares

Os mesmos grupos de nove plantas sadias e infectadas citados no tópico anterior foram submetidos à dosagem de clorofilas a e b, xantofilas e carotenóides, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e sacarose.

Foram retirados 15 discos foliares de 7mm de diâmetro das mesmas folhas usadas para medições de fluorescência. As extrações foram feitas em 10mL de MCW (metanol, clorofórmio e água) nas proporções 12:5:3, durante aproximadamente sete dias, ou até que os discos se tornassem inteiramente despigmentados. Os discos das amostras de cada grupo foram secos individualmente em estufa à 80°C, estimando-se uma média do peso seco para plantas sadias e infectadas.

Para dosagem de clorofilas e carotenóides foram retiradas pequenas alíquotas de extrato e diluídas em etanol 96%. Os cálculos seguiram as equações propostas por LICHTENTHALER & WELLBURN (1983), com os resultados expressos em µg/mg massa seca.

Ao restante do extrato foi adicionado clorofórmio e H₂O, nas proporções 4:1:1,5 (extrato:clorofórmio:H₂O) para separação de fases; da fase superior aquosa foram dosados os açúcares. O método fenol sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) foi usado para açúcares solúveis totais. Nas mesmas amostras,

após a digestão com KOH, a sacarose foi dosada pelo método antrona (van HANDEL, 1968). A concentração de açúcares redutores foi calculada pela diferença entre açúcares solúveis totais e sacarose. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ massa seca.

As leituras de absorbância para clorofilas e carotenóides foram realizadas em um espectrofotômetro duplo feixe B390 Micronal, nos dois ensaios. As leituras de absorbância para açúcares foram feitas em um espectrofotômetro 435 FEMTO, com exceção de açúcares solúveis totais no segundo ensaio, no qual foi usado o aparelho mencionado para pigmentos.

3.7. Medições da taxa de troca líquida de CO_2

As avaliações de taxa de troca de CO_2 foram feitas apenas no segundo ensaio, devido à não disponibilidade do aparelho usado nas medições no decorrer do primeiro ensaio.

As plantas dos dois tratamentos foram levadas para a Seção de Fisiologia no Centro Experimental do Instituto Agrônomo de Campinas, onde permaneceram em estufa por quatro dias para adaptação antes do início das avaliações. Foi utilizado o aparelho portátil de medida de fotossíntese IRGA modelo 6200 ("Infra Red Gas Analyzer" , LICOR, Nebraska, USA).

As plantas foram levadas para fora da estufa pela manhã, onde permaneceram por cerca de 2 horas antes do início das leituras, as quais foram feitas na quarta folha inteiramente

expandida, a mesma das medições de fluorescência. Foi escolhido um dia totalmente limpo, sem nebulosidade para coleta de dados durante a evolução das condições ambientes. Cinco medições foram feitas das 9:30 às 15:30 horas, alternando-se entre cada leitura plantas saudas e infectadas.

As mesmas plantas foram submetidas à medições dentro do laboratório, com uma fonte de luz artificial fixa de densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de $1246 \pm 33 \mu\text{moles fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e a temperatura ambiente de 24°C . Houve adaptação de cerca de 20 minutos sob as novas condições antes que as leituras se sucedessem alternadamente entre plantas saudas e infectadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Purificações do vírus

As tentativas de purificação do vírus associado ao amarelecimento foliar da cana-de-açúcar (VAFCA) usando o método de HAMMOND *et al.* (1983) apresentaram rendimentos muito baixos, fato evidenciado anteriormente por VEGA *et al.* (1997). No entanto, as modificações introduzidas no método original possibilitaram purificações com rendimentos em torno de 1,8mg/Kg, um excelente resultado no caso de luteovirus, cujas purificações costumam apresentar rendimentos na faixa de 0,100-1,51mg/Kg (ROCHOW & DUFFUS, 1981; HAMMOND *et al.* 1983.).

As principais modificações que resultaram no aumento de rendimento foram:

- adição do inibidor de proteases PMSF ao tampão de extração;
- substituição das enzimas propostas por HAMMOND *et al.* (1983) pela enzima de uso industrial CELLUCLAST junto ao tampão de extração;
- alteração do gradiente de sacarose para o gradiente misto de sacarose e Cs_2SO_4 , conforme GONSALVES *et al.* (1978).

Os gradientes alterados para 5 e 10% de sacarose e 5,10,15 e 20% de Cs_2SO_4 e submetidos a ultracentrifugação a 35.000rpm por 3 horas apresentaram os melhores resultados. Houve a tendência da concentração dos vírions nas frações intermediárias dos gradientes, correspondentes à 10 e 15% de

Cs₂SO₄. Nessas frações a concentração média de partículas virais foi de 100µg/mL.

Os espectros de absorbância em UV das frações de um gradiente de densidade misto de sacarose e sulfato de cézio, mostrados na Figura 3, indicam a presença de partículas nucleoprotéicas em diferentes concentrações ao longo do gradiente. Considerando o pico de absorbância em 260 nm, que corresponde ao ácido nucléico, a maior concentração viral ocorre nas frações 3 a 6 (Figura 4).

A Figura 5 representa os resultados obtidos em outra purificação, na qual foram misturadas as frações com maior concentração de vírus (1 a 5) e as de menor concentração (6 a 10). Esses "pools" de frações foram posteriormente submetidos à diálise em KPB 0.05M. Este procedimento provocou certa perda de vírus, refletida pela queda na absorbância em 260 nm, mas houve ganho na pureza da preparação com aumento da relação A_{260}/A_{280} . A mistura das frações 1 a 5, que antes da diálise apresentou $A_{260}/A_{280}=1.6$, após a diálise passou a apresentar $A_{260}/A_{280}=1.75$. A mistura de frações 6 a 10 (com menor concentração de vírus) manteve praticamente inalterado esse parâmetro após a diálise.

A razão A_{260}/A_{280} das preparações finais obtidas nas diversas purificações esteve entre 1,60 e 1,85, que é a faixa de valores esperados para partículas virais isométricas que contêm entre 20 e 35% de ácido nucléico (GIBBS & HARRISON 1976). Estes valores também estão próximos aos obtidos em trabalhos de purificação do BYDV (HAMMOND et al. 1983), que ficaram entre 1,5 a 2,0 (BYDV-MAV) e 1,66 a 1.85 (BYDV-PAV).

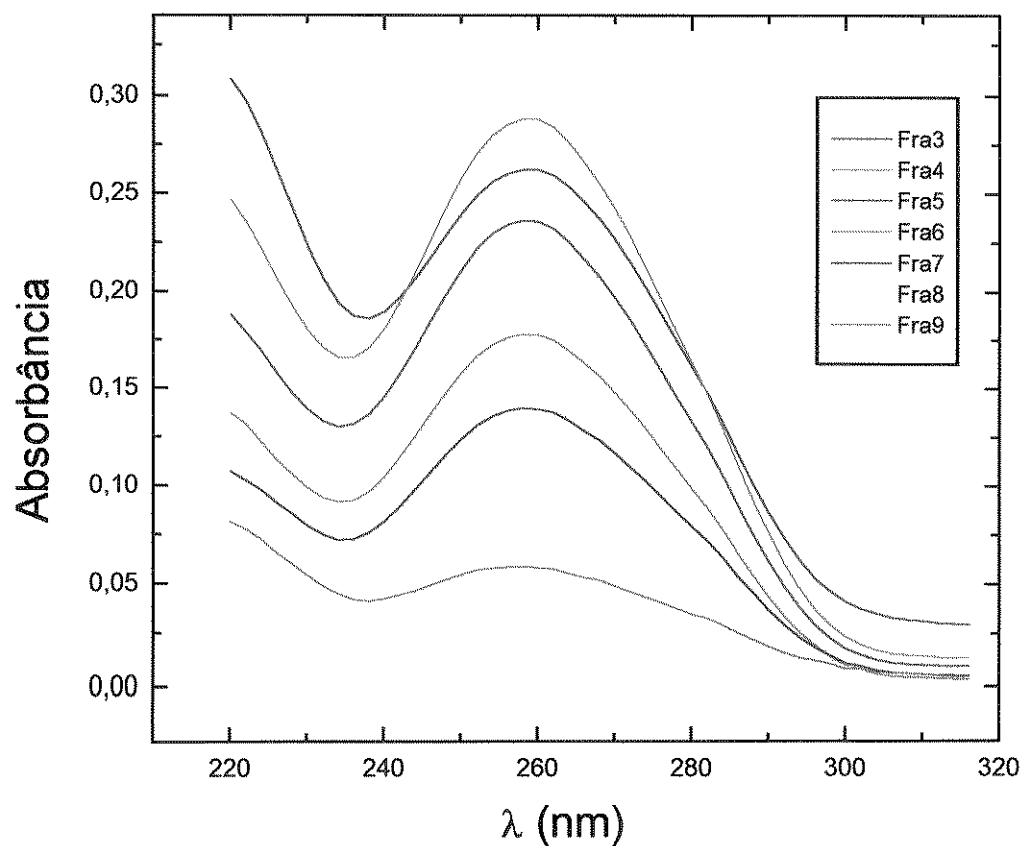


Figura 3. Curvas de absorvância espectral das frações do gradiente de sacarose (5 e 10%) e Cs_2SO_4 (5, 10, 15 e 20%) características de partículas isométricas

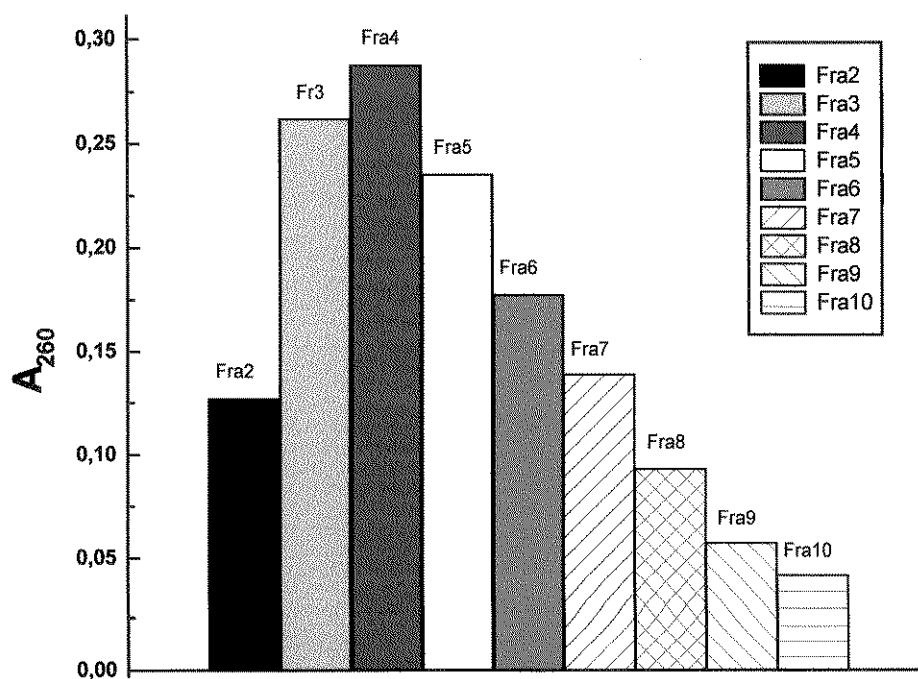


Figura 4. Absorvância das frações do gradiente de sacarose e Cs_2SO_4 em 260nm
As frações 2 e 10 não apresentaram espectros de absorvância característicos de uma nucleoproteína viral com picos em 260nm

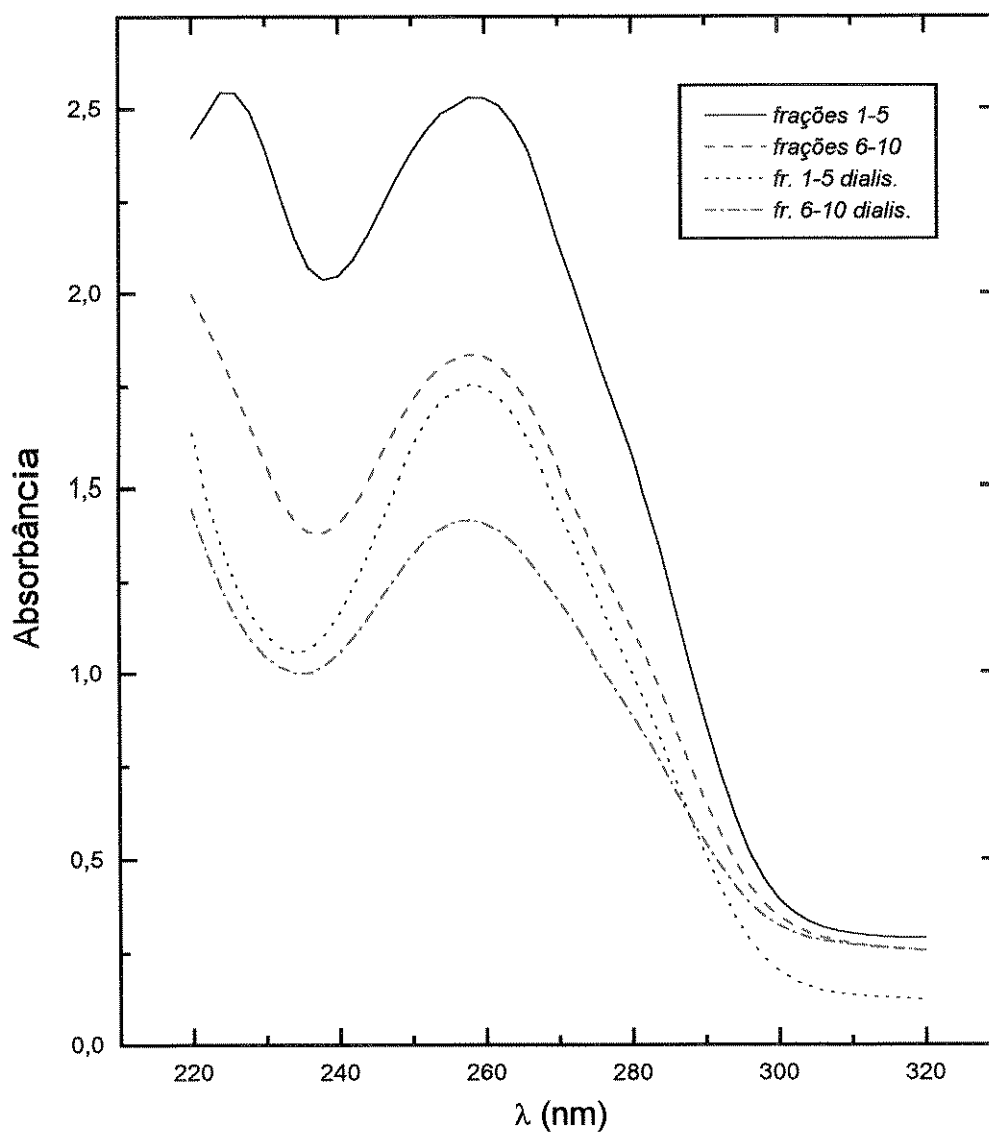


Figura 5. Curvas de absorvância espectral de "pools" de frações do gradiente de Cs_2SO_4 com alta concentração de partículas antes e depois da diálise em KPB 0.05M

Outro parâmetro relacionado com o conteúdo de ácido nucléico é a relação entre a absorbância máxima, observada em 258-260nm, e a mínima que ocorreu em 234-238nm. Na purificação analisada na Figura 6 a relação $A_{\max}/A_{\min}$ foi de 1,24 e 1,32 para os pools de frações 1-5 e 6-10, respectivamente, passando para 1,66 e 1,42 após a diálise. Estes valores são consistentes com os observados para outros vírus poliédricos e indicativos de conteúdo de ácido nucléico acima de 20% (NOORDAM, 1973).

O exame ao microscópio eletrônico das frações do gradiente de densidade misto de sacarose e sulfato de cézio, em contraste negativo com ácido fosfotúngstico, permitiu a visualização de alta concentração de partículas isométricas com 24-26nm de diâmetro (Figura 6). A contrastação com ácido fosfotúngstico permitiu observar detalhes estruturais na maioria das partículas virais, diferentemente do observado em contraste com acetato de uranila (VEGA et al.1997). Este fato pode ser indicativo de algum efeito desestabilizador da estrutura viral por parte do íon fosfotungstato, como relatado para alguns membros da família Tricornaviridae (JOHNSON & ARGOS, 1985). Também foram visualizadas partículas do mesmo tipo quando realizados testes de microscopia eletrônica de imunoabsorção com o anti-soro para o BYDV-PAV, indicando algum grau de relação serológica com esse vírus.

A alta concentração de partículas virais conseguida nas purificações possibilitou a imunização dos animais na expectativa da obtenção de um anti-soro para diagnóstico.

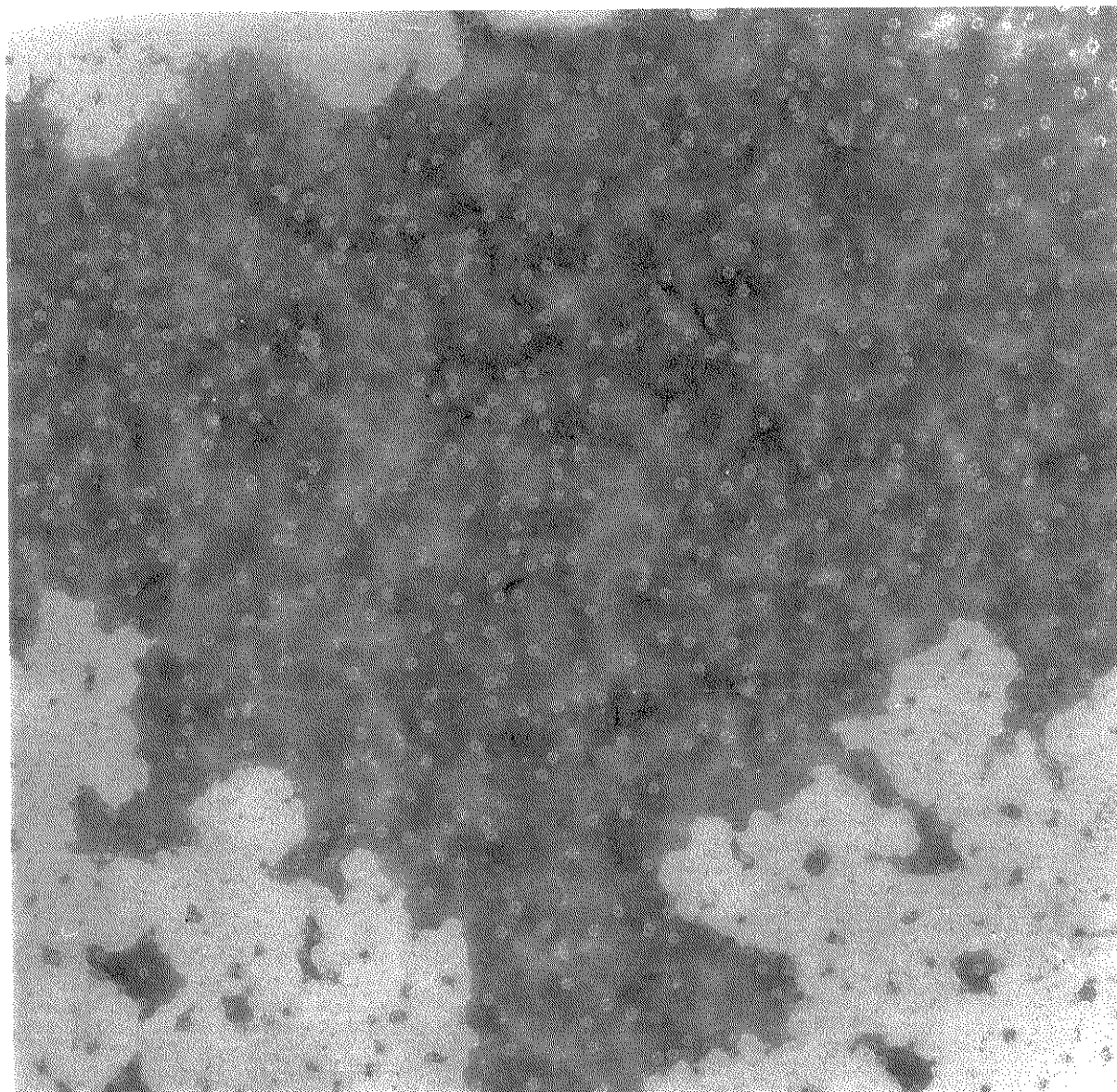


Figura 6. Micrografia eletrônica das frações 3 e 4 do gradiente misto de sacarose e Cs_2SO_4 mostrando partículas isométricas de ca.25nm contrastadas negativamente com fosfotungstato de sódio. (74700 X)

4.2. Avaliação dos anti-soros

Os testes PTA-ELISA com os anti-soros produzidos em coelhos mostraram um grau de reatividade considerável com os antígenos, em comparação com o soro coletado antes da primeira imunização. As leituras de absorbância porém, foram muito baixas após a primeira imunização, indicando um baixo título e revelando diferenças entre os antisoros do 3 coelhos.

Após a aplicação de "boosters" nos animais, foi verificado o aumento no título dos anti-soros em testes PTA-ELISA posteriores. Quando foram incluídos extratos de plantas sadias e doentes, foi verificada uma forte reação inespecífica do anti-soro para o VAFCA com o extrato de plantas sadias.

Nos testes DASI-ELISA, com anti-soros e imunoglobulinas de ovos, a situação repetiu-se. Os resultados foram consistentes usando-se as purificações do vírus e tampão carbonato como controle negativo. Entretanto, ocorreu uma forte reação inespecífica com extrato de plantas sadias, menor comparativamente a observada em PTA-ELISA com anti-soro de coelho. A reação dos anti-soros com extratos de plantas sadias deve-se, provavelmente, à produção pelos animais de anticorpos para alguma proteína imunogênica da planta presente nas purificações realizadas.

As imunoglobulinas de ovos purificadas pelos 3 diferentes métodos puderam ser objetivamente avaliadas por PTA-ELISA. O melhor método de extração da fração IgG foi o do

PEG/Etanol, juntamente com método do clorofórmio. A preferência para extrações posteriores foi dada ao método PEG/Etanol, devido à recuperação da mesma quantidade de imunoglobulina em um volume final menor. O método de extração com o uso somente de PEG mostrou-se menos eficiente que os anteriores.

As imunoglobulinas obidas de ovos também mostraram reação inespecífica com o extrato da planta sadia, porém em menor intensidade que os testes com anti-soro de coelhos. Outra observação foi que as absorbâncias dos extratos de plantas doentes foram sempre maiores que as dos extratos de plantas sadias, fato não evidenciado nos testes anteriores.

A pré-adsorção dos anti-soros com extrato semi-purificado de plantas oriundas de seedlings, diminuiu sensivelmente a reatividade dos anti-soros com os extratos de plantas sadias, comparativamente à reatividade com os extratos de plantas doentes. A inclusão dos extratos semi-purificados como antígenos, realçou esses resultados no caso de antisoros de coelhos, mostrando uma maior diferença entre as absorbâncias de extratos de plantas doentes e extratos de seedlings (Figura 7). Todavia, quando esses extratos semipurificados foram testados com as imunoglobulinas de galinhas, resultados menos uniformes foram encontrados, não permitindo uma resposta conclusiva. Quando comparados às purificações do vírus, os extratos de plantas (semi-purificados ou não), sempre apresentaram maior absorbância nos testes PTA-ELISA. Esses resultados não refletiram uma

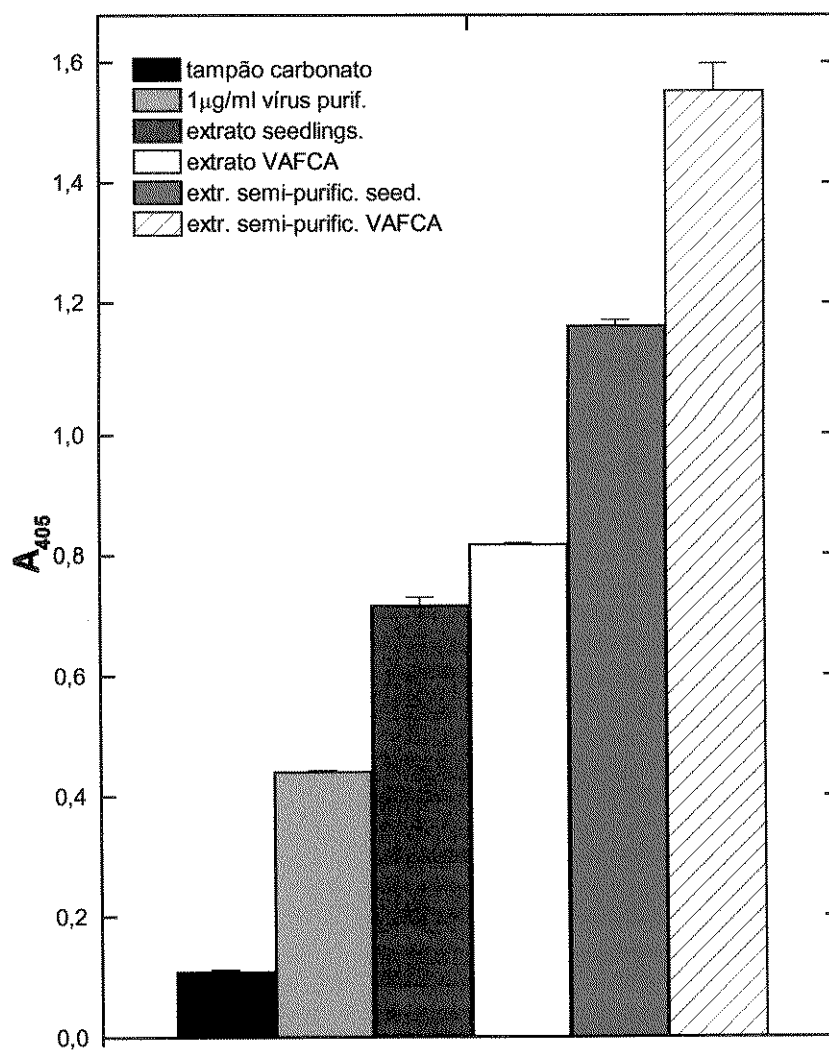


Figura 7. Resultados de um PTA-ELISA com anti-soro de coelho pré-adsorvido com extrato processado de "seedlings". As semi-purificações referem-se ao processamento dos extratos usando a metodologia de purificação do vírus, até o passo anterior à primeira ultracentrifugação. As leituras foram feitas após 2 horas da adição do substrato

solução efetiva para o problema de reação-cruzada entre plantas sadias e infectadas.

A técnica de Tissue Blotting com membranas de nitrocelulose também denotou o problema de inespecificidade dos anti-soros. Apesar do bom grau de detalhamento dos feixes vasculares da folha de cana-de-açúcar no exame ao microscópio óptico sob luz transmitida, ambas as partes das membranas, impressas tanto com folhas de plantas doentes quanto sadias, mostraram reação com o anti-soro de coelho. A coloração ocorreu em áreas marcadas com o floema, xilema e algumas vezes tecido parenquimático, não havendo sinal da localização do vírus. Para alguns dos anti-soros testados o grau de reatividade (intensidade da coloração roxa), foi maior no espaço da membrana marcado com as plantas sadias. Esses resultados não possibilitaram conclusões objetivas.

SCAGLIUSI & LOCKHART (comunicação pessoal) vinham realizando trabalhos simultâneos aos nossos no sentido de obter um anti-soro para diagnóstico do VAFCA. Esses pesquisadores forneceram gentilmente um anti-soro e um conjugado dos anticorpos com fosfatase alcalina, para nossa avaliação. A imunização dos animais para a obtenção do anti-soro foi feita com um "pool" de purificações de isolados brasileiros e havaianos do vírus. A disponibilidade de um conjugado para os anticorpos permitiu a execução do "Double Antibody Sandwich - ELISA" (DAS-ELISA), cuja especificidade é maior que as do PTA-ELISA e DASI-ELISA, que vinham sendo realizados. Após uma extensa rotina de testes DAS-ELISA para ajustar uma metodologia confiável de diagnóstico (SCAGLIUSI

et al., 1997), as plantas do segundo ensaio foram testadas para o VAFCA. Esse passo permitiu uma maior confiabilidade na separação entre plantas sadias e infectadas para as análises que se seguiram.

4.3. Alterações nos teores de pigmentos fotossintéticos

Nos dois ensaios ocorreram reduções expressivas no conteúdo de pigmentos das plantas infectadas com o VAFCA (Figuras 8 e 10). A clorofila *a* (Cla) apresentou as maiores reduções, com diferenças estatísticas em ambos ensaios. O conteúdo de carotenóides, ou seja, xantofilas e carotenos (Cx + c, conforme proposto por LICHTENTHALER & WELLBURN, 1983) apresentou redução estatisticamente significativa apenas no segundo ensaio. Apesar das visíveis reduções nos conteúdos de clorofila *b* (Clb) das plantas infectadas, mostradas nas figuras 7 e 9, essas não foram estatisticamente diferentes.

As alterações encontradas nos teores de pigmentos fotossintéticos nas plantas doentes seria uma consequência previsível da infecção viral, principalmente nas plantas com sintomas visíveis. Conforme retratado por GOODMAN et al. (1986), os sintomas clássicos provocados por fitovirose em suas hospedeiras constituem efeitos da ação do vírus sobre a síntese de clorofila e a ruptura na estrutura e função dos cloroplastos. Todavia as plantas avaliadas encontravam-se em diferentes estádios do desenvolvimento de sintomas, especialmente no segundo ensaio, onde muitas não apresentavam sintomas visíveis. Parece então, que a redução na síntese

e/ou a degradação de pigmentos esteja ocorrendo antes que os sintomas se tornem visíveis.

A razão Cla/Clb também sofreu uma queda nas plantas infectadas (Figuras 9 e 11), chegando no segundo ensaio a uma redução estatisticamente significativa. Não há qualquer relato sobre esse aspecto na infecção por fitoviroses. Entretanto, diminuições na razão Cla/Clb induzidas por sombreamento são interpretadas como indicativas de maior empilhamento de tilacóides e uma diminuição das lamelas intergrana, aumentando a razão PSII/PSI (TINOCO-OJANGUREN & PERCY, 1995) - esse fato levaria a um aumento na capacidade de produção de ATP. Sabe-se que a replicação viral e a síntese de ácido nucléico provocam um aumento na demanda de energia na forma de ATP nas células infectadas (SEATON et al., 1995). Provavelmente essa seja a causa para as reduções na razão Cla/Clb encontradas.

Certamente estão envolvidos no desenvolvimento de sintomas aspectos sobre os processos fotoquímicos primários que irão caracterizar um processo fotoinibitório. Prováveis alterações no metabolismo e na regulação da expressão gênica da síntese de pigmentos e proteínas do cloroplasto devem dar sequência ao processo (BALACHANDRAM et al. 1997). As análises de fluorescência da clorofila a retratadas a seguir mostrarão a interferência da infecção viral em algumas etapas fotobioenergéticas do processo fotoinibitório, complementando as informações apresentadas nesse item.

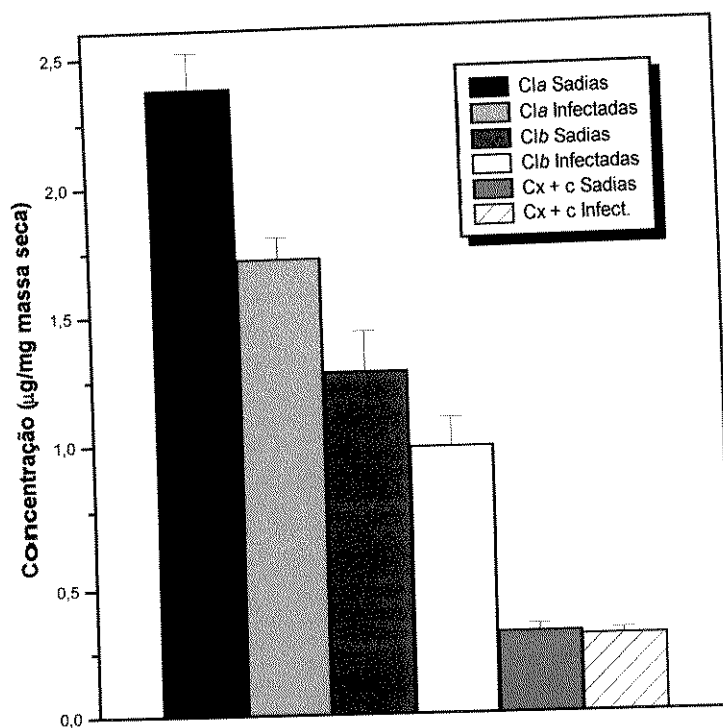


Figura 8. Médias das concentrações de pigmentos nos dois tratamentos no 1º ensaio

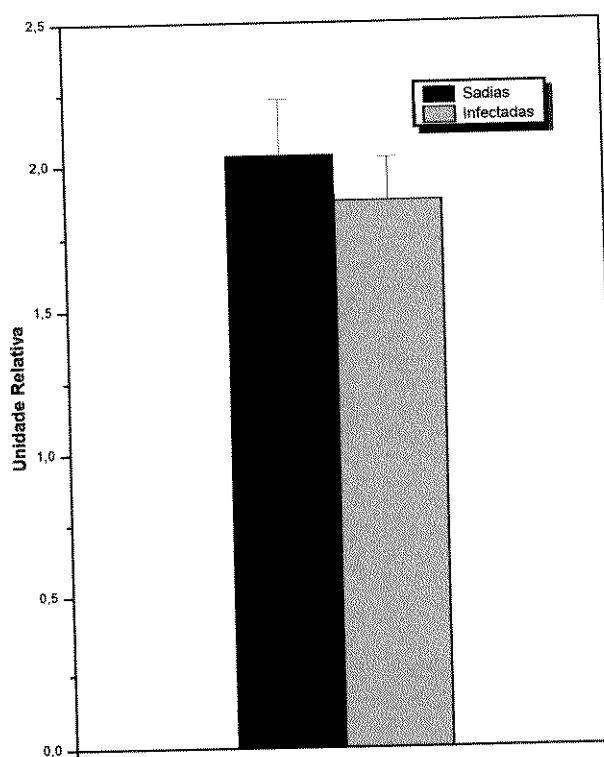


Figura10 .Média da relação Cla/Clb nos dois tratamentos no 1º ensaio

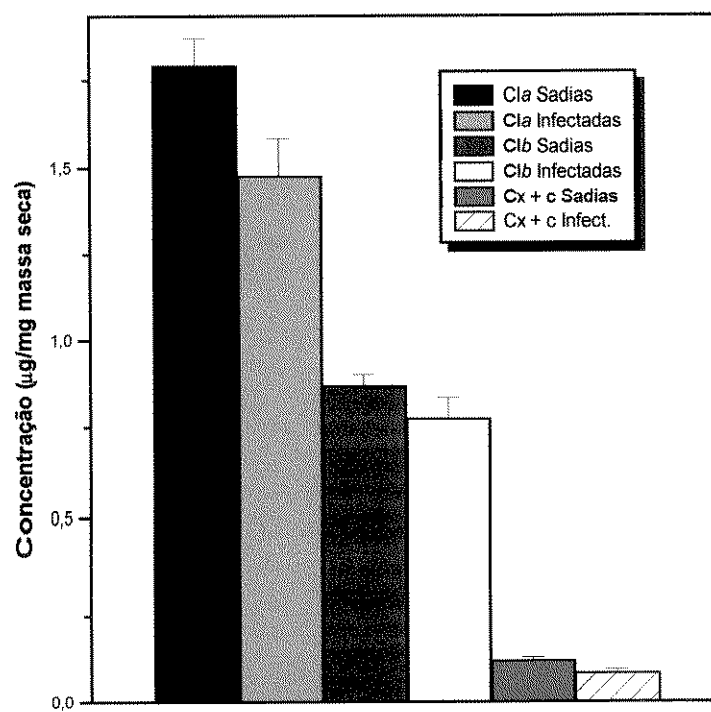


Figura 9. Médias das concentrações de pigmentos nos dois tratamentos no 2º ensaio

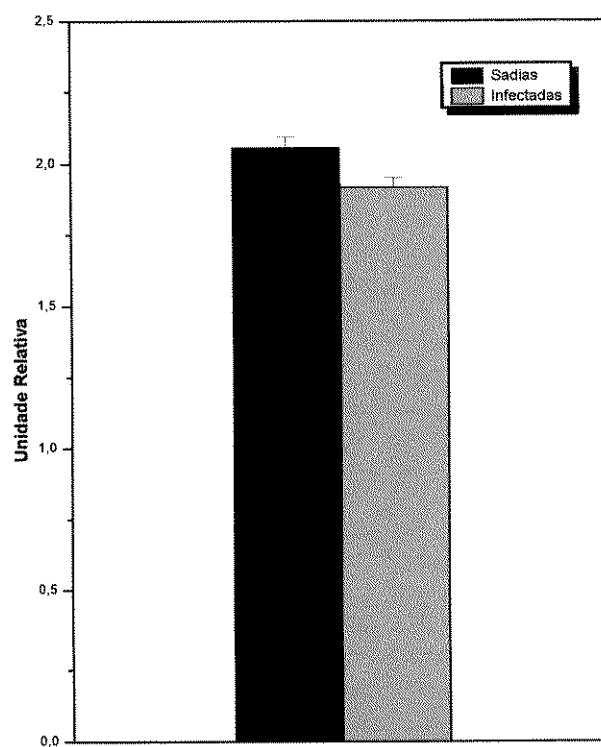


Figura 11. Média da relação Cla/Clb nos dois tratamentos no 2º ensaio

4.4. Avaliações da fluorescência da clorofila a

4.4.1. Parâmetros da fluorescência da clorofila.

Conforme ilustrado nas figuras 12, 13 e 14, no primeiro ensaio as plantas infectadas mostraram aumento na fluorescência inicial (F_0) nas cinco medições realizadas, porém em apenas uma delas as diferenças foram estatisticamente significativas. A fluorescência máxima (F_m) apresentou-se reduzida em todas as medições, mas sem diferenças significativas. A razão F_v/F_m , que reflete a eficiência quântica da fotossíntese, apareceu sempre reduzida nas plantas com o vírus, porém com diferenças significativas em duas medições.

No segundo ensaio a mesma tendência na variação dos parâmetros foi observada. As plantas infectadas apresentaram aumentos em F_0 , com diferenças estatisticamente significativas em uma das três medições. Os demais parâmetros (F_m e F_v/F_m) também foram reduzidos nas plantas infectadas, mas sem diferenças estatisticamente significativas (Figuras 15 e 16). Um aumento inesperado de F_m nas plantas infectadas foi verificado na primeira medição.

As alterações encontradas nos parâmetros da fluorescência da clorofila a, parecem ter seguido o padrão do segundo componente do processo fotoinibitório identificado por KRAUSE (1988), e associado por BALACHANDRAN et al. (1997) ao desenvolvimento de sintomas de infecção por fitoviroses. O aumento em F_0 e a diminuição em F_m e na razão F_v/F_m , são

4.4. Avaliações da fluorescência da clorofila a

4.4.1. Parâmetros da fluorescência da clorofila.

Conforme ilustrado nas figuras 12, 13 e 14, no primeiro ensaio as plantas infectadas mostraram aumento na fluorescência inicial (F_0) nas cinco medições realizadas, porém em apenas uma delas as diferenças foram estatisticamente significativas. A fluorescência máxima (F_m) apresentou-se reduzida em todas as medições, mas sem diferenças significativas. A razão F_v/F_m , que reflete a eficiência quântica da fotossíntese, apareceu sempre reduzida nas plantas com o vírus, porém com diferenças significativas em duas medições.

No segundo ensaio a mesma tendência na variação dos parâmetros foi observada. As plantas infectadas apresentaram aumentos em F_0 , com diferenças estatisticamente significativas em uma das três medições. Os demais parâmetros (F_m e F_v/F_m) também foram reduzidos nas plantas infectadas, mas sem diferenças estatisticamente significativas (Figuras 15 e 16). Um aumento inesperado de F_m nas plantas infectadas foi verificado na primeira medição.

As alterações encontradas nos parâmetros da fluorescência da clorofila a, parecem ter seguido o padrão do segundo componente do processo fotoinibitório identificado por KRAUSE (1988), e associado por BALACHANDRAN *et al.* (1997) ao desenvolvimento de sintomas de infecção por fitovirose. O

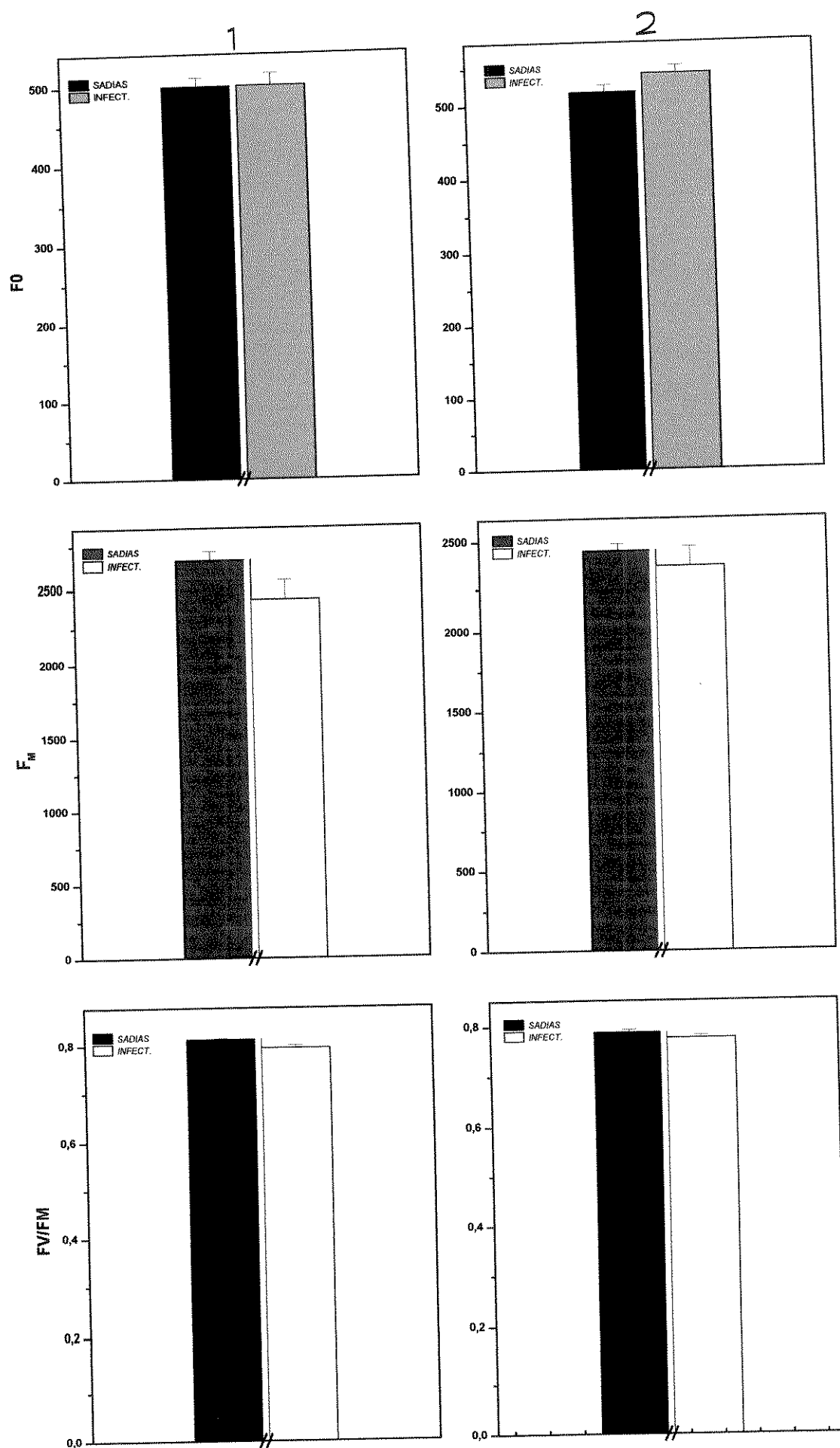


Figura 12 . Parâmetros da avaliação da fluorescência da clorofila a no 1º ensaio

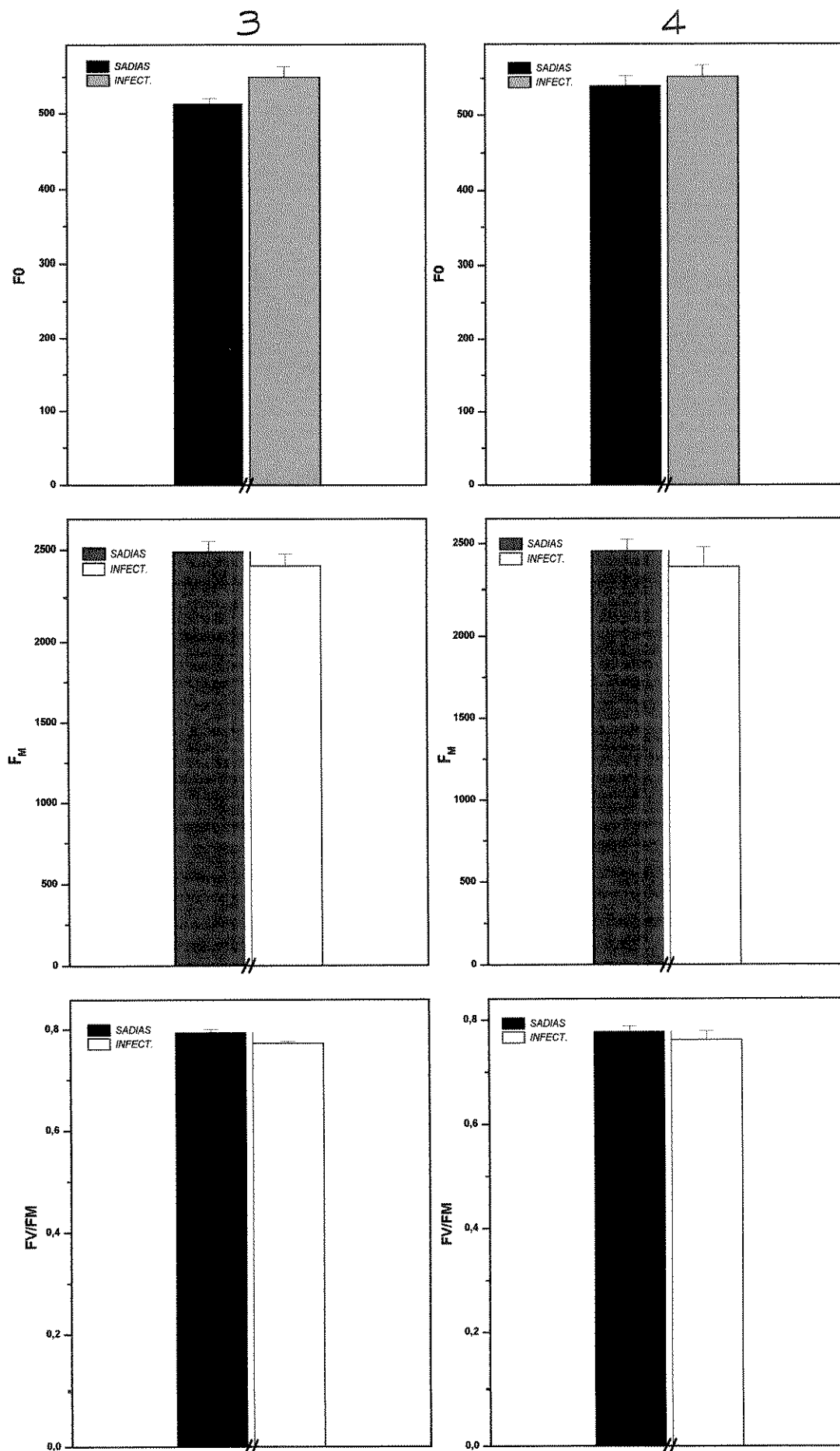


Figura 13. Parâmetros da avaliação da fluorescência da clorofila a no 1º ensaio (Medições 3 e 4)

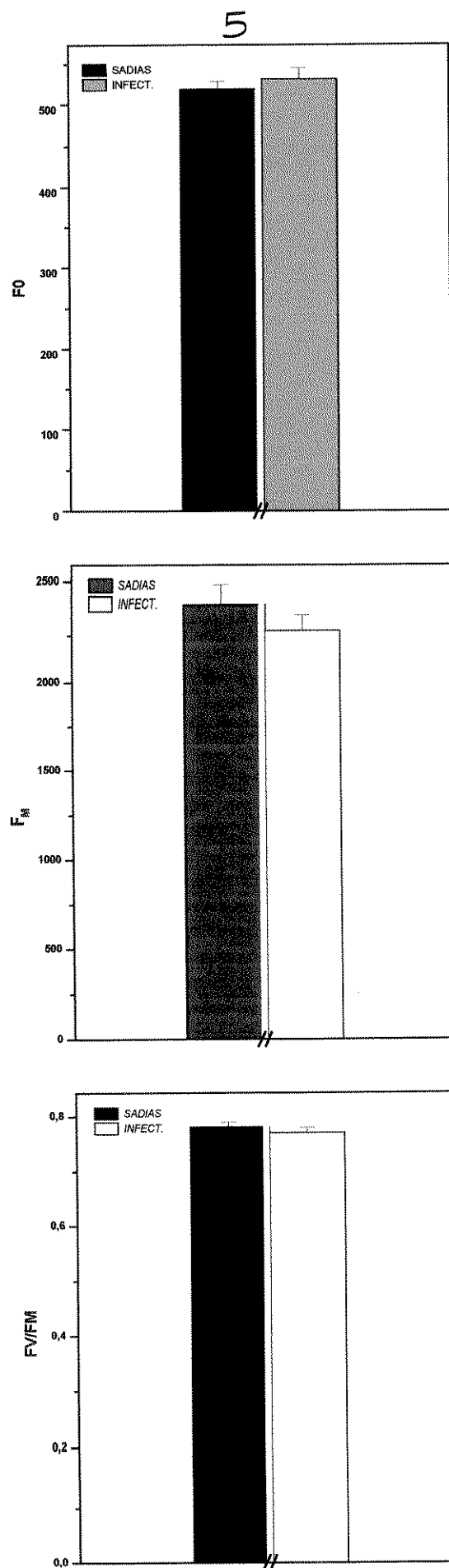


Figura 14. Parâmetros da avaliação da fluorescência da clorofila a no 1º ensaio (Medição 5)

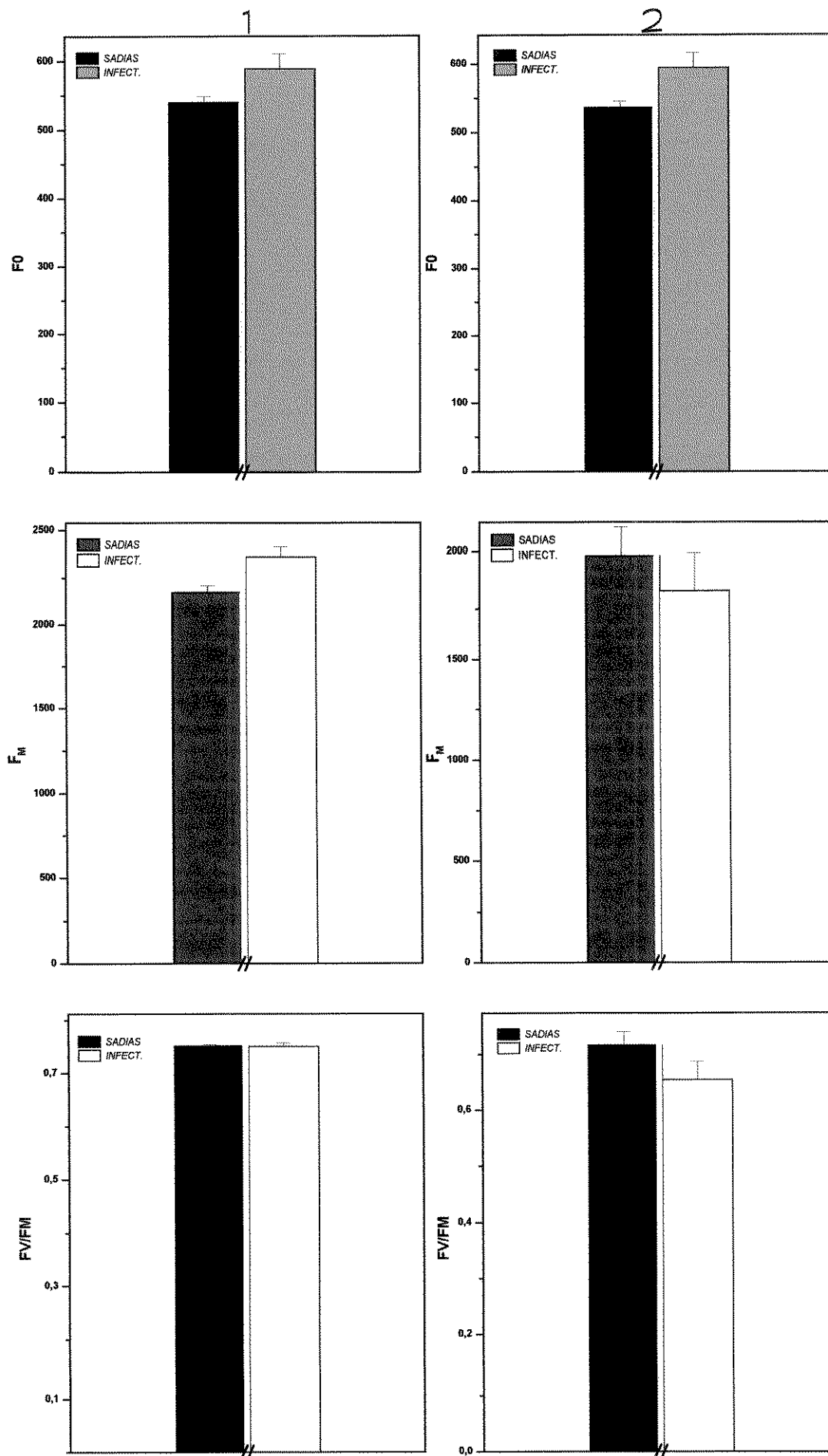


Figura 15. Parâmetros de avaliação da fluorescência da clorofila a no 2º ensaio (Medições 1 e 2)

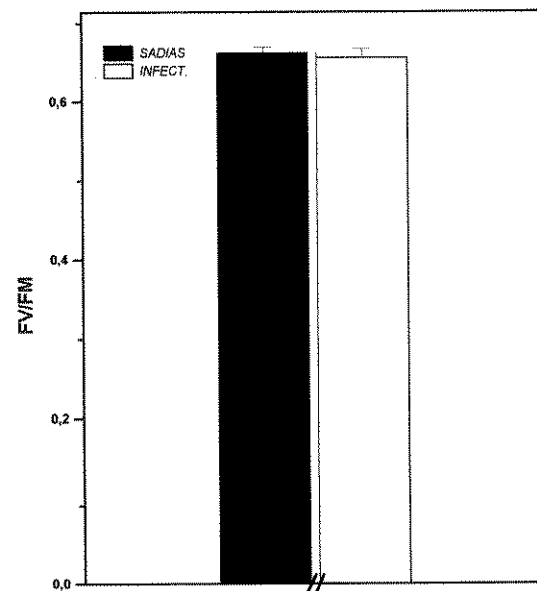
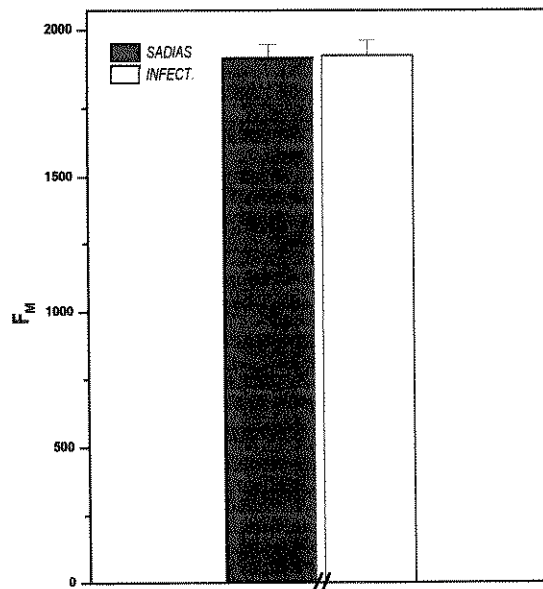
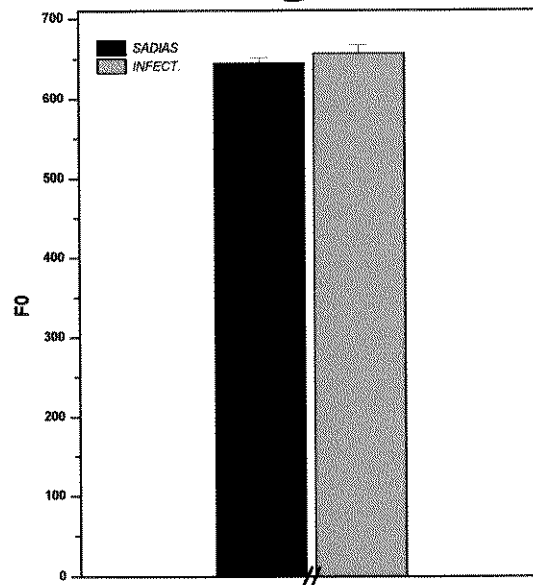


Figura 16. Parâmetros da avaliação da fluorescência da clorofila a no 2º ensaio (Medição 3)

A fase inicial do processo fotoinibitório, caracterizada pelo aumento da extinção não-fotoquímica e uma queda inicial em F_v/F_m e F_0 , não foi detectada nas plantas avaliadas. Essa fase ocorre dentro dos eventos fotoquímicos primários, durante o ajuste dos mecanismos de fotoproteção. Essa avaliação seria possível apenas com o acompanhamento do início do processo infeccioso do vírus, o que não pôde ser feito por trabalharmos com plantas sob infecção secundária (clones infectados). O conhecimento do modo de transmissão do vírus e a conseqüente transmissão em laboratório contribuirão para estudos futuros com a fluorescência da clorofila em plantas infectadas.

4.4.2. Cinética transitória da indução da fluorescência da clorofila

A elevação da fluorescência inicial à fluorescência máxima (F_0 a F_p) ocorre com alterações no potencial redox dos aceptores de elétrons no PSII, QA e QB, e do "pool" de plastoquinona. Após o tratamento de escuro, QA e QB estão oxidados, portanto os centros de reação do PSII estão abertos. Sob iluminação, QA torna-se reduzido e transfere elétrons para QB. O nível F_j , apresentado por STRASSER et al. (1995) reflete o equilíbrio $QA^-QB \leftrightarrow QAQB^-$, e durante a elevação de F_j até F_p , o pool de plastoquinona é sucessivamente reduzido por QB^{--} . No nível F_p , QA, QB e PQ estão inteiramente reduzidos pelo PSII; os centros de reação do PSII estão então fechados. Com o início da atividade do

PSI, o qual reoxida o pool de plastoquinona, QA e QB, a fluorescência máxima lentamente decresce até um estado de equilíbrio. A parte da cinética de indução que vai de F0 a Fp é denominada "elevação rápida da fluorescência da clorofila", a qual é completada entre 100 a 500 ms (LICHTENTHALER & RINDERLE, 1988), sendo referida no presente trabalho como cinética transitória da indução da fluorescência da clorofila.

As figuras 17, 18 e 19 mostram as pequenas diferenças encontradas entre plantas sadias e infectadas na fase F0-Fj, que representa a fase fotoquímica da emissão de fluorescência, conduzindo à redução de QA a QA⁻; nas três primeiras medições do primeiro ensaio e nas duas primeiras do segundo ensaio, essas diferenças seguiram uma curva característica mais pronunciada. A fase coberta por Fj-Fi-Fp é denominada fase não fotoquímica, devido a não dependência da intensidade de luz emitida. Variações nos passos intermediário, Fi, e final, Fp, refletem diferentes estados redox de QB (QAQB⁻ ou QA⁻QB⁻) e/ou vários tipos de complexos do PSII bioquimicamente diferentes, que reduzem o pool de PQ a velocidades diferentes - o passo Fi está ligado ao preenchimento do pool de PQ, e em Fp todas as moléculas de PQ estão reduzidas a PQH₂. As medições mencionadas na fase inicial (F0-Fj) também foram as que apresentaram curvas características diferentes entre plantas sadias e infectadas em Fj-Fi-Fp, com exceção da primeira medição do segundo ensaio, onde houve uma inversão do nível Fp entre sadias e infectadas observado nas demais medições

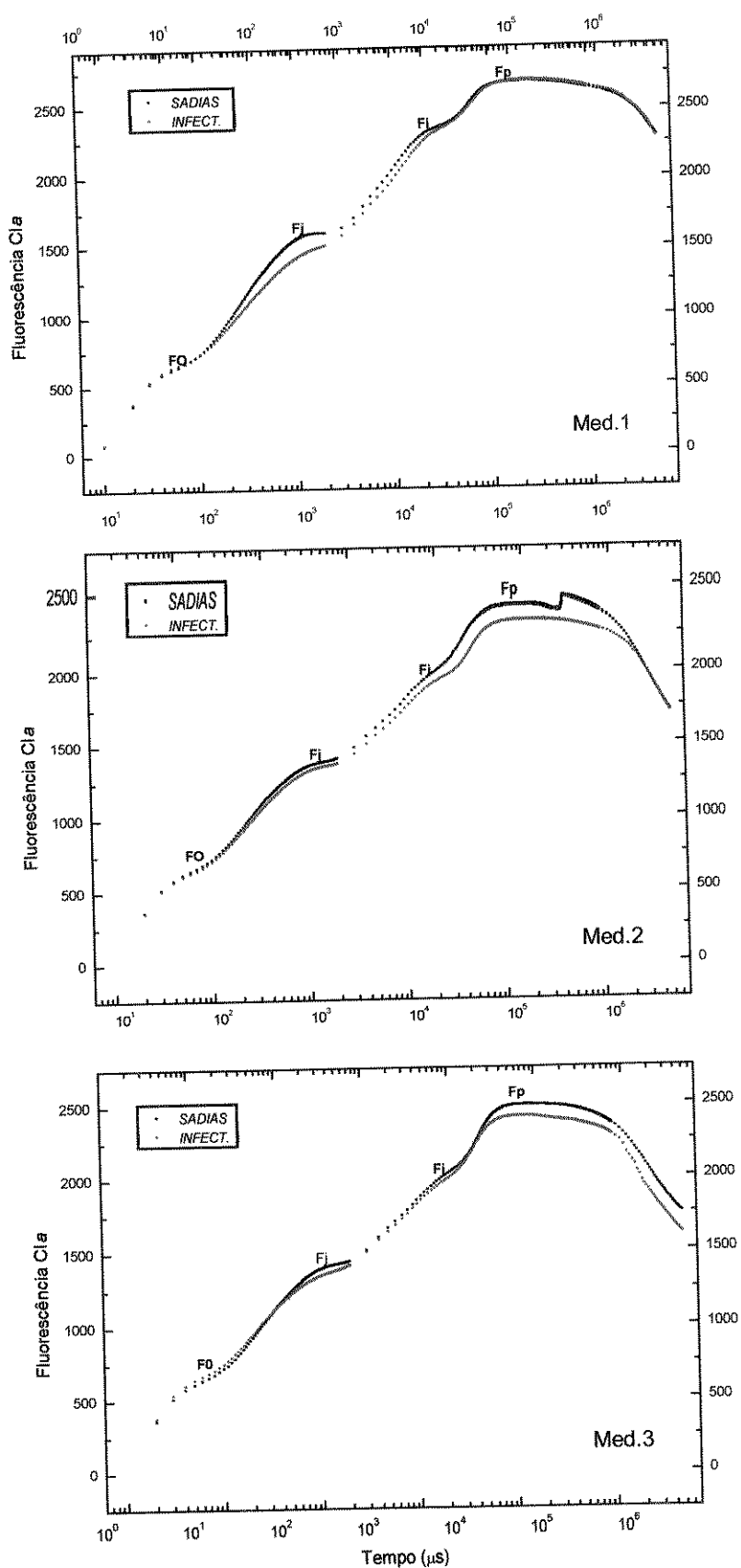


Figura 17. Cinética transitória da indução da fluorescência da clorofila *a* no 1º ensaio. Média de 9 repetições por tratamento. Modelo segundo Strasser *et al.* (1995)

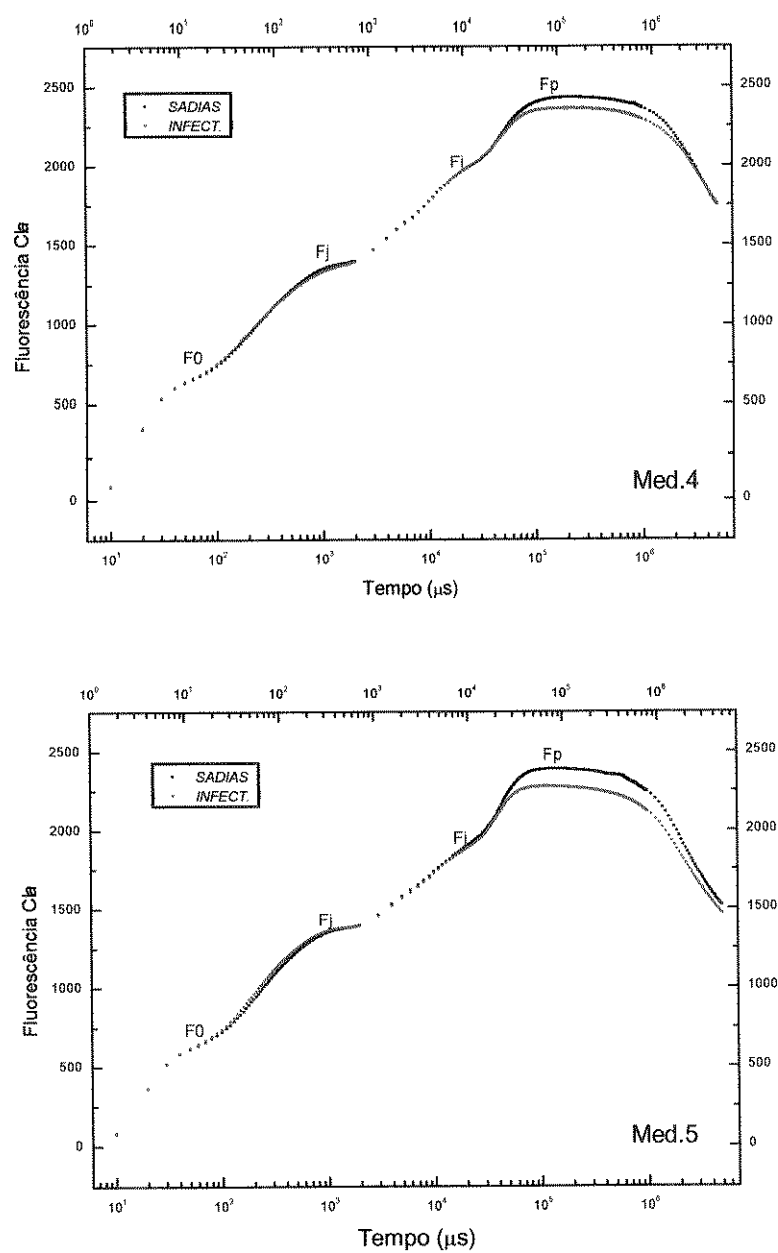


Figura 18. Cinética transitória da indução da fluorescência da clorofila a no 1^o ensaio
Média de 9 repetições por tratamento. Modelo segundo Strasser *et al.* (1995)

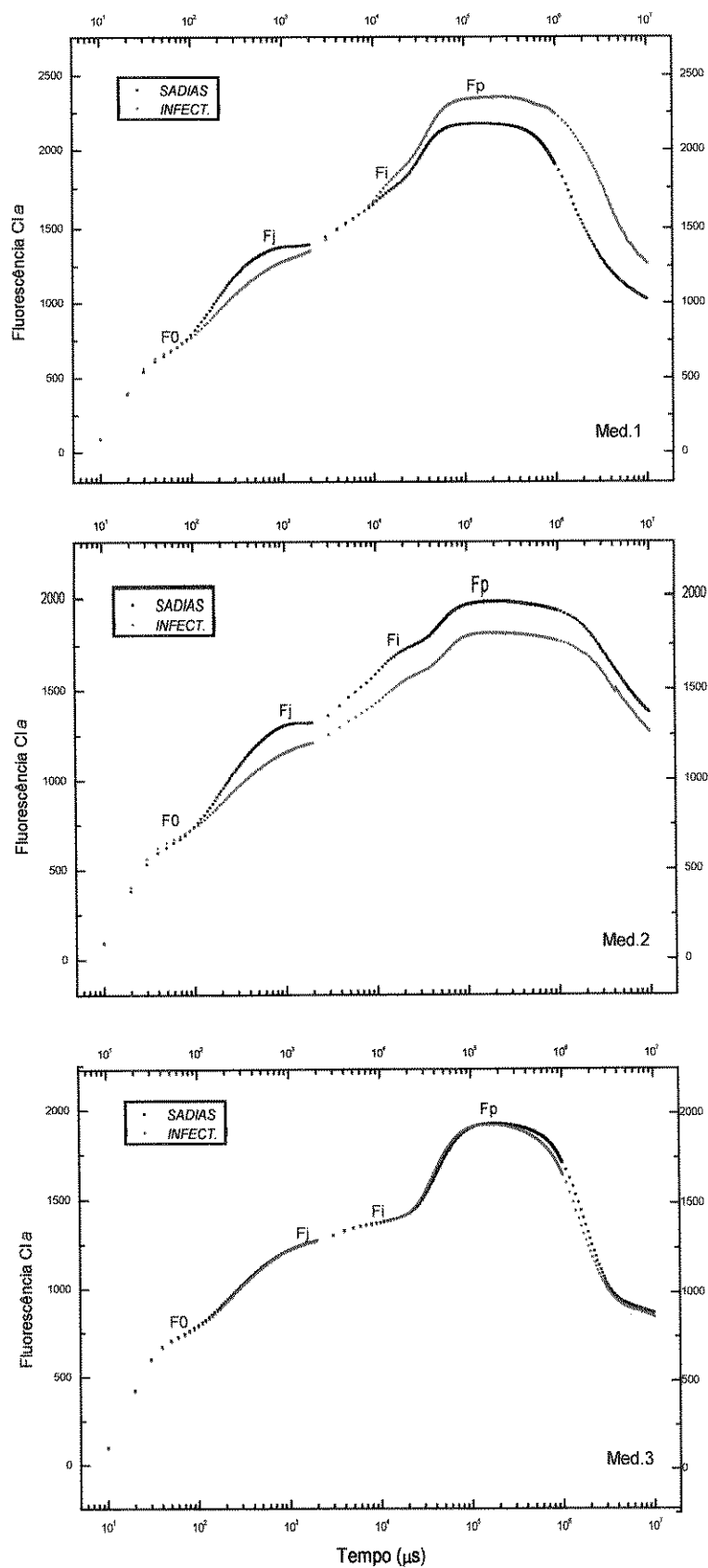


Figura19. Cinética transitória da indução da fluorescência da clorofila a no 2^o ensaio
Média de 9 repetições por tratamento. Modelo segundo Strasser *et. al* (1995)

Percebe-se nos gráficos da cinética de indução da fluorescência que, após o nível Fp, ocorrem diferenças claras em várias medições. Essa fase é denominada de queda lenta da fluorescência (LICHTENTHALER & RINDERLE, 1988) e é caracterizada pela extinção da fluorescência da clorofila, porém ela se estende até um nível de equilíbrio (T) que não é mostrado nos gráficos; a sua redução é comum quando a capacidade de fotoproteção no PSII é excedida durante o desenvolvimento de sintomas de fitoviroses (OSMOND, 1994). A extinção da fluorescência de Fp até T é formada por dois componentes: Q (extinção fotoquímica) e E (extinção não-fotoquímica), que está associada a energização da membrana do tilacóide e a formação de um gradiente de pH através da membrana. A quantificação de ambos pode ser feita com um fluorímetro modelo PAM (Pulse Amplitude Modulation Fluorometer).

A cinética da fluorescência rápida da clorofila provê uma aproximativa experimental para analisar as reações do PSII que conduzem ao preenchimento do pool de plastoquinona, fornecendo-nos uma estimativa limitada dos efeitos da infecção viral sobre o transporte eletrônico no PSII. O uso dessa análise permite-nos investigar o aparelho fotossintético *in vivo*, sob condições fisiológicas, que associado às análises dos pigmentos fotossintetizantes presentes no sistema de antenas do PSII, às trocas gasosas de CO₂ na fotossíntese e às dosagens dos teores de açúcares nas folhas infectadas, nos dá uma visão geral da interferência da infecção viral sobre o processo fotossintético, desde as

reações fotobioenergéticas iniciais ligadas a fotoinibição, até o transporte de fotoassimilados no tecido floemático.

4.5. Avaliações das taxas de troca líquida de CO₂

Em todas as medições realizadas com o IRGA foram encontradas reduções na atividade fotossintética das plantas infectadas, em termos da taxa de troca líquida de CO₂. As medições realizadas no campo apresentaram uma forte influência da radiação fotossinteticamente ativa e da temperatura, sujeitas a variações no decorrer do dia, sobre essas reduções.

A Figura 20 apresenta a média das taxas de troca líquida de CO₂ encontradas nos dois grupos de plantas em cada uma das cinco medições realizadas ao longo do dia. A primeira medição das 9:37 às 10:05 horas, (PAR $1560 \pm 90 \mu\text{moles fotons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; T^a $32,6 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$), mostra as menores diferenças as quais não foram estatisticamente significativas. Com o aumento da temperatura ($34,5 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$) e em especial do PAR ($1840 \pm 34 \mu\text{moles fotons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), a segunda leitura apresentou as maiores reduções significativas da troca de CO₂ nas plantas infectadas. A partir desse horário, com as temperaturas aumentando e o PAR diminuindo (Tabela 1), as diferenças nas taxas de trocas de CO₂ começaram a diminuir, porém continuaram estatisticamente significativas até a última leitura das 15:09 às 15:31 horas.

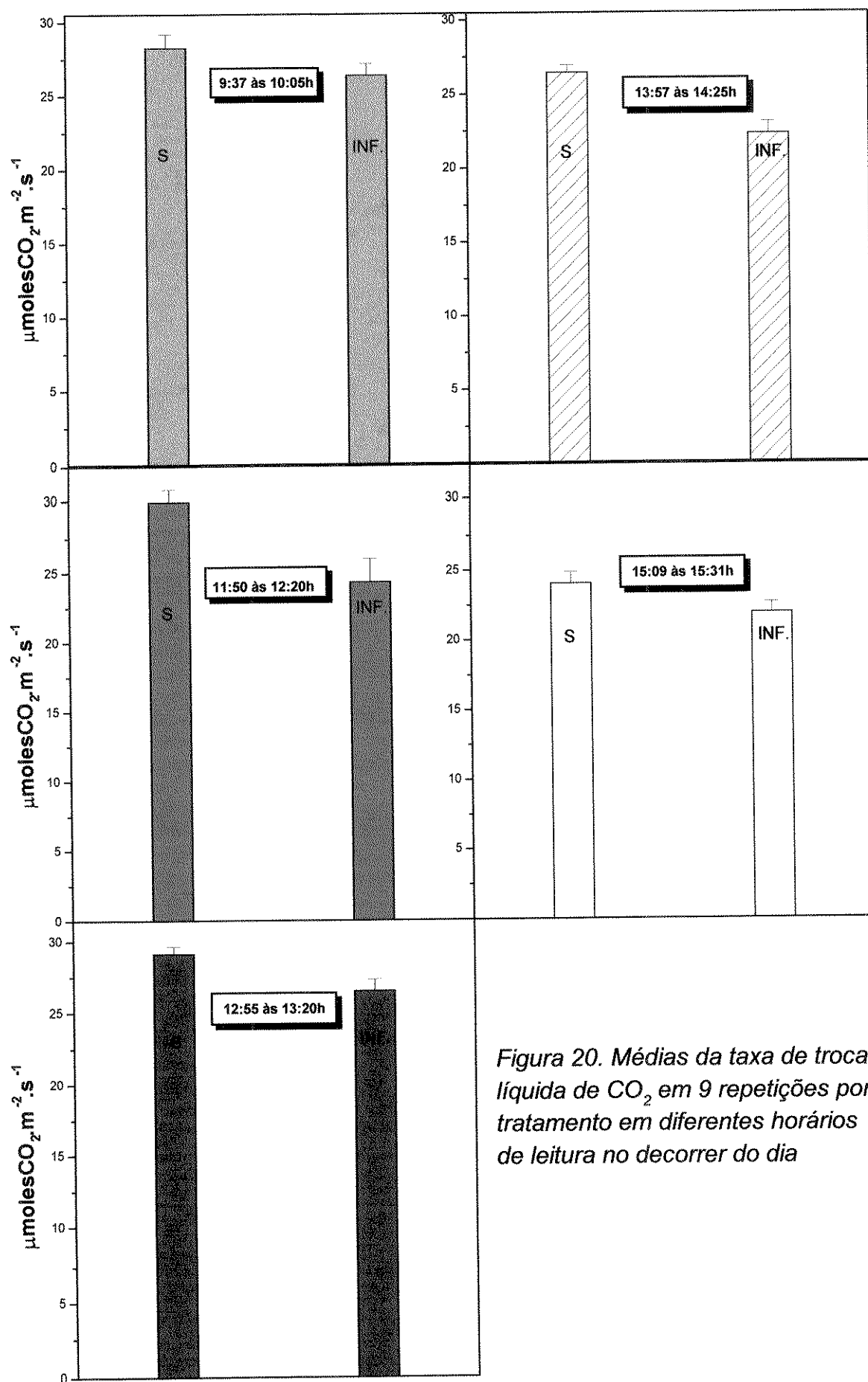


Figura 20. Médias da taxa de troca líquida de CO₂ em 9 repetições por tratamento em diferentes horários de leitura no decorrer do dia

Tabela 1 - Valores da temperatura e da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) durante as medições de trocas gasosas no decorrer do dia.

Horário das Medições	Temperatura $\pm$ SD ¹ (Celsius)	PAR $\pm$ SD ¹ (μ moles fótons.m ⁻² .s ⁻¹)
9:37-10:05h	32.6 $\pm$ 1.2	1560 $\pm$ 90
11:50-12:20h	34.5 $\pm$ 0.7	1840 $\pm$ 34
12:55-13:20h	36.11 $\pm$ 0.3	1677 $\pm$ 22
13:57-14:26h	36.7 $\pm$ 0.4	1373 $\pm$ 103
15:09-15:31h	35.6 $\pm$ 0.8	1060 $\pm$ 43

¹ SD- Desvio Padrão

A Figura 21 apresenta as taxas de troca líquida de CO₂ dos dois tratamentos em relação às variações no PAR no decorrer do dia; a curvas de regressão polinomial permitem uma visão do comportamento de plantas saudas e infectadas com o aumento da radiação fotossinteticamente ativa. O aumento da distância entre as curvas mostra que as plantas saudas aproveitaram mais eficientemente o aumento da irradiância para assimililação do CO₂. A infecção viral diminuiu a eficiência fotossintética em resposta ao aumento da radiação fotossinteticamente ativa.

No horário em que foram verificadas as maiores diferenças na taxa de troca de CO₂, as curvas de regressão (Figura 22) mostram que as plantas infectadas respondem bem ao aumento da irradiância até um limite próximo de 1600 μ moles fótons.m⁻².s⁻¹. A partir desse valor, de uma maneira

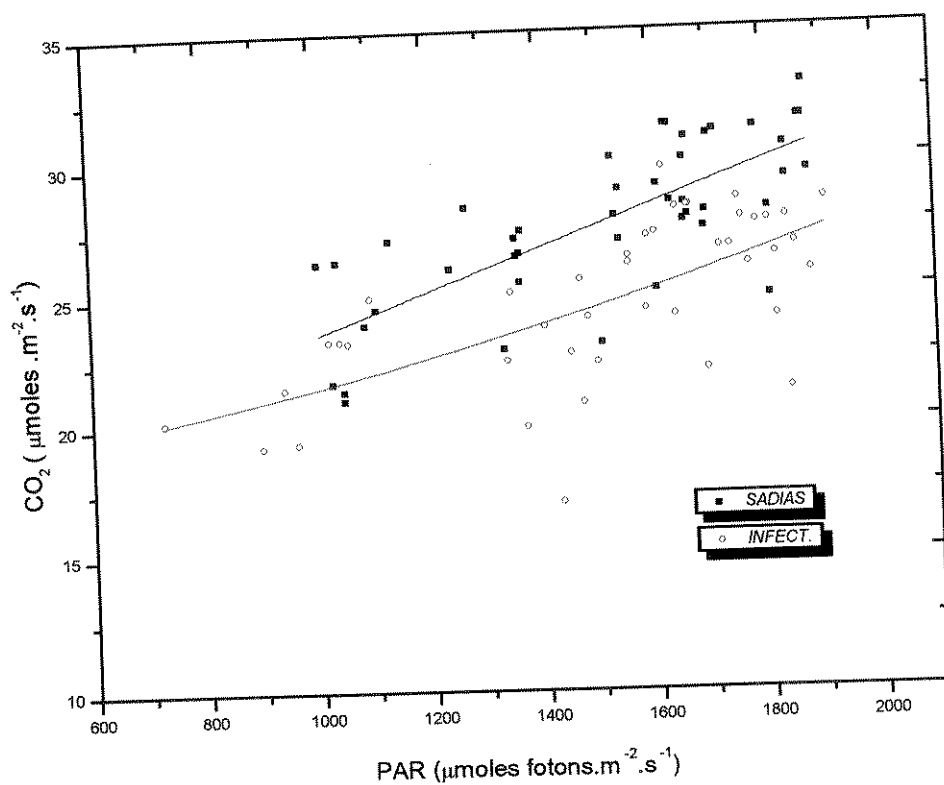


Figura 21 .Taxa de troca líquida de CO_2 das 9:30 às 15:30h. Curvas ajustadas por regressão polinomial

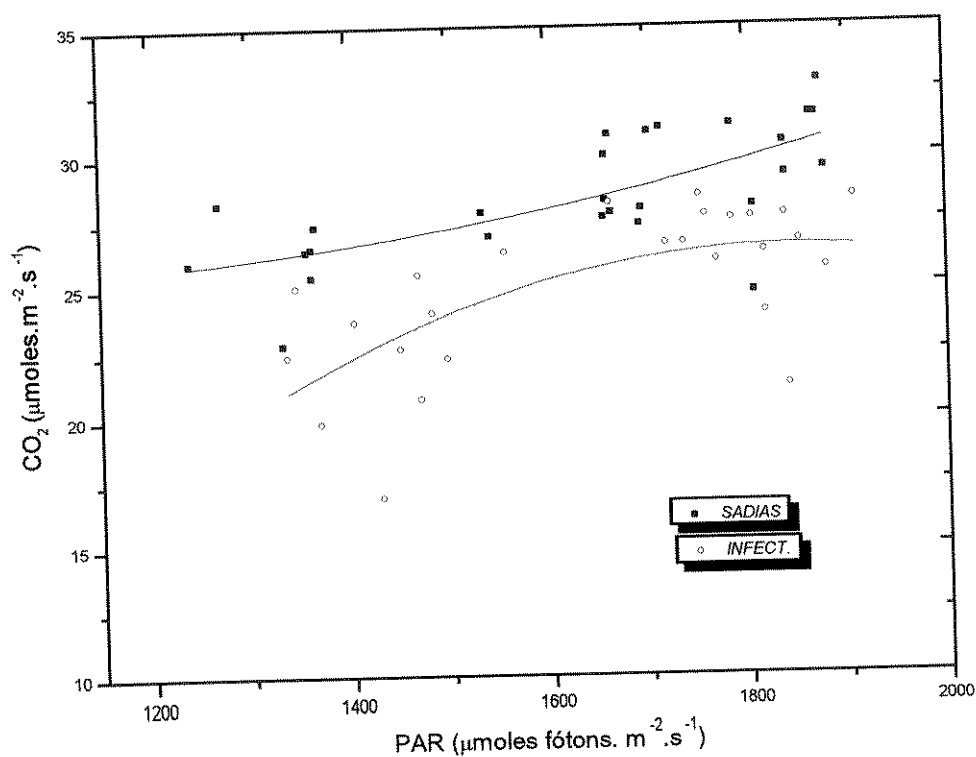


Figura 22. Taxa de troca líquida de CO_2 das 11:49 às 14:26h. Curvas ajustadas por regressão polinomial

geralizada, parece não haver mais aumento das das taxas de troca líquida de CO_2 em resposta ao aumento da irradiância. Entretanto, as plantas sadias continuaram a aumentar as trocas de CO_2 com valores de irradiância superiores a esse limite.

A interferência do horário do dia, devido às variações nas condições ambientes, também é apresentada na Figura 23, junto com as medições em laboratório sob condições controladas. Essas medições, com a temperatura de 24°C e o PAR fixo em $1246 \pm 33 \mu\text{moles fotons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, foram suficientes para detectar reduções significativas na atividade fotossintética das plantas infectadas. Parece então, que a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos possui grande interferência nas diferenças encontradas nas taxas de troca líquida de CO_2 entre plantas sadias e infectadas, independente da ocorrência de temperaturas elevadas.

Estes resultados indicam que um ou mais passos no processo de fixação de CO_2 estão sendo alterados pela infecção viral. A cana-de-açúcar, por ser uma planta C_4 , é quase duas vezes mais eficiente na fixação CO_2 que uma C_3 quando as temperaturas alcançam 25 à 35°C e os níveis de irradiância são elevados (SALISBURY & ROSS, 1994) - apesar das elevações de temperatura provocarem menor solubilidade do CO_2 no cloroplasto, além do fechamento estomático reduzindo a sua entrada. Essa característica é conferida pela capacidade das C_4 em aproveitar o CO_2 liberado pela descarboxilação de malato e aspartato nas células da bainha facilitando a

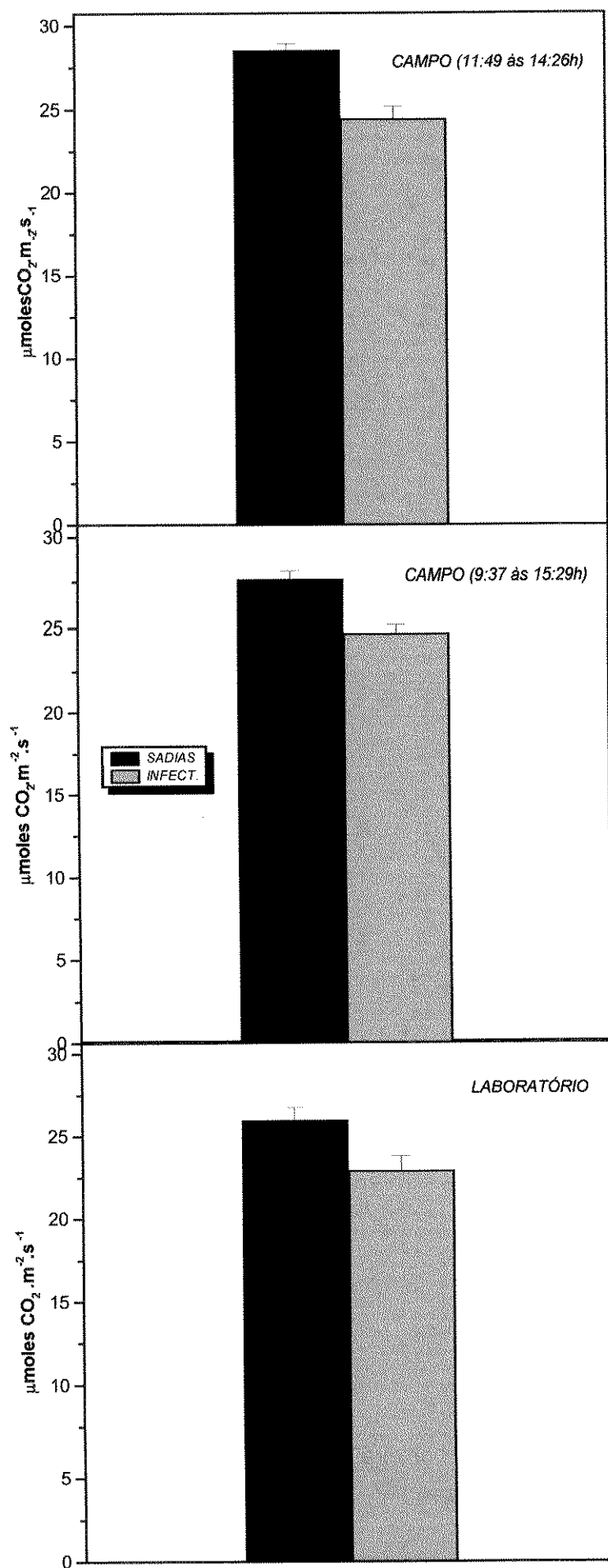


Figura 23. Médias da taxa de troca líquida de CO₂ em laboratório e sob diferentes condições ambientais no campo

produção de 3-PGA pela RUBISCO. Sabe-se que várias enzimas fotossintéticas dependem da luz e energia na forma de ATP e NADPH para fixação e redução do CO_2 , cuja disponibilidade nas células infectadas é reduzida pela utilização durante a replicação viral. Ainda a malato desidrogenase, que converte oxaloacetato à malato, está localizada nos cloroplastos, cuja estrutura e organização foram supostamente alterados pela presença do vírus. As diferenças encontradas no teor de pigmentos fotossintetizantes e na razão Cla/Clb são indícios dessas alterações, que além de afetarem o preenchimento do pool de plastoquinona do PSII, parecem ter influenciado também as características dinâmicas fotossintéticas de trocas gasosas.

4.6. Alterações nos teores de açúcares

As reduções provocadas pela infecção do vírus na eficiência fotossintética das plantas testadas poderiam, à primeira vista, ser acompanhadas por quebras nas taxas de açúcares provenientes do CO_2 fotossintético assimilado. No entanto, resultados bastante diversos desse prognóstico foram encontrados.

As figuras 24 e 25 apresentam os conteúdos de açúcares foliares dos dois tratamentos no primeiro e segundo ensaio, respectivamente. Houve um aumento nos conteúdos de açúcares das folhas infectadas em relação às sadias. Os diferentes níveis encontrados no primeiro e segundo ensaios, deve-se

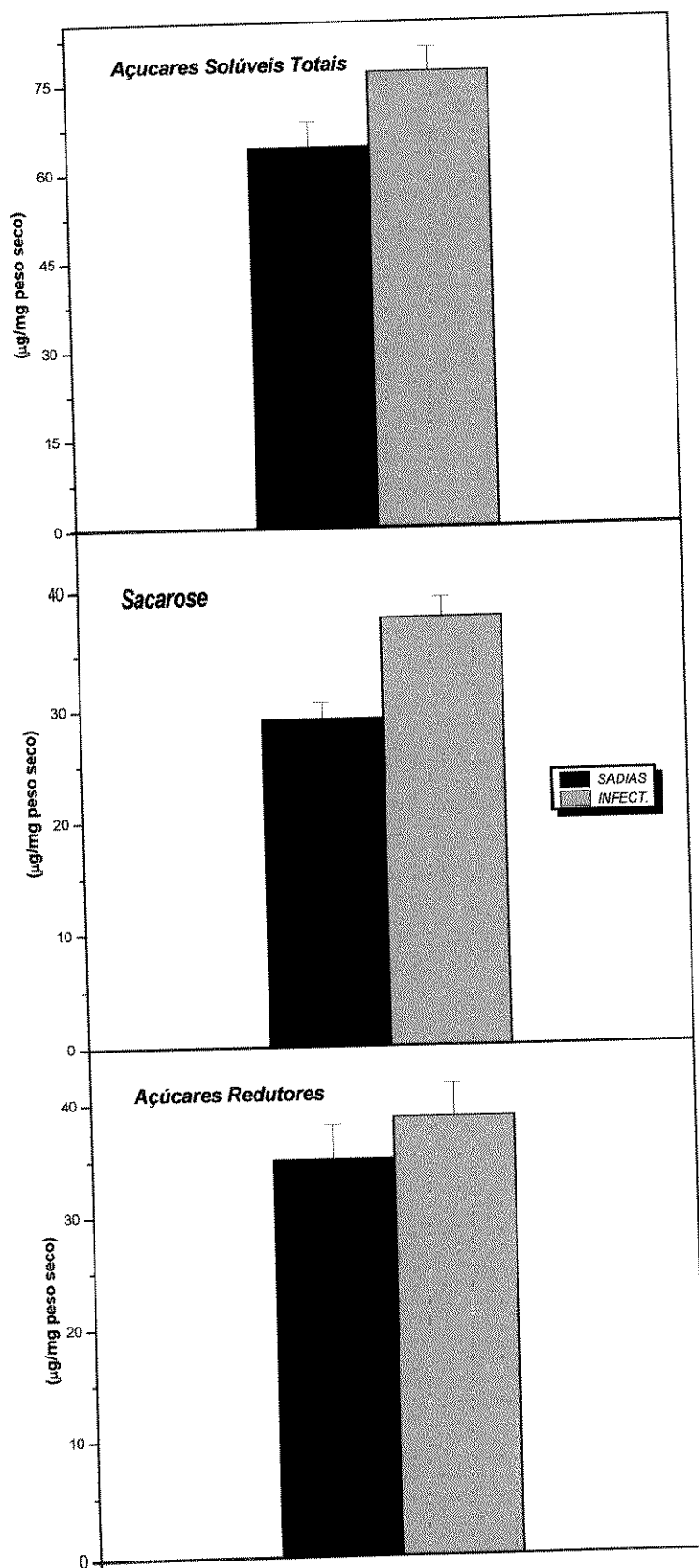


Figura 24. Médias das concentrações de açúcares foliares nos 2 tratamentos no 1º ensaio

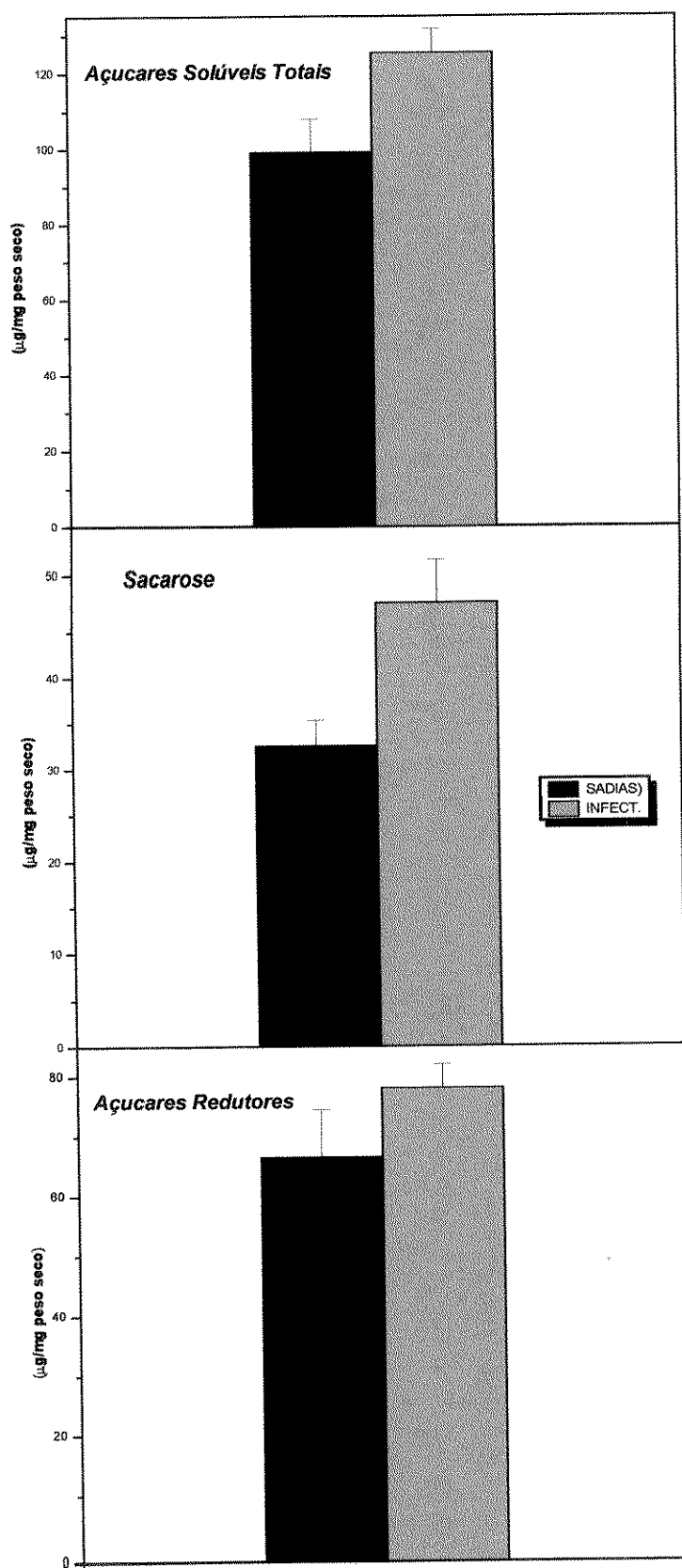


Figura 25. Média das concentrações de açúcares foliares nos dois tratamentos no 2º ensaio

provavelmente à diferença na idade e na severidade de sintomas entre as plantas dos dois ensaios.

Os significativos aumentos observados nos teores de todos os açúcares nas folhas das plantas infectadas com o vírus, está possivelmente ligado à presença do mesmo no tecido floemático da folha (VEGA *et al.*, 1997). Os luteovirus são restritos à multiplicação no floema (FRANCKI *et al.*, 1985), com células companheiras e elementos crivados usualmente invadidos. O carregamento de açúcares no floema, especialmente sacarose, e a distribuição para os drenos passa necessariamente por essas vias (GIAQUINTA, 1983; DELROT, 1987), as quais podem ter a sua função alterada pela presença do vírus. O PLRV, um luteovirus que incide sobre a cultura da batata, é conhecido por provocar efeitos similares nas folhas da hospedeira, prejudicando o transporte de carboidratos para a formação dos tubérculos (PETERS, 1987).

A replicação do genoma de virus de RNA fita simples de senso positivo (ssRNA⁺), entre os quais encontram-se os luteovirus, ocorre no citoplasma em estreita associação com superfícies de membranas (MATTHEWS, 1991). Após a replicação, interações entre proteínas de replicação e proteínas de movimento (MP) iniciam o processo de transporte dos genomas virais conduzindo-os aos plasmodesmas, por onde ocorre o transporte intercelular (CARRINGTON *et al.*, 1996); as proteínas de movimento interagem com os plasmodesmas provocando alterações na estrutura e funcionalidade dos mesmos (ATKINS *et al.*, 1991). Existem evidências que algumas espécies vegetais realizam o carregamento de açúcares no

floema por uma via simplástica (TURGEON 1989; TURGEON & WIMMERS, 1988), com o movimento seletivo de moléculas pelos plasmodesmas. Apesar do caráter especulativo, essas informações induzem à proposição de que uma provável disfunção dessas vias citoplasmáticas pelo vírus interporia ao carregamento de açúcares no floema, contribuindo para o seu acúmulo nas folhas sistematicamente infectadas. Resultados similares foram apresentados por BALACHANDRAM *et al.* (1995). Esses autores observaram o acúmulo de hexoses, sacarose e amido em plantas transgênicas expressando a proteína de movimento do TMV. A proposição é de que ocorre uma interferência no processo de transdução de sinal regulatório nos plasmodesmas do mesófilo, porém se a expressão da proteína de movimento do vírus nas células da hospedeira representa uma explicação generalizada para o acúmulo de carboidratos nas folhas infectadas, não foi demonstrado.

HERBERS *et al.* (1997) encontraram acúmulo de carboidratos em folhas de plantas transgênicas de fumo expressando a proteína de movimento do luteovírus do enrolamento da folha da batata (PLRV). Os plasmodesmas do tecido floemático dessas plantas sofreram distorções e um tipo de dilatação em comparação aos de plantas não-transgênicas. Sabe-se que para processos simplásticos de carregamento de sacarose, conforme sugerido inicialmente, plasmodesmas funcionais são requeridos. Esses autores sugerem que a proteína de movimento do PLRV poderia de alguma maneira interferir com o funcionamento normal dos plasmodesmas devido

à sua afinidade por certos constituintes deste, além de impedir o tráfego por essas vias, de moléculas sinalizantes que governam a comunicação entre órgãos fonte e dreno.

Similarmente aos nossos resultados, HERBERS *et al.* (1997) também constataram taxas de fotossíntese reduzidas, em termos de trocas de CO₂, nas plantas transgênicas expressando a proteína de movimento do PLRV. A explicação para tal fato foi que o acúmulo de carboidratos nas folhas jovens resulta nas taxas de fotossíntese reduzidas, um mecanismo o qual foi postulado ocorrer via "feed-back" inibitório pelos produtos finais da fotossíntese. Houve indícios que a inibição das taxas de assimilação de CO₂ em plantas transgênicas é mediada pela diminuição da expressão gênica de componentes fotossintéticos. No entanto, outros fatores, tais como limitação de fosfato e alterações nos níveis de atividades enzimáticas não foram descartados.

O açúcar que apresentou maior acúmulo nas folhas foi a sacarose, seguida pelos açúcares solúveis totais e açúcares redutores. Esses resultados estão de acordo com o esperado no caso de transporte floemático prejudicado, proposto acima. Uma vez que açúcares redutores não são transportados pelo floema (SALISBURY & ROSS, 1992), é condizente uma menor diferença dos seus teores entre plantas sadias e infectadas. No entanto, apesar de não serem precursores importantes, a conversão de açúcares redutores à sacarose para o transporte pelo floema, pode explicar as pequenas diferenças encontradas entre os dois tratamentos. A sacarose por sua vez, sendo o açúcar não-redutor mais abundantemente transportado pelo

floema, teve o maior acúmulo nas folhas infectadas devido às eventuais alterações provocadas pelo vírus nos tecidos floemáticos. Analogamente, os açúcares solúveis totais apresentaram um acúmulo intermediário entre sacarose e açúcares-redutores.

A diminuição no conteúdo de sacarose dos colmos de plantas infectadas podem ser atribuídas às quedas na eficiência fotossintética provocadas pela infecção viral. Todavia, esta parece não ser uma causa única da menor assimilação do carbono fotossintético, pois o acúmulo de açúcares nos tecidos foliares decorrente da menor capacidade de transporte pelo floema, contribui para o esclarecimento do fato. Uma resposta inibitória a esse acúmulo estaria atuando no controle da expressão gênica de enzimas fotossintéticas, reduzindo a atividade fotossintética. Além disso, considerando que os fotoassimilados movem-se através dos tubos crivados no tecido floemático, e que 90% ou mais do material transportado por esse tecido consiste de carboidratos (SALISBURY & ROSS, 1992), as alterações provocadas pela presença do vírus nessas estruturas seria fortemente responsável pela quebra na produção de sacarose nas plantas infectadas.

5. CONCLUSÕES.

1. A metodologia de purificação do vírus é reproduzível. Concentrações de partículas em torno de 100µg/mL e a razão $ABS_{260}/ABS_{280}=1,8$ são usualmente obtidas.
2. O espectro de absorção em UV, o tamanho de 25nm e o formato isométrico das partículas ao microscópio eletrônico, aliados à localização restrita ao floema, reforçam a hipótese do patógeno em questão tratar-se de um luteovirus, como sugerido inicialmente.
3. Não foi obtido sucesso na obtenção de anti-corpos para o vírus. Os anticorpos policlonais produzidos não constituem uma fonte segura de diagnóstico, mesmo com a sua pré-adsorção em extratos de plantas sadias.
4. A infecção pelo vírus provocou reduções nos conteúdos de Cla, Clb e carotenóides e na razão Cla/Clb. As reduções são acompanhadas por alterações na estrutura e função dos cloroplastos.
5. Estas alterações refletem na redução da atividade fotossintética em termos da taxa de troca líquida de CO₂, especialmente em altos níveis de radiação fotossinteticamente ativa.

6. Os reflexos estendem-se ainda sobre o transporte eletrônico no PSII. Os parâmetros da emissão da fluorescência da Cla (F_0 , F_m e F_v/F_m) e várias etapas do preenchimento do pool de PQ foram alteradas pela infecção viral.

7. Acúmulos de açúcares, em especial de sacarose, são encontrados nas folhas de plantas infectadas. Estes são devidos à presença (replicação e movimentação) do vírus nas células e plasmodesmas do floema foliar, alterando o seu funcionamento normal.

8. O transporte prejudicado de fotoassimilados pelo floema e as quedas na eficiência fotossintética parecem ser os principais responsáveis pela quebra na produção de sacarose de plantas infectadas com o VAFCA.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ANÔNIMO, 1994. Yellow leaf syndrome may be in Australia. BSES (Brisbane Sugar Experimental Station) Bull.48:14-15.
- ATKINS, D.; HULL, R.; WELLS, B.; ROBERTS, K.; MOORE, P. & BEACHY, R.N., 1991. The tobacco mosaic virus 30K movement protein in transgenic tobacco plant is localized to plasmodesmata. J. Gen.Virol. 72:209-211.
- BALACHANDRAN, S. & OSMOND, C.B., 1994. Susceptibility of tobacco leaves to photoinhibition following infection with two strains of tobacco mosaic virus under different light and nutrition regimes. Plant Physiol. 104:1051-57.
- BALACHANDRAN, S.; HULL, R.J.; VAADIA, Y.; WOLF, S. & LUCAS, W.J., 1995. Alteration in carbon partitioning induced by the movement protein of tobacco mosaic virus originates in the mesophyll and is independent of change in the exclusion size limit. Plant Cell Environ. 18:1301-1310.
- BALACHANDRAN, S.; HURRY, V.M.; KELLEY, S.E.; OSMOND, C.B.; ROBINSON, S.A.; ROHOZINSKI, J.; SEATON, G.G.R. & SLIMS, D.A., 1997. Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. Physiol. Plant. 100:203-213.
- BARKER, H., 1987. Invasion of non-phloem tissue in *Nicotiana clevelandii* by potato leafroll luteovirus is enhanced in plants also infected with potato Y potyvirus. J. Gen. Virol. 68:1223-27.

- BARNETT,A.; HAMMOND,J. & LISTER,R.M., 1981. Limited infection of cereal leaf protoplasts by barley yellow dwarf virus. J. Gen. Virol. 57:397-491.
- BJÖRKMAN,O. & DEMMIG,B., 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. Planta 170:489-504.
- BRADSHAW,A.D., 1987. Comparison - its scopes and limits. New Phytol. 106(Suppl.):3-21.
- CARRINGTON,J.C.; KASSHAW,K.D.; MAHAJAN,S.K. & SHAAD,M.C., 1996. Cell-to-cell and long distance transport of viruses in plants. Plant Cell 8:1669-81.
- D'ARCY,C.J.; TORRANCE,L. & MARTIN, R., 1989. Disrimination among luteoviruses and their strains by monoclonal antibodies and indentification of commom epitopes. Phytopathology 79:869-73.
- DELROT,S., 1987. Phloem loading: apoplastic or symplastic? Plant Physiol. Biochem. 25:667-676.
- DEMLER,S.A.; BORKHSENIUS,O.N.; RUCKER,D.G. & De ZOETEN,G.A., 1994. Assesment of the autonomy of replicative and structural functions encoded by the luteo-phase of pea enation mosaic virus. J. Gen. Virol. 75:997-1007.
- DINESH-KUMAR, S.P.; BRAULT,V. & MILLER,W.A., 1992. Precise mapping and *in vitro* translation of a trifunctional subgenomic RNA of barley yellow dwarf virus. Virology 187:711-22.

- DOKE, N. & TOMIYAMA, K., 1978. Effect of sulphydril-binding compounds on hypersensitive death of potato tuber cells following infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans*. *Physiol. Plant Path.* 12:133-39.
- DOKE, N.; GARAS, N.A. & KUC, J., 1980. Effect on host hypersensitivity of suppressors released during the germination of *Phytophthora infestans* cytopores. *Phytopathology* 70:35-39.
- DUBOIS, M.K.; GILLER, K.A.; HAMILTON, J.K.; RUBERS, P.A. & SMITH, T., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-56.
- FRANCKI, R.I.B.; MILNE, R.G. & HATTA, T., 1985. Luteovirus group. In: *Atlas of plant viruses*, vol 1. Boca Raton, Fl: CRC Press. pp.137-152.
- FRANCKI, R.I.B.; FAUQUET, C.M.; KNUDSON, D.L. & BROWN, F., 1991. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol. Suppl.* 2:450.
- GIAQUINTA, R.T., 1983. Phloem loading of sucrose. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 34:347-387.
- GIBBS, A. & HARRISON, B., 1976. *Plant Virology. The principles.* Edward Arnold eds. London 211p.
- GILL, C.C. & CHONG, J., 1979. Cytopathological evidence for the division of barley yellow dwarf virus isolates in two subgroups. *Virology* 95:59-69.
- GILL, C.C. & CHONG, J., 1981. Vascular cell alterations and predisposed xylem infection in oats by inoculation with paired barley yellow dwarf viruses. *Virology* 114:405-13.

- GONSALVES, D.; PURCIFUL, D.E. & GARNSEY, S.M., 1978. Purification and serology of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 68:553-559.
- GOODMAN, R.N.; KIRALY, Z. & WOOD, K.R., 1986. The biochemistry and physiology of plant disease. Univ. Missouri Press, Columbia, MO, USA.
- HAMMOND, J.; LISTER, R.M. & FOSTER, J.E, 1983. Purification, identity and some properties of an isolate of barley yellow dwarf virus from Indiana. *J Gen. Virol.* 64:667-676.
- HARAKAWA, R. 1993. Estudos Serológicos sobre o fungo *Hemileia vastatrix* Berk Et. Br. e sobre sua interação com plantas do gênero *Coffea*. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP, Brasil, tese de mestrado.
- HERBERS, K.; TACKE, E.; HAZIREZAEI, M.; KRAUSE, K.P.; MELZER, M.; ROHDE, W. & SONNEWALD, U., 1997. Expression of a luteoviral movement protein in transgenic plants leads to carbohydrate accumulation and reduced photosynthetic capacity in source leaves. *Plant J.* 12:1045-1056.
- HU, J.S.; ROCHOV, W.F. & DIETERT, R.R., 1985. Production and use of antibodies from hen eggs for the SGV isolate of barley yellow dwarf virus. *Phytopathology* 75(8)914-919.
- JOHNSON, J. E. and ARGOS, P. 1985. Virus stability and structure. In *The Plant Viruses Vol 1*, Francky, R I B, ed. Plenum Press. pp 19-56.
- KITAJIMA, E.W.; de ÁVILA, A.C. & RESENDE, R.O., 1997. Taxonomy of plant viruses. *Fitopatol. Bras.* 22(1):5-24.

- KOENING, R., 1979. ELISA in the study of homologous and heterologous reactions of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 40:309-318.
- KRAUSE, G.H., 1988. Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiol. Plant.* 74:566-574.
- KRAUSE, G.H. & WEIS, E., 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* 42:313-349.
- KUBO, S., 1981. Tobacco necrotic dwarf virus. In: *Descriptions of Plant Viruses* no 234, CMI/AAB, Kew, England.
- KUBO, S. & TAKANAMI, Y., 1979. Infection of tobacco mesophyll protoplasts with tobacco necrotic dwarf virus, a phloem limited virus. *J. Gen. Virol.* 42:387-398.
- LICHTENTHALER, H.K. & WELLBURN, A.R., 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Soc. Transactions* 11:591-2.
- LICHTENTHALER, H.K. & RINDERLE, U., 1988. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* 19 (Suppl. I):S29-S85.
- LIN, N.S.; HSU, Y.W. & HSU, H.T., 1990. Immunological detection of plant viruses and micoplasmalike organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology* 80:824-828.

- MARTIN, R.R.; KEESE, P.K.; YOUNG, M.J.; WATERHOUSE, P.M. & GERLACH, W., 1990. Evolution and molecular biology of luteoviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28:341-63.
- MATHEWS, R.E.F., 1991. *Plant Virology*, 3rd Edition. San Diego: Academic Press, 835p.
- MAYO, M.A. & ZIEGLER-GRAFF, V., 1996. Molecular biology of luteoviruses. *Adv. Virus Res.* 46:413-60.
- MILLER, W.A. & RASOCHOVÁ, L., 1997. Barley yellow dwarf viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35:167-90.
- NOORDAN, D., 1973. Identification of plant viruses. *Methods and experiments*. PUDOC-Wageningen 211p.
- PETERS, D., 1987. Spread of viruses in potato crops. In: de Bokx, J.A. & van der Want, J.P.H. eds. *Viruses of potatoes and seed-potato production*, 2nd ed. PUDOC-Wageningen. p.126-145.
- ROBERTSON, N.L.; FRENCH, R. & GRAY, S.M., 1991. Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. *J. Gen. Virol.* 72:1473-1477.
- ROCHOW, W.F. & DUFFUS, J.E., 1981. Luteoviruses and yellow diseases. In: *Handbook of Plant Virus Infection and Comparative Diagnosis*. E. Kurstack ed. Elsevier North Holland Biomedical Press. pp. 147-168.
- SALISBURY, F.B. & ROSS, C.W., 1992. *Plant Physiology* 4th ed. Wadsworth Publishing Company. Belmont, California, 681p.

- SCAGLIUSI, S.M.M.; LOCKHART, B.; GONÇALVES, M.C. & VEGA, J., 1997. Detection of brazilian sugarcane yellow leaf luteovirus by DAS-ELISA using polyclonal antibodies. *Fitopatol. bras. (supl.)* 22:341-342 (resumos).
- SEATON, G.G.R.; LEE, K. & ROHOZINSKI, J., 1995. Photosynthetic shutdown in *Chlorella* NC64A associated with the infection cycle of paramecium bursaria *Chlorella* virus-1. *Plant Physiol.* 108:1431-1438.
- SHENCK, S. & HU, J.S., 1991. Update on the cause of sugarcane yellowleaf syndrome. In: *Proc. Hawaiian Sugar Technol.* 45-46pp.
- SHEPARDSON, S.; ESAU, K. & MCCRUM, R., 1980. Ultrastructure of potato leaf phloem infected with potato leafroll virus. *Virology* 105:379-392.
- SHEPHERD, R.J., FRANCKI, R.I.B., HIRTH, L., HOLLINGS, M., INOUE, T., MACLEOD, L., PURCIFULL, D.E., SINHA, R.C., TREMAINE, J.H., VALENTA, V. & WETTER, C., 1976. New groups of plant viruses approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* 6:181-184.
- SILVER, S.L.; RASOCHOVÁ, L.; DINESH-KUMAR, S.P. & MILLER, W.A., 1994. Replication of barley yellow dwarf virus satellite RNA transcripts in oats protoplasts. *Virology* 198:331-335.
- SOUZA-DIAS, J.A.C. & COSTA, A.S., 1983. Vacinação contra enrolamento poderá cortar a importação de batata-semente. *Revista Casa da Agricultura* 5:1-3.

- STRASSER, R.J.; SRIVASTAVA, A. & GOVINDJEE, 1995. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem. Photobiol.* 61:32-42.
- TINOCO-OJANGUREN, C. & PEARCY, R.W., 1995. A comparison of light quality and quantity effects on the growth and steady-state and dynamic photosynthetic characteristics of three tropical tree species. *Functional Ecol.* 9:222-230.
- TURGEON, R., 1989. The sink-source transition in leaves. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:119-138.
- TURGEON, R. & WIMMERS, L.E., 1988. Different patterns of vein loading of exogenous [^{14}C]sucrose in leaves of *Pisum sativum* and *Coleus blumei*. *Plant Physiol.* 87:179-182.
- van HANDEL, E., 1968. Direct microdetermination of sucrose. *Anal. Biochem.* 22:280-83.
- van KOOTEN, O. MEURS, C. & van LOON, L.C., 1990. Photosynthetic electron transport in tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol. Plant.* 80:446-452.
- van REGENMORTEL, M.H.V., 1982. Serology and Immunochemistry of Plant Viruses. Academic Press, New York, 302p.
- VEGA, J. , 1994. Amarelecimento das folhas de cana-de-açúcar: novas evidências da associação com um luteovírus. *Fitopatol. bras.* (19)322. (Resumos)
- VEGA, J. & SCAGLIUSI, S.M.M, 1994. Amarelecimento foliar da cana-de-açúcar: visualização *in situ* de partículas semelhantes à luteovirus em células do floema por microscopia eletrônica. *Fitopatol. bras.* 19:330 (resumos).

- VEGA, J., SCAGLIUSI, S.M.M. & ULIAN, E.C., 1997. Sugarcane Yellow Leaf Disease in Brazil: Evidence of association with a luteovirus. *Plant Dis.* 81:21-26.
- VEIDT, I.; BOUZOUBAA, S.E.; LEIZER, R.M.; ZIGLER-GRAFF, V.; GUILLEY, H.; RICHARDS, K. & JONARD, G., 1992. Synthesis of full-length transcripts of beet western yellow virus RNA: messenger properties and biological activity in protoplasts. *Virology* 186:192-200.
- WATERHOUSE, P.M.; GILDOW, F.E. & JOHNSTONE, G.R., 1988. Luteovirus group. In: *Descriptions of Plant Viruses* No. 330. Commonwealth Micological Institute and Association of Applied Biologists, Kew, England.
- WRIGHT, D.P.; BALDWIN, B.C.; SHEPHARD, M.C. & SHOLES, J.D., 1995. Source-sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew II. Changes in the regulation of the Calvin cycle. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 47:255-267.
- ZAITLIN, M. & HULL, R., 1987. Plant virus-host interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38:291-315.