

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**

**IMUNOCITOQUÍMICA E HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* NA MICROSCOPIA
ELETRÔNICA - METODOLOGIA COMPLEMENTAR NA CARACTERIZAÇÃO
DE VÍRUS E VIRÓIDES**

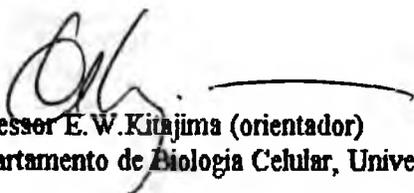
MARIA ISABEL LIMA

**Dissertação apresentada ao Departamento
de Fitopatologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de Brasília
como requisito parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Fitopatologia.**

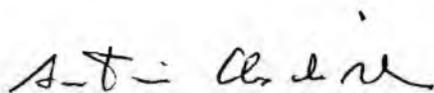
**Brasília
1994**

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob a orientação do professor Elliot Watanabe Kitajima, com apoio Institucional da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

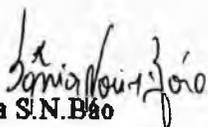
Aprovado por:



Professor E.W.Kitajima (orientador)
Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF.



Dr.A.C.de Ávila
Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças/EMBRAPA, Brasília, DF.



Professora S.N.Bão
Departamento de Genética e Morfologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Aos meus pais,

Graciano Aparecido Lima "In Memoriam" e

Lourdes Amélia Mazziero Lima.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em especial, ao professor Elliot Watanabe Kitajima pelo incentivo e orientação segura durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Ricardo Flores Pedauyé do Instituto de Agroquímica e Tecnologia de Alimentos de Valência-Espanha, pela concessão do material infectado com viróide e as sondas moleculares.

À Maria Esther Fonseca da EMBRAPA/CENARGEM, pela grande contribuição na produção das sondas e análises morfométricas.

À minha família, pelo amor e apoio sempre presentes sem os quais este sonho não seria possível.

Às amigas, Elen Cristina Gomes Monteiro, Valácia Lemes da Silva, Luciana Pozzer, Valéria de Oliveira Cruz, Márcia Kenner e Zulmira Lacava pelo carinho, companheirismo e lealdade em todos os momentos do nosso convívio.

Aos amigos do laboratório, Renato de Oliveira Resende, Cláudia Renata Fernandes Martins, Paulo Ernesto Meissner Fo., Sônia Nair Bão e Ana Cláudia Araújo pela grande amizade, atenção e encorajamento diários.

À Bergmann Morais Ribeiro, pela ajuda e carinho dedicados durante os últimos momentos deste trabalho.

Aos funcionários e estagiários do laboratório de microscopia eletrônica da UnB pela importante ajuda e convívio saudáveis.

Aos professores e colegas do Departamento de Fitopatologia da UnB, por todo apoio e ensinamentos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À todos aqueles que, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO.....	1
1. CITOPATOLOGIA.....	1
1.1. INCLUSÕES CITOPLASMÁTICAS.....	3
1.1.1. Agregados de partículas de vírus.....	3
1.1.2. Inclusões proteicas.....	5
1.1.3. Viroplasma.....	7
1.2. INCLUSÕES NUCLEARES.....	10
1.3. ALTERAÇÕES CELULARES E MATERIAIS DERIVADOS DA HOSPEDEIRA.....	14
2. IMUNOCITOQUÍMICA.....	17
3. HIBRIDIZAÇÃO <i>in situ</i>	21
4. APLICAÇÕES.....	22
5. OBJETIVOS.....	33
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
1. PREPARO DO MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	37
2. IMUNOCITOQUÍMICA.....	38
3. HIBRIDIZAÇÃO <i>in situ</i>	39
4. OBSERVAÇÃO AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE TRANSMISSÃO.....	40
5. ANTI-SOROS.....	40
5.1. Tospovirus.....	40
5.2. Potyvirus.....	41
5.3. Rhabdovirus.....	41
5.4. Ilarvirus.....	41
5.5. Tobravirus.....	42
5.6. Tymovirus.....	42
5.7. Potexvirus.....	42

6. SONDAS.....	42
6.1. Obtenção da sonda.....	42
6.2. Sondas utilizadas.....	43
III. RESULTADOS.....	44
1. IMUNOCITOQUÍMICA.....	44
1.1. Tospovirus.....	44
1.2. Potyvirus.....	46
1.2.1. "Tobacco etch virus"-TEV.....	46
1.2.2. Vírus do mosaico amarelo do feijoeiro ("bean yellow mosaic virus"-BYMV).....	47
1.3. Rhabdovirus.....	47
1.3.1. Vírus da mancha amarela da graviola ("soursoy yellow blotch virus"-SYBV).....	47
1.3.2. Rhabdovirus isolado do picão.....	48
1.4. Ilarvirus.....	49
1.4.1. Vírus da necrose branca do fumo ("brazilian tobacco streak virus"-BTSV).....	49
1.5. Tobravirus.....	50
1.5.1. Vírus do anel do pimentão ("pepper ringspot virus"-PepRSV).....	50
1.6. Potexvirus.....	51
1.6.1. Vírus do mosaico comum da mandioca ("cassava common mosaic virus"-CsCMV).....	51
1.7. Tymovirus.....	51
1.7.1. Vírus do mosaico da berinjela, isolado fumo ("aggplant mosaic virus"-EMV-T).....	51
1.7.2. Vírus do mosaico amarelo do maracujá ("Passionfruit yellow mosaic virus"-	

PYMV).....	52
2. HIBRIDIZAÇÃO <i>in situ</i>	53
2.1. "Avocado sunblotch viroid"-ASBVd.....	53
3. FIGURAS.....	56
IV. DISCUSSÃO.....	71
1. IMUNOCITOQUÍMICA.....	71
1.1. Tospovirus.....	71
1.2. Potyvirus.....	72
1.3. Rhabdovirus.....	73
1.4. Ilarvirus.....	74
1.5. Tobravirus.....	75
1.6. Potexvirus.....	75
1.7. Tymovirus.....	76
1.8. Comentários gerais.....	77
2. HIBRIDIZAÇÃO <i>in situ</i>	78
V. RESUMO.....	81
VI. ABSTRACT.....	83
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1:	Lista de abreviaturas padronizadas propostas para os vírus de plantas citados.....	34
Tabela 2:	Lista de abreviaturas padronizadas propostas para os viróides de plantas citados.....	36
Tabela 3:	Estimativa morfométrica das áreas ocupadas por diferentes organelas celulares em tecido de células sadias e infectadas com o ASBVd.....	54
Tabela 4:	Resultados da imunomarcacão com ouro coloidal após a hibridizacão <i>in situ</i> utilizando-se uma sonda de DNAc diretamente contra a fita positiva do ASBVd em tecidos de folhas sadias e infectadas com o ASBVd.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras 1-24:	Detecção por imunocitoquímica de antígenos virais <i>in situ</i> em tecido foliar de plantas infectadas por diferentes vírus.....	57
Figuras 25-28:	Detecção por hibridizacão <i>in situ</i> de ácidos nucleicos em tecido foliar de abacateiro infectado pelo ASBVd.....	69

I. INTRODUÇÃO

1. CITOPATOLOGIA

O estudo dos vírus de plantas através da microscopia eletrônica permitiu desde 1939 a observação de partículas virais tanto alongadas quanto isométricas, já previstas por suas propriedades ópticas manifestadas pelas suspensões de vírus purificados (Borges, 1976). Contudo, com a aplicação de técnicas de ultramicrotomia de tecidos infectados, a partir de 1942 (Pease & Baker, 1948), iniciou-se então a observação do patógeno em suas hospedeiras. Em 1950, Black e colaboradores, realizaram o primeiro trabalho no qual a técnica foi aplicada na tentativa de visualizar partículas do vírus do mosaico do fumo ("Tobacco mosaic virus"-TMV)* nas células de suas hospedeiras.

Por outro lado, a virologia foi, provavelmente, um dos campos da ciência que mais beneficiou a introdução do microscópio eletrônico como ferramenta de pesquisa. Assim, o exame ao microscópio eletrônico de transmissão de secções ultra-finas de tecidos infectados por vírus além de demonstrar diversos aspectos da biologia dos vírus, frequentemente oferecem pistas para a diagnose das doenças causadas por estes vírus, pois certas combinações vírus-hospedeira produzem efeitos citopáticos típicos (Matsui & Yamagushi, 1966; Borges, 1976; Kitajima, 1977; Martelli & Russo, 1977).

* Todos os vírus e viróides quando mencionados pela primeira vez no texto serão citados em português, quando o nome dos mesmos for traduzível, com seus respectivos nomes e siglas em inglês entre

parênteses. Caso contrário, serão citados inicialmente apenas em , inglês. Para ambos os casos, eles serão posteriormente referidos apenas pelas suas siglas. Os vírus e viróides mencionados e suas siglas estão listados nas tabelas 1 e 2, respectivamente, apresentadas ao final da introdução.

O exame de células de plantas infectadas por vírus tem permitido a observação de partículas no citoplasma, núcleo, vacúolo, cloroplastos; associadas à mitocôndrias, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e plasmodesma. Além de partículas virais também podem ser observadas estruturas induzidas pela infecção viral, contendo ou não partículas de vírus referidas como corpúsculos de inclusão. Estes podem ser cristalinos ou amorfos (ou ambos) numa mesma célula, e podem variar de tamanho. Surgem elas como consequência de um distúrbio do metabolismo celular que acompanha a infecção viral, mas não são necessariamente um produto deste processo. Em alguns casos, estas inclusões são um acúmulo mais ou menos inerte de partículas de vírus ou excesso de material viral, mas há evidências de que, em muitos casos, os corpúsculos de inclusão desempenham uma função primária na síntese e/ou montagem dos componentes virais (Martelli & Russo, 1977). A seguir será feita uma revisão resumida das alterações citopatológicas mais características, associadas à infecções por vírus de plantas.

1.1. INCLUSÕES CITOPLASMÁTICAS

No citoplasma podem surgir vários tipos de inclusão, dependendo da combinação vírus-célula hospedeira, representados por meio de partículas virais, proteínas não estruturais e alterações celulares, ou uma mescla de todos eles (Borges, 1976; Martelli & Russo, 1977; Matthews, 1991).

1.1.1. Agregados de partículas de vírus

As inclusões formadas por agregados de partículas de vírus podem ter o aspecto de massas fibrosas compostas por feixes de partículas filamentosas, o que tem sido observado em muitas hospedeiras infectadas por componentes de diferentes grupos de vírus alongados como os potexvirus, carlavirus, potyvirus, closterovirus, etc.

Ao microscópio eletrônico de transmissão estas massas fibrosas parecem ser inteiramente compostas por partículas de vírus alinhadas paralelamente, cuja extensão pode coincidir com o comprimento da partícula de vírus. Outro aspecto está relacionado com a formação de arranjos paracristalinos nos quais as partículas de vírus estão dispostas lado a lado num arranjo hexagonal. Uma variante deste tipo de inclusão é observado em células infectadas pelo estirpe Aucuba do TMV, onde sucessivas camadas de partículas de vírus estão orientadas em um ângulo de 60° (Warmke & Edwardson, 1966; Warmke, 1968; Francki et al., 1985).

Outro tipo de inclusão bastante frequente são as cristalinas formadas por arranjos ordenados de partículas virais

que podem ser induzidas tanto por vírus isométricos quanto em forma de bastonetes. Como exemplo, temos membros do grupo tobamovirus que produzem inclusões com aspecto de placas hialinas de formato hexagonal ou arredondado. Estas formas hexagonais são tipicamente observadas em infecções desenvolvidas pelo estirpe comum do TMV, enquanto a formação de placas arredondadas se dá por outros estirpes deste mesmo vírus. Nos cristais as partículas de vírus estão orientadas perpendicularmente às faces hexagonais e paralelamente às faces laterais (Willison, 1976), enquanto que as placas arredondadas são compostas por camadas de vírus bastonetiformes em arranjos paralelos, contudo as pilhas de partículas não são todas do mesmo tamanho como para o TMV (Hatta & Ushiyama, 1973).

Quanto aos vírus isométricos, desde 1956, quando relatou-se a cristalização do "tomato bushy stunt virus-TBSV", a observação ultraestrutural tem revelado a grande tendência destes vírus à cristalização. Esta tendência tem sido descrita entre os bromovirus, comovirus, cucumovirus, ilarvirus, luteovirus, nepovirus, tombusvirus, tymovirus e ainda para os sobemovirus, necrovirus e satélite, vírus do enrolamento da folha da batata ("potato leaf roll virus"-PLRV), "sowbane mosaic virus-SoMV", "pea enation mosaic virus-PEMV", e também para alguns vírus do grupo reovirus (Martelli & Russo, 1977). Estes cristais podem ser observados no núcleo, citoplasma e vacúolo de células infectadas e apresentam tamanho e forma bastante variáveis.

1.1.2. Inclusões proteicas

As inclusões proteicas representam outro tipo de inclusão observada durante a infecção viral e dentre elas encontram-se as denominadas corpúsculos granulares amorfos. Estes tem sido encontrados nos primeiros estágios das infecções causadas por "clover yellow mosaic virus-CIYMV", um potexvirus, no citoplasma e vacúolo central de células de feijão fava (*Vicia fava* L), aparecendo como corpúsculos eletrón-densos arredondados preenchidos por material amorfo. Observa-se que seu tamanho decresce concomitantemente com o aumento do número de partículas de vírus, sugerindo que estas inclusões representam um "pool" do excesso de proteínas virais sendo lentamente incorporadas nos virions completos (Schlegel & DeLisle, 1971).

As inclusões cilíndricas, outro tipo de inclusão proteica, são estruturas lamelares bastante complexas tridimensionalmente, induzidas por todos os membros do grupo potyvirus. A expressão inclusão cilíndrica foi primeiro proposta por Edwardson em 1966 e só mais tarde foram melhor definidas (Edwardson et al., 1968). Através de secções seriadas, reconstruíram-se os corpúsculos de inclusão associados à infecções causadas pelo "tobacco etch virus-TEV" e o vírus do mosaico da melancia-2 ("watermelon mosaic virus-WMV2") que possibilitaram então a observação de uma configuração basicamente cilíndrica. Em secções transversais, a característica mais notável destas inclusões é a presença de um túbulo central do qual se irradiam "braços" curvos que oferecem a estas o aspecto de catavento.

Além dos chamados cataventos ("pinwheels") estas inclusões podem aparecer com formas semelhantes a pergaminhos ("scrolls") ou como placas lamelares. Contudo, nem todos os membros do grupo potyvirus apresentam a formação de todos os três tipos de inclusão ao mesmo tempo. Baseado nesta observação Edwardson (1974) propôs a classificação dos potyvirus em três grupos de acordo com o tipo de estrutura associada à porção central das inclusões do tipo catavento. Diante desta divisão definiu-se então: (a) pergaminhos ou tubos - subdivisão I, com 21 membros; (b) placas lamelares - subdivisão II, com 18 membros; (c) pergaminhos e placas lamelares em conjunto - subdivisão III, com 25 membros. Mais tarde, Edwardson et al. (1984) veio propor a subdivisão do tipo IV que consiste em cataventos, "scrolls" e pequenos agregados lamelares curvos, induzidos por 17 membros dos potyvirus.

No entanto, posteriores observações ao microscópio eletrônico vem acumulando evidências que indicam que as inclusões podem variar no curso da infecção. Estas variações se referem ao número, tamanho e a relativa preponderância do tipo de inclusão (Martelli & Russo, 1977).

Com relação à natureza destas inclusões acha-se esclarecido que são constituídas por uma proteína com peso molecular variando entre 67 e 70K, o que representa praticamente o dobro do peso molecular da subunidade do capsídio do vírus estimado em torno de 33K (Hiebert & McDonald, 1973). Além disso, estudos da tradução *in vitro* têm demonstrado que esta proteína é codificada pelo vírus (Dougherty & Hiebert, 1980).

Dentre as diversas inclusões proteicas, as inclusões lamelares formadas por feixes de camadas múltiplas de material proteico têm sido encontradas consistentemente associadas à infecções causadas pelo vírus X da batata ("potato virus X-PVX"). Juntamente com partículas de vírus agregadas estas estruturas constituem grandes corpúsculos de inclusão com aparência mais ou menos granular. Shalla e Shepard (1972) foram os primeiros a interpretar corretamente sua conformação e elucidar sua constituição química. Além disso, sugeriram haver uma analogia entre estas inclusões e as do tipo catavento dos potyvirus. Contudo, estas inclusões certamente diferem das inclusões cilíndricas, pois estas não constituem uma característica para todo o grupo potexvirus.

1.1.3. Viroplasma

Os viroplasmas são agregados citoplasmáticos de textura fina e usualmente formado de material eletrôn-denso, no qual produtos do vírus são formados e/ou ocorre a montagem das partículas. As "clássicas" matrizes viroplásmicas estão consistentemente associadas à infecções desenvolvidas por todos os membros do grupo reovirus e caulimovirus, mas também têm sido eventualmente encontrados associados a membros de outros grupos.

Entre os reovirus estas massas viroplásmicas, quando ricas em partículas de vírus imaturas, incorporam grandes quantidades de uridina tritiada após 3 horas de incubação e são capazes desta incorporação até mesmo quando submetidos a intervalos bastante curtos (20 minutos). Este tipo de experimento fornece evidências da replicação do RNA viral no viroplasma aonde

partículas completas do vírus são formadas (Bassi & Favali, 1972; Bassi et al., 1974). Dentro de 48 horas partículas de vírus maduras saem da matriz do viroplasma para imediações do citoplasma (Bassi et al., 1974), aonde permanecem distribuídas ao acaso, agregadas em cristais, ou ainda no interior de uma estrutura tubular.

Quando tratamos de infecções causadas por membros do grupo caulimovirus este tipo de inclusão citoplasmática é altamente característica e está presente entre todos os membros reconhecidos do grupo. Ao microscópio eletrônico os viroplasmas aparecem como estruturas elipsóides formadas por uma fina matriz granular eletron-densa com áreas eletron-lucentes; virions aparecem tanto nas áreas densas como nas áreas claras (Martelli & Russo, 1977). Estes viroplasmas não se acham envolvidos por membrana, mas geralmente são observadas grandes quantidades de ribossomos ao seu redor; vários complexos de Golgi, associados à microvesículas aparecem nas proximidades dessas inclusões. O envolvimento dos ribossomos e dos dictiossomos no processo de gênese destas inclusões tem sido sugerido (Kitajima et al., 1969; Brunt & Kitajima, 1973; Lawson & Hearon, 1973).

Os caulimovirus tem como genoma DNA de dupla fita (Shepherd et al., 1968) assim como o recém descrito badnavirus (Lockhart, 1990). Desde 1983 surgiram muitas evidências confirmando o modelo da transcrição reversa, envolvendo um RNA intermediário, além da caracterização parcial da enzima transcriptase reversa (TR) (Guilley et al., 1983; Hull & Covey, 1983; Pfeiffer & Hohn, 1983). Atualmente está clara a existência

de duas fases no ciclo de replicação do ácido nucleico, dentre as quais a primeira da transcrição do vDNA em vRNA, e a segunda, no viroplasma, onde ocorre a retranscrição do vRNA em vDNA sob ação de uma transcriptase reversa codificada pelo vírus (Mazzolini et al., 1985).

Entre os rhabdovirus de plantas algumas inclusões têm sido denominadas como viroplasmas, porém nem sempre muito claras. Inclusões citoplasmáticas induzidas pelo "barley yellow striate mosaic virus"-BYSMV são as mais convincentes como possíveis viroplasmas. Esta é a única estrutura entre os rhabdovirus de plantas formada pelo acúmulo de material eletrôn-denso com textura granular ou levemente fibrosa. As partículas de vírus são sempre encontradas em abundância na sua periferia, onde elas amadurecem pela aquisição do envelope externo membranoso que deriva do retículo endoplasmático ou da lamela externa do envelope nuclear (Conti & Appiano, 1973). Similar situação foi observada com o vírus da mancha amarela da graviola ("soursoy yellow blotch virus"-SYBV) (Kitajima et al, 1993).

As estruturas citopatológicas que são certamente as mais complexas no que diz respeito aos vírus e suas inclusões citoplasmáticas são aquelas que formam agregados de produtos virais e componentes da hospedeira. Estas inclusões geralmente são compactas e, por isso, facilmente identificadas por microscopia de luz encontrando-se frequentemente próximas ao núcleo. Alguns membros dos tobamovirus induzem à formação destas inclusões citoplasmáticas amorfas, as quais são denominadas corpo-X. Estas inclusões, induzidas pelo estirpe comum do TMV, despertaram muito interesse desde a sua descoberta por Iwanowski

(1903, apud Martelli & Russo, 1977).

Detalhes da estrutura do corpo-X foram sendo desvendados e avaliadas com o decorrer do tempo por meio de técnicas de microscopia eletrônica. Estas regiões contém vesículas membranosas, ribossomos, túbulos-X e algumas vezes partículas de vírus (Esau & Cronshau, 1967). Os túbulos-X são estruturas que apresentam o mesmo diâmetro externo observado nos microtúbulos normais (25 a 30nm). Nos primeiros estádios da infecção eles geralmente ocorrem em trios ou pares, mas em estádios mais avançados os túbulos-X ou túbulos de aspecto similar também podem ser encontrados em longos arranjos paralelos. A natureza e função destes túbulos-X ainda é obscura (Francki et al., 1985).

1.2. INCLUSÕES NUCLEARES

As inclusões nucleares induzidas por vírus foram inicialmente uma raridade já que as investigações se davam apenas a nível de microscopia de luz. Contudo, através da microscopia eletrônica têm sido observadas com maior frequência, embora menos comuns que as citoplasmáticas.

Baseado na sua localização e origem as inclusões nucleares têm sido separadas em três grupos; as relacionadas com o nucléolo, as nucleoplásmicas e as perinucleares.

As inclusões relacionadas com nucléolo podem representar um acúmulo de material, sintetizado a nível de nucléolo, as quais permanecem *in situ* aparecendo como estruturas

morfologicamente distintas da organela em si e podem assumir uma organização amorfa ou cristalina; ou tais inclusões podem ser uma entidade complexa originada da modificação de toda a organela.

As inclusões do nucléolo mais peculiares são as denominadas corpúsculos satélites induzidas pelo "beet mosaic virus"-BtMV. As primeiras observações deste tipo de inclusão foram aparentemente descritas por Reitberger (1956, apud Martelli & Russo, 1977), por meio da microscopia de luz, onde foram observados desvios anatômicos do nucléolo em células de beterraba infectadas pelo BtMV. Estes corpúsculos, localizados na periferia do nucléolo, constituídos de material proteico altamente eletrôn-opaco foram observados como massas densas amorfas com uma fina textura granular. Seu tamanho e aparência não eram uniformes, podendo aumentar e apresentar cavidades eletrôn-claras alinhadas com partículas semelhantes a ribossomos, a medida que a infecção progredia (Martelli & Russo, 1977).

O segundo tipo de inclusão do nucléolo é formada por cristais, induzida em algumas hospedeiras pelo vírus do mosaico amarelo do feijoeiro ("bean yellow mosaic virus-BYMV") e outros vírus relacionados. A estrutura destes cristais demonstra estriações com um padrão de repetição em torno de 7nm. Testes de digestão enzimática demonstraram que estes cristais são inteiramente formados por material sensível à pepsina e tripsina, com nenhuma evidência da presença de ácido nucleico (Weintraub & Ragetti, 1968).

As inclusões observadas no nucleoplasma são um outro tipo de inclusão que representam um arranjo de estruturas que

diferem no tamanho, aparência e constituição; porém todas ocorrendo no carioplasma de células infectadas.

Diversos são os tipos de inclusão observadas no interior do núcleo, as quais estão distribuídas entre diferentes membros dos grupos de vírus. A natureza de algumas destas inclusões é conhecida, mas sua função em muitos casos é obscura. Em células infectadas pelo "beet curly top virus"-BCTV elas podem apresentar um formato esférico e aparência granular (Esau & Hoefert, 1973), e células de algodão infectadas com o "cotton leaf crumple virus"-CLCrV inclusões arredondadas amorfas e textura granular menos eletrondensas do que o nucléolo foram observadas (Tsao, 1963).

Inclusões do tipo fibrosa também podem estar presentes no núcleo, predominantemente em células infectadas por vírus filamentosos e compostas por agregados de partículas virais para a qual podemos citar o "rice hoja blanca virus"-RHBV (Kitajima & Galves, 1973), ou proteináceas, como no caso do vírus do mosaico amarelo do salsaão ("celery mosaic virus"-CeMV) (Kitajima & Costa, 1978; Oliveira & Kitajima, 1981; Oliveira et al., 1981 a,b) .

Inclusões membranosas são também muito comuns em células infectadas pelo vírus do mosaico do caupi ("cowpea mosaic comovirus"-CPMV) onde se observa a formação de corpúsculos vesiculares membranosos bastante compactos (Langenberg & Schroeder, 1975).

Além de todos estes tipos de inclusões citadas, há a formação de cristais proteicos tipicamente induzidos pelo "tobacco etch potyvirus"-TEV (Matsui & Yamagushi, 1964), ou aqueles formados por partículas de alguns membros do grupo

tymovirus como o "turnip yellow mosaic virus"-TYMV (Hatta, 1976) as quais são caracteristicamente observadas.

Algumas inclusões estão localizadas no espaço perinuclear, surgindo do acúmulo de material entre as duas membranas que constituem o envelope nuclear, e como consequência, uma dilatação da cavidade perinuclear. Esta localização peculiar é justificada pelo fato de que estes materiais estariam em processo de transferência para o citoplasma ou vice-versa. Desse modo, as inclusões perinucleares são frequentemente transitórias, podendo aparecer somente em certos estádios da infecção. Estas inclusões podem ser compostas por partículas de vírus, produtos virais, ou constituintes celulares. O primeiro, é o caso de muitos rhabdovirus de plantas, que por exemplo, amadurecem no envelope nuclear e são liberados do espaço perinuclear (Francki, 1973). Inclusões compostas por elementos vesiculares têm sido descritas para alguns vírus. A localização perinuclear destas vesículas, contendo uma fina rede fibrilar no seu interior, provavelmente o ácido nucleico viral, foi observada em infecções causadas pelo "beet western yellow virus"-BWYV (Esau & Hoefert, 1972a,b) e "cowpea chlorotic mottle virus"-CCMV (Kim, 1977), por exemplo.

A formação de corpúsculos cristalinos no espaço perinuclear também foi notado em pelo menos um caso no qual células infectadas pelo PEMV apresentaram cristais de origem nuclear, mas de natureza e significado desconhecidos, detectados entre as lamelas do envelope nuclear (de Zoeten et al., 1972).

1.3. ALTERAÇÕES CELULARES E MATERIAIS DERIVADOS DA HOSPEDEIRA

Sucedendo a infecção viral, vários tipos de distúrbios citológicos são observados. Diferentes organelas podem se modificar e, no final, estarem profundamente alteradas perdendo sua identidade, originando novas estruturas com o aparecimento de corpúsculos de inclusão. Um exemplo frequentemente ilustrado na literatura está relacionado com a interação que ocorre entre as mitocôndrias e as partículas de algumas estirpes do "tobacco rattle virus"-TRV, dentre eles o isolado brasileiro (Harrison & Roberts, 1968; Kitajima & Costa, 1969), hoje considerado um outro membro do grupo, chamado vírus do anel do pimentão ("pepper ringspot virus"-PepRSV).

Estes corpúsculos de inclusão do TRV são bem definidos, de preferência compactos e, juntamente com ribossomos e outros constituintes do citoplasma, podem conter pequenos pacotes de partículas de vírus. Como ilustrado por Harrison e colaboradores (1970) as inclusões desenvolvem-se a partir de pequenos agregados de mitocôndrias relativamente inalteradas à bastante crescidas, a medida que a infecção progride, além da adição de novas mitocôndrias, podendo atingir em média 17 μ m.

Uma característica notável destas inclusões, quando inteiramente desenvolvidas, é a ausência aparente da proteína da capa do vírus, um elevado conteúdo de RNA e a presença de uma produção elevada e incomum, no interior das mitocôndrias, de pequenas vesículas contendo grande quantidade de um material fibrilar semelhante a ácido nucleico (Harrison et al, 1970).

Inclusões envolvendo cloroplastos alterados são frequentes em infecções causadas pelo TYMV e são características para outros membros pertencentes ao grupo tymovirus (Lesemann, 1977).

Estas inclusões consistem no desenvolvimento de pequenas vesículas periféricas formadas a partir da invaginação de ambas as membranas do cloroplasto. Um material fibrilar reminiscente do ácido nucleico tem sido observado no interior destas vesículas (Ushiyama & Matthews, 1970), e evidências bioquímicas e autorradiográficas indicam que estas vesículas são o sítio de replicação do RNA viral do membro representante do grupo - TYMV (Lafleche et al, 1972).

Diversos são os registros que demonstram modificações na interface plasmalema-parede celular relacionadas com a infecção viral. Anormalidades originadas da proliferação da membrana ou da síntese de material depositado na parede celular levam à formação de estruturas multivesiculares que são denominadas de corpos paramurais e parede celular aumentada, respectivamente. Estes corpos paramurais consistem em um extenso acúmulo de vesículas e membranas enoveladas, adjacentes à parede celular que ficam separadas do citoplasma pela plasmalema que rodeia estas vesículas (Robards & Kidwaii, 1969). As modificações observadas na parede celular podem aparecer de duas formas distintas, ou seja, com uma extensa deposição de calose ao longo da parede pré-existente e a formação de projeções semelhantes a dedos. Uma hipótese para este evento seria de que nos primeiros estádios da infecção projeções da parede celular e estruturas relacionadas (corpo paramural) podem estar comprometidos

ativamente na absorção e secreção, bem como facilitando o movimento de célula-célula de materiais originados a partir da infecção viral, incluindo partículas de vírus (Kim & Fulton, 1973; Martelli & Russo, 1977).

2. IMUNOCITOQUÍMICA

Apesar de todas as informações existentes na literatura, no que diz respeito aos efeitos citopáticos induzidos em tecidos infectados por plantas, muitas são as dificuldades em se identificar de maneira inequívoca os vírions ou a natureza de certas inclusões. Contudo, a aplicação das técnicas de imunocitoquímica a nível ultraestrutural pode solucionar alguns destes problemas.

A introdução da técnica de citoquímica, por Coons & Kaplan (1950, apud Romano & Ron, 1984), em células e tecidos se deu a nível de microscopia de luz por meio do uso de anticorpos fluorescentes com a finalidade de identificar sítios onde se dava a reação antígeno-anticorpo. Mais tarde, Singer & Schick (1961, apud Romano & Ron 1984) introduziram a ferritina que contém uma molécula central de ferro usado como marcador eletrôn-denso o qual tinha a capacidade de conjugar com outras proteínas tais como os anticorpos o que abriu um novo campo - a imunomarcacão em microscopia eletrônica - que permitiu um avanço significativo no estudo da estrutura molecular de células e tecidos. Uma desvantagem da técnica de imunoferritina está relacionada com a ligação da ferritina ao anticorpo e alguns problemas surgem a partir deste ponto: (a) perda da atividade do anticorpo; (b) heterogeneidade dos produtos, onde a atividade da ferritina conjugada ao anticorpo seria isolada e; (c) ineficiêcia no procedimento de acoplamento (de Souza, 1993).

Graham & Karnovsky (1966, apud Romano & Ron, 1984) introduziram na ME a reação histoquímica que lança mão da

peroxidase do rabanete silvestre (HRP) para localizar o antígeno através da conjugação do anticorpo com esta enzima, geralmente revelada pela diaminobenzidina (DAB). Uma das vantagens da HRP sobre a ferritina é o seu pequeno peso molecular de 40 KD, o que representa um terço da ferritina, diminuindo os problemas na penetração do conjugado. Os métodos de conjugação da peroxidase aos anticorpos são similares àqueles utilizados para a ferritina. Assim como para outros métodos de marcação, a sensibilidade do procedimento de imunoperoxidase depende das condições de fixação e processamento dos tecidos (Goodman et al., 1981).

Atualmente a utilização do ouro coloidal como traçador está amplamente distribuído, devido ao grande número de vantagens que este método oferece. Os grãos de ouro são particulados e muito distintos, o que permite uma localização fina dos sítios marcados. Uma grande vantagem é que devido à sua alta densidade eletrônica as partículas são facilmente detectadas ao ME quando comparados com a opacidade do ferro (Romano & Ron, 1984).

Devido a natureza globular das partículas, a quantificação do grão de marcação pode ser feita por contagem direta do número de partículas em uma dada área. O ouro coloidal pode ser facilmente preparado e ligar-se à macromoléculas como: imunoglobulinas, proteína A, lectinas, o que embora pouco entendido, depende de uma simples adsorção em condições corretas de pH, concentração dos reagentes e força iônica; e nenhum procedimento de conjugação química está envolvido. Desse modo, o método é fácil, rápido e barato, pois requer pequenas quantidades da macromolécula específica. Uma outra vantagem é a baixa

adsorção inespecífica da partícula de ouro (Goodman et al., 1981; Park, 1989).

Como o ouro coloidal pode ser produzido em tamanhos variados, de 5nm até 150nm, podem ser feitas marcações múltiplas pela adsorção a diferentes anticorpos ou macromoléculas. A marcação com partículas pequenas de ouro, 5-20nm, tem a vantagem de serem menos suscetíveis a obstáculos espaciais devido ao pequeno tamanho da partícula. Uma desvantagem desta metodologia de imunomarcação é a baixa estabilidade da marcação caso o colóide não tenha sido adequadamente recoberto com as macromoléculas e assim tornar-se desprotegido da agregação por eletrólitos (Goodman et al., 1981; Park, 1989).

A preparação do ouro como marcador está baseado, como referido acima, na adsorção de macromoléculas na superfície das partículas de ouro. Através de uma adsorção adequada a atividade biológica completa da macromolécula é preservada. Como resultado da adsorção de macromoléculas às partículas de ouro, mudanças hidrofóbicas negativas, no ouro coloidal, são estabelecidas e assim protegidas contra a subsequente agregação por eletrólitos, tornando-se um colóide liofílico (Goodman et al., 1981; Park, 1989).

Durante esta década a técnica da proteína A conjugada ao ouro tornou-se muito popular e hoje é amplamente utilizada na localização de antígenos de superfície e intracelular. Por esta razão uma atenção especial tem sido dada a esta metodologia.

Este método está baseado na habilidade da proteína A, extraída a partir da bactéria *Staphylococcus aureus*, de se ligar à porção Fc de moléculas de IgG de muitas espécies animais. Isto

é bastante conveniente em casos nos quais a ligação é muito forte como para a maioria das subclasses de IgGs de humanos, cobaia, coelhos, suínos e cães. No que diz respeito as IgGs de vaca, camundongo e cavalo, a ligação da proteína A é menos forte e, considerada fraca com IgGs de carneiro, cabra, rato e galinha (Romano & Ron, 1984).

A força de ligação da proteína A à IgG de humanos e coelho é muito alta, a qual é similar à afinidade de ligação observada entre antígeno e ancorpo. A cinética de ligação é muito rápida atingindo seu equilíbrio em menos de 30 minutos sob temperatura de 4-37C, com a maioria dos complexos proteína A-IgG, sendo formados nos primeiros minutos (Romano & Ron, 1984).

Vários fatores interferem no resultado final de uma imunocitoquímica. Dois destes fatores são os mais importantes. O primeiro refere-se à qualidade do anticorpo utilizado. É preciso estar seguro de que ele é realmente específico contra o antígeno que se deseja estudar. O segundo refere-se aos cuidados que se deve ter no sentido de que se preserve o antígeno durante o processamento do espécimen biológico para posterior observação. Muitos sítios antigênicos são extremamente sensíveis aos fixadores tradicionais, exigindo cuidados especiais (de Souza, 1993).

3. HIBRIDIZAÇÃO *in situ*

Assim como a imunocitoquímica revolucionou a ME nas décadas de 70 e 80, a hibridização *in situ* dá início a um novo horizonte dentro da ME. Os anticorpos são para a citoquímica uma sonda extremamente sensível na localização de proteínas na célula. A tecnologia do DNA recombinante oferece atualmente à citoquímica um meio de localizar genes e transcritos que codificam para estas proteínas.

A hibridização *in situ* está baseada no fenômeno do pareamento de bases de Watson/Crick entre dois ácidos nucleicos complementares. Um polinucleotídeo marcado com uma sequência de bases conhecida (a sonda) é hibridizada a um polinucleotídeo no tecido (o alvo). Os sítios nos quais a sonda hibridiza com o alvo são visualizados usando um sistema para detectar a marcação na sonda. Desse modo, a citoquímica é capaz de determinar aonde uma sequência de DNA ou RNA em particular está localizada.

Atualmente as sondas de ácido nucleico podem ser marcadas através da ligação de um hapteno como a vitamina biotina ou a digoxigenina, um esteróide de plantas (Ausubel et al., 1988). Sucedendo a hibridização da sonda com alvo, a marcação é visualizada por imunodeteção usando um anticorpo contra o hapteno que pode ser revelado através do conjugado proteína A-ouro coloidal (Mcfadden, 1991).

4. APLICAÇÕES

A aplicação de técnicas como a imunocitoquímica vem sendo amplamente utilizada na localização de antígenos virais, sejam eles estruturais ou não. Em diversos casos esta metodologia tem permitido a localização e a confirmação inequívoca da presença destes antígenos nas células infectadas.

A imunolocalização de proteínas a partir de anti-soros específicos vem sendo amplamente descritos na literatura e a aplicação da técnica já é uma rotina estabelecida como parte da caracterização de diferentes vírus.

Em diversos casos a utilização de anti-soros contra a proteína da capa do vírus tem permitido a detecção e a localização destes antígenos, sugerindo os prováveis sítios de replicação e montagem das partículas virais. Existem exemplos de membros de diversos grupos onde esta prática foi possível como para o "indian cassava mosaic virus"-ICMV para o qual observou-se que a marcação estava confinada ao núcleo (Roberts, 1989), enquanto que para o vírus do mosaico do bromo ("brome mosaic virus"-BMV) a marcação se dava a nível citoplasmático (Hosokawa et al., 1992).

Além destes, o TYMV (Garnier et al., 1986), o vírus do mosaico do pepino ("cucumber mosaic virus"-CMV) (Hosokawa & Watanabe, 1988b), o TEV (Baunoch et al., 1991), RSV (Suzuki et al., 1992), o TMV (Hills et al., 1987; Hosokawa et al., 1993), o BMV (Hosokawa et al., 1992) e o RHBV (Espinoza et al., 1992) são outros exemplos onde a técnica tem se mostrado altamente eficiente na detecção de proteínas estruturais.

Outro aspecto da imunomarcacão é a sua aplicao no sentido de se localizar proteínas não estruturais, e para isso basta que se possua anti-soros específicos, o que nem sempre   fácil.

Os tenuivirus consistem um novo e reconhecido grupo de vírus de plantas que induzem caracteristicamente grandes corpos de inclusão em células de plantas infectadas. A análise de secoes ultrafinas ao microscópio eletrônico de células infectadas pelo "maize stripe virus-MSpV" tem demonstrado dois tipos de inclusão: feixes longos e estreitos de filamentos eletron-opacos (FEO) e massas amorfas irregulares semi-eletron-opacas (ASO) (Ammar et al., 1985).

Quando células de plantas infectadas pelo RHBV, outro tenuivirus, foram tratadas com o anti-soro contra a maior proteína não estrutural (NCP) as partículas de ouro coloidal estavam claramente associadas aos corpos de inclusão do tipo ASO, demonstrando que estes são formados pela NCP (Espinoza et al., 1992). Estudos comparativos em microscopia de luz e microscopia eletrônica destes corpos de inclusão induzidos por MStV e RHBV tem sido realizados (Espinoza et al., 1993).

Resultados muito interessantes tem sido descritos onde a imunocitoquímica fornece dados que associam algumas proteínas não estruturais com o movimento das partículas virais célula-célula.

A associao da proteína 30K induzida pelo TMV com distribuico das partículas no tecido infectado se deu em parte devido a sua localizao observada através da imunomarcacão sobre os plasmodemas (Tomenius et al., 1987), enquanto que

experimentos com protoplastos demonstram sua marcação próxima ao núcleo e mais tarde no citoplasma (Meshi et al., 1992).

Para outros vírus, diversas proteínas não estruturais tem sido relacionadas com o transporte de partículas virais por meio da imunomarcação. É o caso do "alfalfa mosaic virus-AMV" cuja proteína P3 se mostra distribuída ao longo da lamela média da parede celular (Stussi-Garaud, et al., 1987). A imunomarcação por anticorpos monoclonais desta mesma proteína em células infectadas pelo CMV tem demonstrado sua localização no interior do nucléolo indicando que este seria o sítio de acúmulo desta proteína contudo, sua função permanece obscura (Mackenzie & Tremaine, 1988).

Experimentos similares tem fornecido evidências do envolvimento das proteínas 58K e 48K no movimento intercelular do CPMV em células infectadas. Infecções causadas pelo CPMV são acompanhadas pelo aparecimento de estruturas tubulares contendo partículas semelhantes a vírus as quais estendem-se ou penetram na parede celular. A imunomarcação com ouro coloidal destas proteínas demonstraram que elas estariam localizadas nestas estruturas tubulares o que mais tarde também foi observado em protoplastos infectados (van Lent et al., 1990b; 1991).

Nas infecções causadas pelo BMV a proteína 3a tem sido sugerida como a mais provavelmente associada ao movimento. A imunomarcação de células de cevada infectadas demonstraram que esta proteína estaria localizada em inclusões citoplasmáticas constituídas por uma alta concentração de partículas virais, material eletrôn-denso amorfo, material membranoso e vesículas, enquanto que áreas incluindo plasmodesmas nunca foram marcadas.

Sugere-se que esta proteína teria a função de sequestrar o RNA viral no processo de replicação e transportá-lo à célula adjacente (Hosokawa et al., 1992).

A imunodeteccção de outras proteínas não estruturais tem permitido inferir os sítios de replicação viral através do tratamento com anti-soros contra a replicase.

Experimentos realizados com células infectas com o TYMV contendo IgGs contra 115 e 45K demonstraram uma grande deposição de grãos de ouro na periferia do cloroplasto e citoplasma (Garnier et al., 1986).

A deteccção da replicase 126K do TMV sugere que o corpo-X seria o sítio da replicação viral ou que represente um local de acúmulo metabolicamente inerte desta proteína (Hills et al., 1987), contudo Saito e colaboradores no mesmo ano observaram uma intensa marcação sobre inclusões granulares no citoplasma quando um anti-soro contra 130K, dita como sendo a replicase, foi utilizado. Porém quando experimentos similares utilizando 126K recombinante de TMV-U1 foram realizados com outros tobamovirus que normalmente não desencadeiam a formação do corpo-X em suas hospedeiras a deposição de partículas de ouro se deu sobre feixes de partículas virais (Das & Hari, 1992).

Recentemente, Hosokawa e colaboradores (1993) trabalhando com protoplastos observaram o surgimento das proteínas 130 e 180K, componentes da replicase, em estádios progressivos da infecção por TMV. Nos primeiros estádios da infecção observou-se que 130K estava localizada em pequenas estruturas eletron-densas no citoplasma, marcação esta que tornou-se muito intensa em infecções tardias, onde estas regiões

evoluiram para inclusões granulares. Quando estas células foram tratadas com anti-180K a marcação foi observada nas mesmas regiões da 130K, porém apenas em infecções tardias.

Dentro do grupo potyvirus a imunomarcação com ouro coloidal tem sido muito utilizada e especial atenção tem sido dada ao estudo das inclusões formadas durante a infecção, constituídas por proteínas não estruturais. Alguns experimentos tem sido feitos na tentativa de explicar a função destas inclusões que sugerem, por exemplo, que elas estariam envolvidas no movimento viral ou que atuariam como reservatórios da proteína da capa numa forma que requer processamento.

Em 1986, durante estudos de imunocitoquímica dos primeiros eventos ocorridos nas infecções causadas pelo vírus do mosaico estriado do trigo ("wheat streak mosaic virus"-WSMV) em células de trigo, Langenberg sugeriu uma outra função para as inclusões cilíndricas. Estas alinhariam os virions com os plasmodesmas assistindo o transporte para células vizinhas. A marcação sobre as inclusões foi observada com o anti-soro contra o capsídeo do vírus e posterior purificação e produção de anti-soro de uma proteína de 66K (Brakke et al., 1987) também demonstrou-se uma marcação altamente específica sobre as inclusões cilíndricas sugerindo que ambas, a proteína da capa e 66K, seriam componentes da inclusão cilíndrica.

Em casos de infecções mistas tem se demonstrado que as IC apresentam determinantes antigênicos comuns, como foi descrito por Langenberg (1988) ao trabalhar com tecidos duplamente infectados por WSMV e "barley stripe mosaic virus-BSMV". Contudo, células de trigo infectadas pelo WSMV, "hordeum mosaic virus"-

HoMV e "agropyron mosaic virus"-AgMV, e células de milho infectadas por WSMV e "maize dwarf mosaic virus"-MDMV demonstraram, através da imunomarcação com anti-soros específicos para IC de cada um destes vírus, que estas infecções não originam IC híbridas e que as IC destes vírus não são sorologicamente relacionadas (Langenberg, 1991).

A expressão de proteínas não estruturais em infecções causadas pelo TEV tem sido acompanhada através da imunomarcação em estádios progressivos. Nestas infecções são observadas além das IC, inclusões nucleares (IN), características de infecções causadas por este vírus. Estas IN são formadas por duas proteínas sendo uma de 49K (INa) e outra de 58K (INb) (Baunoch et al., 1991).

Tanto as IC quanto as IN foram detectadas simultaneamente no mesmo dia da inoculação cujo acúmulo progrediu com o tempo. As IC sempre foram localizadas junto aos plasmodesma, mas não nestes, enquanto as IN foram observadas inicialmente em baixa concentração no citoplasma e em alta concentração no núcleo e nucléolo mas não na forma de inclusão. Em infecções mais velhas as IN foram detectadas exclusivamente no núcleo, contudo agora na forma de inclusões. Resultados similares foram obtidos em células infectadas pelo "plum pox virus"-PPV que apresentam basicamente os mesmos efeitos citopáticos observados com o TEV (Martín et al., 1992).

O desenvolvimento destas IC em protoplastos infectados pelo "tobacco vein mottling virus"-TMV demonstrou que desde as primeiras 10h após a inoculação as IC estiveram associadas à membrana plasmática, devido à deposição de partículas de ouro,

sugerindo que este seria o local de formação das IC (Murphy et al., 1991).

A detecção e distribuição intracelular de outras proteínas codificadas por vírus durante a infecção para as quais não se sabe a função também tem sido realizada, como é o caso da proteína 16K do TRV. Observou-se neste caso que a marcação se deu no núcleo e sugeriu-se então uma possível similaridade com os "zinc-finger" a qual poderia estar envolvida na modulação do metabolismo do ácido nucleico da hospedeira (Liu et al., 1991).

Infecções causadas pelos tospovirus são sempre acompanhadas pela formação de inclusões citoplasmáticas constituídas pela proteína não estrutural (NSs), hipoteticamente codificada pelo menor RNA genômico.

Para caracterizar o produto correspondente à proteína 52,4K deste RNA, um fragmento de DNAc contendo esta "open reading frame"-ORF foi expresso usando um baculovirus como vetor e a proteína resultante foi utilizada para produção do anticorpo específico. A detecção *in situ* desta proteína resultou na marcação específica de inclusões fibrosas comumente observadas no citoplasma, demonstrando que estas são formadas por NSs (Kormelink et al., 1991). Contudo, em alguns casos a comparação da citopatologia entre isolados do vira cabeça do tomateiro ("tomato spotted wilt virus"-TSWV) tem demonstrado diferenças na maneira como se manifestam no tecido infectado (Urban et al., 1991), o que tem sido confirmado pela imunomarcação (Kitajima et al., 1992).

Passagens repetidas de alguns vírus de RNA entre hospedeiras ou cultura de células frequentemente resultam no surgimento de partículas defectivas ou incompletas. Formas defectivas do TSWV foram recentemente descritas (Resende et al., 1991a).

Estudos em microscopia eletrônica mostraram que no citoplasma de células infectadas com linhagens sucessivas de lesões locais continham quantidades consideráveis de pequenos agregados densos simultaneamente com partículas de vírus intactas. Estes agregados densos quando imunomarcados reagiram apenas com anticorpos contra a proteína do nucleocapsídeo (Nc), nunca com anticorpos para a glicoproteína G1, demonstrando desse modo a ausência de membrana na partícula (Resende et al., 1991b).

Outro importante aspecto para o qual a imunocitoquímica tem colaborado está relacionado com o estudo das relações vírus-vetor.

Os potyvirus, um dos grupos de vírus de plantas mais expressivos, são transmitidos por afídeos de maneira não persistente. A transmissão destes vírus por afídeos depende da presença nas células infectadas de uma proteína codificada pelo vírus conhecida como componente auxiliar (HC). Experimentos de imunomarcacão com ouro coloidal mostraram que o tratamento de células infectadas com o vírus Y da batata ("potato virus Y"-PVY) tiveram suas inclusões em forma de haste especificamente marcadas pelos anticorpos contra HC. Isto sugere que estas inclusões poderiam ser "pools" ou reservatórios da proteína HC dos potyvirus (Baunoch et al., 1990).

A transmissão do TSWV é efetuada por algumas espécies

de thrips (ordem: Thysanoptera) e experimentos de imunomarcacão com células de insetos adultos e larvas infectados tem demonstrado que partículas de vírus podem entrar no lumen do intestino médio e serem excretadas ou entrar nas células epteliais do intestino médio de adultos de *Frankliniella occidentalis*.

Além das partículas observou-se a presença de massas eletron-densas e corpos multivesiculares o que sugere que TSWV ao entrar no intestino médio do adulto pode ser degradado e desse modo as células epteliais funcionariam como uma barreira para a aquisio, limitando a disseminao das partículas de vírus para a hemocel e orgãos aonde o vírus poderia replicar, o que não foi observado com as larvas do inseto testadas (Ulman et al., 1992).

Por outro lado, evidências diretas de imunocitoquímica tem demonstrado a ocorrência da replicao do TSWV durante o estágio larval do vetor. A imunomarcacão da proteína não estrutural NSs nas células epteliais do intestino médio indicam que esta é expressa nas células do inseto, infectado durante a fase larval, e estão associadas com arranjos fibrosos paracristalinos (Ulman et al., 1993; Wijkamp et al., 1993).

A transmissão do "barley yellow dwarf virus"-BYDV, um luteovirus, é efetuada por afídeos de maneira circulativa não propagativa. O estudo da transmissão por diferentes espécies de afídeos, vetores ou não, de diferentes isolados do BYDV através da imunocitoquímica demonstraram que o intestino posterior reconhece os luteovirus funcionando como um prrequisito para a aquisio do vírus, provavelmente por meio de receptores que regulariam a endocitose das partículas. No entanto, o

reconhecimento seria menos seletivo do que o ocorrido na glândula salivar acessória que limita a transmissão (Gildow, 1993).

Dentro do grupo tenuivirus a detecção de antígenos virais nas células do inseto vetor também foi demonstrada. O "rice stripe virus"-RSV é o membro tipo do grupo e os vírus deste grupo são transmitidos por Delfacídeos (cigarrinhas). A imunomarcacão com anti-soro contra RSV em secções seriadas de células do inseto vetor mostrou-se limitada à áreas contendo estruturas amorfas no citoplasma, adjacentes à membrana basal das células epteliais no intestino médio; sobre áreas do citoplasma adjacente à lâmina basal da glândula salivar principal e áreas do citoplasma de células foliculares dos ovaríolos, sugerindo que RSV é transmitido transovarianamente. Além disto, a marcação foi intensa sobre o citoplasma dos corpos gordurosos, nos quais estruturas filamentosas eram bem desenvolvidas (Suzuki et al., 1992).

Diante de todos estes exemplos de aplicações da imunocitoquímica fica claro a importância desta metodologia na detecção de antígenos virais, o que possibilita um melhor entendimento dos processos ocorridos durante a infecção viral. Contudo, atualmente a hibridização *in situ* vem acrescentar novos parâmetros à análise destes eventos, tanto com relação a infecções causadas por vírus quanto por viróides.

Experimentos de hibridização *in situ* com células infectadas pelo TMV, utilizando sondas moleculares biotiniladas, tornaram possível a detecção ao microscópio eletrônico dos RNAs senso positivo e negativo 72h pós-inoculação. Ambos estavam localizados no citoplasma o que sugere que este seria o sítio de

replicação deste vírus (Reinke & Zoeten, 1991).

Recentemente, Yokoyama e colaboradores (1990) tentaram determinar a localização intracelular do RNA do viróide do tubérculo afilado da batata ("potato spindle tuber viroid"-PSTVd) e do TMV em cultura de protoplastos de tomate e fumo, respectivamente, por hibridização *in situ* usando sondas de DNAc. As sondas utilizadas foram marcadas radioativamente com trítio (³H) para posterior observação ao microscopia de luz. Os resultados obtidos demonstraram a deposição de grãos de prata sobre o núcleo dos protoplastos infectados pelo PSTVd, revelando que o patógeno estava localizado no interior desta organela, enquanto que para o TMV a marcação se deu sobre o citoplasma, sugerindo que este seria o seu sítio de replicação.

5. OBJETIVOS

5.1. Identificação de virions e proteínas não estruturais in situ;

5.2. Detecção de ácidos nucleicos in situ e;

5.3. Desenvolvimento de um procedimento padrão para imunocitoquímica ultraestrutural e hibridização in situ em nossas condições.

Tabela 1. Lista de abreviaturas padronizadas proposta para os vírus de plantas citados.

Nome do vírus	Abreviatura	Família/ grupo e subgrupo
Agropyron mosaic	AgMV	Poty (? mite)
Alfalfa mosaic	AMV	AMV group
Barley stripe mosaic	BSMV	Hordei
Barley yellow dwarf	BYDV	Luteo
Barley yellow striate mosaic	BYSMV	Rhabdo A (planthopper)
Bean yellow mosaic	BYMV	Poty (aphid)
Beet curly top	BCTV	Gemini ? I
Beet mosaic	BtMV	Poty (aphid)
Beet western yellow (= barley yellow dwarf, RPV isolate)		
Brazilian tobacco streak	BTSV	Ilar
Brome mosaic	BMV	Bromo
Cassava common mosaic	CsCMV	Potex
Celery mosaic	CeMV	Poty (aphid)
Cotton leaf crumple	CLCrV	Gemini II
Clover yellow mosaic	CIYMV	Potex
Cowpea chlorotic mottle	CCMV	Bromo
Cowpea mosaic	CPMV	Como
Cucumber mosaic	CMV	Cucumo
Groundnut ringspot	GRSV	Bunya
Hordeum mosaic	HoMV	Poty (? mite)
Impatiens necrotic spot	INSV	Bunya
Indian cassava mosaic	ICMV	Gemini II

Maize dwarf mosaic	MDMV	Poty (aphid)
Maize stripe	MSPV	Tenui
Pea enation mosaic	PEMV	PEMV group
Peanut yellow mosaic	PYMV	Tymo
Pepper ringspot	PepRSV	Tobra
Plum pox	PPV	Poty (aphid)
Potato leaf roll	PLRV	Luteo
Potato X	PVX	Potex
Potato Y	PVY	Poty (aphid)
Rice hoja blanca	RHBV	Tenui
Rice stripe	RSV	Tenui
Sonchus yellow net	SYNV	Rhabdo B
Soursop yellow blotch	SYBV	Rhabdo A
Sowbane mosaic	SoMV	Sobemo
Tobacco etch	TEV	Poty (aphid)
Tobacco mosaic	TMV	Tobamo
Tobacco rattle	TRV	Tobra
Tobacco streak	TSV	Ilar
Tobacco vein mottling	TVMV	Poty (aphid)
Tomato bushy stunt	TBSV	Tombus
Tomato chlorotic spot	TCSV	Bunya
Tomato spotted wilt	TSWV	Bunya
Turnip yellow mosaic	TYMV	Tymo
Watermelon mosaic virus 2	WMV2	Poty (aphid)
Wheat streak mosaic	WSMV	Poty (mite)

TABELA 2. Lista de abreviaturas padronizadas propostas para viróides de plantas citados.

Nome do viróide	Abreviatura
Avocado sunblotch	ASBVd
Citrus exocortis	CEVd
Peach latent mosaic	PLMVd
Potato spindle tuber	PSTVd
Coconut cadang-cadang	CCCVd

(*) Abreviaturas, na sua maioria, publicadas na revista:

Fitopatologia Brasileira 17(1), 119 (1992), fornecidas pelo Dr. Roger Hull do John Innes Inst., Norwich; segundo o ICTV.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. PREPARO DO MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Para a aplicação da imunocitoquímica e hibridização *in situ*, os tecidos infectados por vírus e viróides pertencentes a diferentes grupos taxonômicos, foram submetidos aos procedimentos básicos utilizados por van Lent e colaboradores (1990a), quando foram fixados em glutaraldeído 2% + paraformaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH7,3 por 2h a 4C. Após este período o fixador foi substituído por água destilada 1h a 4C.

A seguir foi feita a desidratação em etanol 50% diluído em água destilada por 30min a 4C; seguido de etanol 70, 90 e 100% também diluídos em água, por 1h cada a -20C. Os tecidos desidratados foram transferidos para uma mistura de etanol 100%/resina LRGold (LONDON RESIN Co) 1:1 por 2h e posteriormente para resina pura por 12h seguido de nova troca de resina pura por 4h.

O emblocamento foi feito em cápsulas plásticas com resina pura e os materiais foram mantidos 48h sob UV a -20C e posteriormente mantidos por 24h sob UV a temperatura ambiente.

As secções ultra-finas, com cerca de 90nm de espessura, foram feitas em ultra-micrótomo LKB/8800- Ultratome III, com navalhas de vidro ou diamante (Diatome) e montadas sobre telinhas de níquel de 100-150 mesh recobertas por película suporte Formvar 0,6%.

2. IMUNOCITOQUÍMICA

Para experimentos de imunocitoquímica com ouro coloidal, na tentativa de localizar antígenos virais *in situ* (van Lent et al., 1990a), as secções foram inicialmente incubadas com uma solução de albumina bovina-BSA (Sigma) a 1% em tampão fosfato/salina (PBS) 0,1M, pH7,3 acrescido de azida sódica (NaN₃) 0,02% por 30min, flutuando as telinhas sobre uma gota de solução, em uma superfície montada com Parafilm com o lado das secções em contato com o líquido.

A seguir as telinhas foram transferidas para gotas do anti-soro específico diluído de 1:100 a 1:5000 em PBS onde permaneceram por 2h. Terminado o período de incubação, as telinhas foram lavadas extensivamente com gotas de PBS e transferidas para gotas de uma solução contendo proteína A complexada com ouro coloidal (20nm de diâmetro) numa diluição de 1:50 em PBS por 1h.

A seguir, as telinhas foram lavadas extensivamente com gotas de PBS e água destilada.

Antecedendo a observação ao ME, as secções foram contrastadas em solução aquosa de acetato de uranila 3% por 5min e citrato de chumbo de Reynold (1963), diluído em hidróxido de sódio (NaOH) ou hidróxido de potássio (KOH) 0,01M 1:1 por 3min.

3. HIBRIDIZAÇÃO *in situ*

Para experimentos de hibridização *in situ* (McFadden, 1991), com sondas não radioativas na tentativa de localizar moléculas de RNAs patogênicos conhecidos como viróides, as secções foram inicialmente tratadas com TRIS 50mM/NaCl 150mM, pH7,2 por 2min, flutuando as telinhas sobre uma gota de solução, em uma superfície de Parafilm com o lado das secções em contato com o líquido.

A seguir as telinhas foram transferidas para gotas da solução enzimática de proteinase K 1ug/ml em tampão TRIS/HCl 100mM, pH8,0 acrescido de EDTA 50mM por 40min a temperatura ambiente.

Na próxima etapa, montou-se uma pequena câmara úmida constituída por uma placa de Petri contendo papel de filtro umidecido com tampão de hibridização PIPES 50mM, pH7,0 acrescido de NaCl 0,15mM e EDTA 5mM além de uma solução de Denhardt 5x com Ficoll 400 0,1%, PVP 0,1%, BSA 0,1% e formamida 50%; onde pequenas lamínulas siliconizadas com Sigmacote (Sigma) continham gotas da sonda de RNA fita negativa marcada com digoxigenina 10ng/ul em tampão de hibridização onde as telinhas permaneceram por 3h a 70C.

Após a incubação com a sonda as telinhas foram lavadas extensivamente em SSC (NaCl 0,15M e citrato de sódio/fosfato de sódio 0,015M pH7,0) 4x, SSC 2x e transferidas para gotas de SSC 1x em câmara úmida por 30min a 70C.

A seguir foram transferidas para gotas do tampão SC (PIPES 50mM, pH7,2 acrescido de NaCl 0,5M, Tween 20 0,5%) por

5min a temperatura ambiente sobre uma superfície com Parafilm e em seguida as secções foram submetidas a uma solução bloqueadora contendo BSA 1% em tampão SC por 15min.

Na próxima etapa, as secções foram incubadas com o anticorpo anti-digoxigenina 5µg/ml diluído em tampão SC contendo BSA 1% por 2h a temperatura ambiente.

Terminado o período de incubação as telinhas foram lavadas extensivamente com gotas de SC e transferidas para gotas da solução contendo proteína A complexada com ouro coloidal (20nm de diâmetro) em uma diluição de 1:50 em SC por 1h.

Após esse passo, as telinhas foram extensivamente lavadas com gotas de SC e água destilada. Antecedendo a observação ao ME, as secções foram contrastadas como descrito para imunocitoquímica.

4. OBSERVAÇÃO DA MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE TRANSMISSÃO

As secções submetidas à imunomarcação para localização de proteínas e hibridização *in situ* para localização de ácidos nucleicos foram observadas ao MET JEOL 100C, fotografadas e ampliadas.

5. ANTI-SOROS (*)

5.1. Tospovirus

(*) A origem dos anti-soros, correspondentes a cada vírus, achase descrita nos resultados.

Policlonais:

Br1 (CNPH): nucleocapsídeo (Nc) do "tomato spotted wilt virus" - TSWV.

Br3/Br6: Nc do "tomato chlorotic spot virus" - TCSV.

Br8: Nc do "groundnut ring spot virus" - GRSV.

H7: Nc do "Impatiens necrotic spot virus" - INSV.

NSs: proteína não estrutural do TSWV.

Monoclonal:

G2: glicoproteína (de Ávila et al., 1990).

5.2. Potyvirus

Policlonais:

As TEV: capsídeo do "tobacco etch virus" - TEV.

As TEV-IC: inclusão cilíndrica do TEV.

As TUMV: capsídeo do "tobacco vein mottling virus" - TUMV.

As TUMV-IC: inclusão cilíndrica do TUMV.

As BYMV: capsídeo do vírus do mosaico amarelo do feijoeiro - BYMV.

5.3. Rhabdovirus

Policlonais:

As SYBV: partícula do vírus da mancha amarela da graviola - SYBV.

As SYVV: partícula do "sowthistle yellow vein virus" - SYVV.

5.4. Ilarvirus

Policlonal:

As BTSV: capsídeo do "brazilian tobacco streak virus" - BTSV.

5.5. Tobravirus

Policlonal:

As **PepRSV**: capsídeo do vírus do anel do pimentão - **PepRSV**.

5.6. Tymovirus

Policlonais:

As **EMV-T**: capsídeo do vírus do mosaico da berinjela -
isolado de fumo - **EMV-T**.

As **PYMV**: capsídeo do vírus do mosaico amarelo do maracujá -
PYMV.

5.7. Potexvirus

Policlonal:

As **CsCMV**: capsídeo do vírus do mosaico comum da mandioca -
CsCMV.

6. SONDAS

6.1. Obtenção das sondas

As sondas utilizadas nos experimentos de hibridização *in situ* (Lopez, 1991) foram produzidas a partir do plasmídeo **pSP64** que continham um clone monomérico do **ASBVd** ou do **CEVd** de orientação positiva (cedido pelo Dr. Symons, Universidade de Adelaide, Australia). O termo orientação positiva quer dizer que ao ser transcrito, o plasmídeo com a RNA polimerase do fago **SP6**, se obtém um RNA específico do viróide com a mesma polaridade que a sua forma infectiva. Neste plasmídeo, o inserto está aberto em um sítio de restrição existente nestes viróides e introduzido no

sítio BamHI na região de clonagem múltipla de pSP64. O inserto foi recuperado através de digestão com as enzimas de restrição EcoRI e HindIII (Boehringer), e subclonados nos plasmídeos pST18 e pST19 (Boehringer) previamente digeridos com as mesmas enzimas de restrição. Ambos os plasmídeos contém a mesma região de clonagem múltipla que pSP64 porém com orientações opostas entre si e flanqueadas de cada lado por promotores de duas RNA polimerases virais distintas (a SP6 e a T7). A dupla digestão permite uma ligação dirigida do inserto com orientação previamente conhecida. Os plasmídeos resultantes ao serem transcritos com a RNA polimerase do fago T7 deveriam (segundo a orientação do inserto original em pSP64) originar transcritos contendo as sequências completas do ASBVd ou do CEVd de polaridade negativa ou positiva, respectivamente.

A marcação dos transcritos foi feita com digoxigenina segundo protocolo recomendado pelo fornecedor (Boehringer).

6.2. Sondas utilizadas

Sonda negativa ASBVd: detecção da fita positiva do "avocado sunblotch viroid" - ASBVd.

Sonda negativa CEVd: detecção da fita positiva do "citrus exocortis viroid" - CEVd.

III. RESULTADOS

1. IMUNOCITOQUÍMICA

1.1. Tospovirus

Até recentemente os tospovirus eram tidos como um grupo monotípico, sendo TSWV (conhecido entre nós como vírus de vira-cabeça) o seu representante único. Recentes trabalhos usando métodos sorológicos e moleculares indicaram que o gênero tospovirus pertence à família Bunyaviridae, tendo sido, até o momento, caracterizadas mais três espécies neste gênero, respectivamente o "tomato chlorotic spot virus"-TCSV, "groundnut ringspot virus"-GRSV e "Impatiens necrotic spot virus"-INSV, além do TSWV (de Ávila et al., 1990; 1993a,b). Do ponto de vista citopatológico, todos os tospovirus apresentam características similares: as partículas virais acumulam-se no retículo endoplasmático; e no citoplasma, ao seu redor, ocorrem agregados densos de nucleocapsídeos (Fig. 1). Material fibroso, formando agregados, podem ser detectados na infecção de alguns isolados, formando massas frouxas ou paracristalinas, sabendo-se que a proteína não estrutural, codificado pelo S-RNA, NSs, faz parte deste material fibroso (Kitajima et al., 1992; Kormelink et al., 1991). Há evidências sugestivas de que a morfogênese dos tospovirus esteja associada à membranas derivadas do complexo de Golgi (Kitajima et al., 1992). Há de se mencionar que o isolado do TSWV, foi obtido no Distrito Federal, no Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPQ).

A diferenciação dos tospovirus em espécies baseia-se no uso de uma bateria de anti-soros mono e policlonais. Estas diferenças refletem-se também em ensaios imunocitoquímicos: comparações dos níveis de marcação, avaliados pelo número de partículas de ouro coloidal, refletem no geral os dados dos testes de ELISA (de Ávila et al., 1990; Kitajima et al., 1992).

Alguns isolados de tospovirus estavam sendo mantidos na coleção de vírus da UnB e do CNPH: isolado de lentilha (*Lens culinaris*), de emília (*Emilia sonchifolia*), de tomate e de maria-pretinha (*Solanum nigrum* L.). Ensaios de imunocitoquímica foram feitos em plantas-teste infectadas com estes isolados e testados contra anticorpos policlonais contra o nucleocapsídeo dos 4 isolados (TSWV, TCSV, GRSV e INSV) e a proteína não estrutural NSs, além de um anticorpo monoclonal contra a glicoproteína (G2) do TSWV (Fig. 2-8). Tecidos de *N. benthamiana*, *N. rustica* e *Datura stramonium* infectados com os 4 isolados foram usados como controles positivos.

1.2. Potyvirus

1.2.1. "Tobacco etch virus"-TEV

O TEV utilizado neste experimento é um isolado encontrado em Honduras, tendo sido identificado através de testes biológicos, imunológicos e citopatológicos (Kitajima & Quiroz, 1991; Lima & Kitajima, 1993a). Este isolado como o TEV típico (Purcifull & Hiebert, 1982), induz inclusões cilíndricas do tipo III, da classificação de Edwardson (1966). Virions podem ser vistos espalhados no citoplasma, e caracteristicamente, surgem inclusões cristalinas no núcleo (IN), constituídas de proteínas não estruturais do vírus, com função de protease (Matthews, 1991). Apenas poucos potyvirus induzem tais inclusões.

As imunomarcações foram feitas com anti-soros policlonais fornecidos pelo Dr.T. Pirone (Univ. Kentucky), Dr.D. Purcifull (Univ. Flórida) e Dr.Baunoch (Univ. Detroit) para virions e inclusões cilíndricas do TEV. Foram utilizados também anti-soros contra o "tobacco vein mottling virus"-TVMV, outro potyvirus proximamente relacionado ao TEV (Purcifull & Hiebert, 1982), fornecido pelo dr. Pirone.

As marcações feitas com o anti-soro contra TEV apareciam dispersas no citoplasma, sem se associar às IC ou outras estruturas, incluindo núcleo (Fig. 9). Já o anti-soro contra IC do TEV marcou fortemente, conforme constatado pela intensa deposição de grãos de ouro, as IC (Fig. 11). A especificidade foi muito boa, visto que não houve marcação de outras estruturas presentes nas secções. Com anti-soros contra a proteína capsial e IC do TVMV os resultados foram similares

(Fig. 10 e 12) , mas o nível de marcação foi menos intensa, principalmente para IC (Fig. 12), de acordo com os testes sorológicos, que apontam relacionamento entre estes vírus.

1.2.2. Vírus do mosaico amarelo do feijoeiro ("bean yellow mosaic virus"-BYMV)

O isolado do BYMV utilizado foi cedido pelo dr.A.M.R. Almeida, do CNPSoja/EMBRAPA, tendo sido isolado de tremoço (*Lupinus lupin L.*), causando-lhe mosaico, no norte do Paraná. A identificação foi baseada em propriedades biológicas, sorológicas e citopatológicas (Faria et al., 1990; Ramagem, 1993). As ICs induzidas pelo BYMV são do tipo II da classificação de Edwardson (1966), e alguns isolados podem induzir inclusões cristalinas, intranucleares (Francki et al., 1985). Este isolado paranaense do BYMV aparentemente não induz INs.

Os experimentos de imunomarcação foram feitos usando anti-soro policlonal, contra a proteína capsidal, cedido pelo Inst. Fitoviol. Appl. de Turin, Itália. Partículas de ouro coloidal apareciam dispersos no citoplasma, sem estarem associados as ICs ou outras estruturas (Fig. 13).

1.3. Rhabdovirus

1.3.1. Vírus da mancha amarela da graviola ("Soursop yellow blotch virus"-SYBV)

O SYBV foi encontrado no estado do Ceará infectando naturalmente a graviola (*Annona muricata*) e experimentalmente infecta apenas outras anonáceas. Uma caracterização preliminar já

foi feita (Kitajima et al., 1993); citopatologicamente, este rhabdovirus é do tipo citoplasmático (Francki et al., 1985), apresentando suas partículas acumuladas no lúmen do retículo endoplasmático. Trabalhos de caracterização molecular estão em andamento (Martins & Kitajima, 1993; Martins et al., 1993).

Um anticorpo policlonal foi produzido e utilizado para ensaios de imunomarcação *in situ*. Este anticorpo, embora de baixo título, e contendo anticorpos contra proteínas da planta (Fig. 14), apresentou resultados satisfatórios em testes de dot-ELISA, quando absorvido com o suco de planta sadia e usado a diluições maiores (Martins, com. pess.). Nos experimentos feitos, a imunomarcação ocorreu consistentemente sobre as massas de partículas virais contidas em elementos do retículo endoplasmático e também sobre massas filamentosas que ocorrem em suas proximidades, confirmando-se assim a suposição de que elas representariam um acúmulo de nucleocapsídeos virais (Fig. 15).

1.3.2. Rhabdovirus isolado de picão

Um rhabdovirus mecanicamente transmissível, foi isolado de picão (*Bidens pillosus*) com sintomas de mosaico, e que infectou experimentalmente alface, *Nicotiana glutinosa*, *N. rustica* e *Gomphrena globosa* (Kitajima et al., 1991b). Suas propriedades biológicas e citopatológicas eram similares às do "sonchus yellow net virus"-SYNV (Jackson & Christie, 1979). Nas células infectadas, as partículas acumulam-se no espaço perinuclear; e no nucleoplasma surgem massas amorfas ou fibrosas (viroplasma). O anti-soro policlonal contra este vírus foi cedido pelo Dr. A.O. Jackson (Univ. California, Berkeley), e os

experimentos de imunomarcacão conduzidos, resultaram numa forte marcao das partículas na cavidade perinuclear e também dos "viroplasmas", que seriam agregados de nucleocapsídeos virais (Fig. 16). Os resultados representam forte evidência para a identidade deste vírus encontrado no picão e o SYNV.

1.4. Ilarvirus

1.4.1. Vírus da necrose branca do fumo ("brazilian tobacco streak virus"-BTSV)

Embora bastante estudado sob vários aspéctos, tanto o BTSV, como a contrapartida norte -americana ("tobacco streak virus"-TSV) não tem sido estudado sob o ponto de vista citopatológico, como a maioria dos ilarvirus (Francki et al., 1985). Kitajima & Costa (1986) relataram resultados preliminares de efeitos citopáticos, demonstrando a ocorrência de grande número de partículas isométricas, de 25-35nm, presumíveis virions, no citoplasma das células parenquimáticas do mesófilo e da região vascular, bem como no lúmen dos vasos crivados. Uma confirmao da natureza viral destas partículas foi testada através de métodos imunocitoquímicos, usando anti-soro policlonal contra TSV, fornecido pelo dr.Kaiser (Wash.St.Univ.) e contra BTSV, produzido na UnB (Bertuol et al., 1992).

As marcaes foram notadas consistentemente no citoplasma, onde foram observados os presumíveis virions, não se observando presença de antígenos em outras estruturas celulares (Fig. 17 e 18).

1.5. Tobravirus

1.5.1. Vírus do anel do pimentão ("pepper ringspot virus"-PepRSV)

O PepRSV foi encontrado originalmente em São Paulo infectando pimentão, mas tem sido encontrado em outras culturas e em outras regiões, inclusive no Distrito Federal (Cupertino et al., 1991). É um tobravirus, originalmente considerado uma estirpe do "tobacco rattle virus"-TRV, tendo sido designado TRV-CAM, mas recentemente, baseado em critérios moleculares, foi separado como um vírus distinto. É um vírus de genoma bipartido, e apresenta uma característica marcante, do ponto de vista citopatológico, que é a associação das partículas perpendicularmente às mitocôndrias (Harrison & Roberts, 1968).

Um isolado do PepRSV foi encontrado no Distrito Federal, infectando a ornamental bico-de-tucano (Kitajima et al., 1991a) causando faixas cloróticas e anéis. Exames citológicos mostraram efetivamente a presença de partículas em forma de bastonetes associadas às mitocôndrias. Ensaio de imunocitoquímica, usando anti-soro policlonal contra PepRSV, produzido na UnB (Lin, M.T., dados não publicados) mostraram marcação específica sobre estes bastonetes, confirmando sua natureza viral (Fig. 19).

1.6. Potexvirus

1.6.1. Vírus do mosaico comum da mandioca ("cassava common mosaic virus"-CsCMV)

O CsCMV foi descrito no Brasil, tendo sido detectado em outros países sul-americanos (Costa & Kitajima, 1972). Como nos demais potexvirus, presumíveis virions formam imensas massas fibrosas no citoplasma. Anti-soro contra o CsCMV, produzido no CIAT, foi utilizado para ensaios de imunocitoquímica. A marcação deu-se exclusivamente sobre as massas fibrosas, confirmando sua natureza viral (Fig. 20).

1.7. Tymovirus

1.7.1. Vírus do mosaico da berinjela, isolado fumo ("eggplant mosaic virus, tobacco isolate"-EMV-T)

Foram encontradas em Sta. Catarina, plantas de fumo comercial mostrando sintomas de mosaico. O agente causal da anomalia foi identificado como sendo um isolado do EMV, designado de EMV-T. A peculiaridade reside no fato de ter sido encontrado infectando naturalmente plantas de fumo, planta que a maioria dos isolados do EMV não faz, mesmo experimentalmente (Ribeiro, 1988). Parte da proteína capsial foi recentemente sequenciada (Pinheiro, 1993). Como os demais tymovirus (Francki et al., 1985), do ponto de vista citopatológico, o EMV-T exhibe grande número de presumíveis virions no citoplasma e vacúolo, e induz as características vesículas na periferia dos cloroplastos. Confirmando os experimentos prévios de Ribeiro (1988), em

experimentos de imunomarcacão usando anti-soro específico, houve marcaco intensa no citoplasma, no vacúolo, e também em alguns núcleos (Fig. 21 e 22). Esta última constataco indica que embora não ocorram virions intactos, proteínas capsidais migram para o nucleoplasma, o que ocorre também com outros tymovirus.

1.7.2. Vírus do mosaico amarelo do maracujá ("passionfruit yellow mosaic virus"-PYMV)

Este outro tymovirus, genuinamente brasileiro, foi encontrado infectando naturalmente maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no estado do Rio de Janeiro, e caracterizado adequadamente por Crestani (Crestani, 1984; Crestani et al., 1984). Do ponto de vista citopatológico, apresenta alteraces características de tymovirus. Utilizando-se de anti-soro contra a proteína capsidal, produzido por Crestani, foram feitos ensaios de imunocitoquímica. Os resultados foram essencialmente similares aos descritos anteriormente para o EMV-T, ocorrendo marcaco sobre presumíveis virions no citoplasma e no vacúolo. No núcleo, embora não se detecte virions, ocorre marcaco, indicando a presença de proteína capsidal (Fig.23 e 24).

2. HIBRIDIZAÇÃO *in situ*

2.1. "Avocado sunblotch viroid"-ASBVd

Uma enfermidade de abacateiro caracterizada por frutos manchados, como se houvera queimado de sol, e plantas com pouco desenvolvimento, foi identificada como sendo causada por um viróide, denominado de ASBVd. Este viróide tem algumas peculiaridades que o diferencia dos demais: com cerca de 250 bases, diferenças na estrutura secundária, e propriedades de autocorte (Marcos & Flores, 1992).

Estudos de fracionamento celular indicaram também, que ao contrário dos demais viróides estudados como o "potato spindle tuber viroid"-PSTVd e "citrus exocortis viroid"-CEVd, que se acumulam no núcleo, o ASBVd aparecia associado à fração citoplasmática e/ou dos cloroplastos (Marcos & Flores, 1990). A fim de esclarecer este ponto, foi feito um experimento de hibridização *in situ*, usando sondas apropriadas, contra fitas senso + ou -, marcadas com digoxigenina, usando anti-soro policlonal contra digoxigenina para sua detecção.

Os resultados dos experimentos mostraram que a marcação aparece consistentemente sobre os cloroplastos, e em menor grau, sobre o citoplasma, não havendo marcação significativa em outras estruturas (Fig. 25 e 26). Experimentos controles em plantas saudias, ou usando sondas para CEVd, confirmaram estas observações (Fig. 27 e 28).

Estas tendências ficaram bem evidenciadas quando, por análises morfométricas, converteu-se as marcações em termos de densidades por unidade de área (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Estimativa morfométrica das áreas ocupadas por diferentes organelas celulares em tecido de células sadias e infectadas com o ASBVd.

Organela #	Contagem de organelas		Área média (um ² e %)			
	S	I	S	%	I	%
Cloroplasto	29	71	142,8	7,6	254	17,7
Citoplasma	10	27	864,9	46	365,7	25,4
Mitocôndria	30	81	8,6	0,5	9,8	0,7
Vacúolo	10	20	818,5	43,6	737,3	50,6
Núcleo	6	23	43,4	2,3	81,2	5,6

Dez e 27 células do mesófilo de abacate foram analisadas de plantas controle sadias (S) e infectadas com o ASBVd (I) respectivamente.

Tabela 4. Resultados da imunomarcacão com ouro coloidal após a hibridizacão "in situ" utilizando-se uma sonda de DNAc diretamente contra a fita positiva do ASBVd em tecidos de folhas sadias e infectadas com o ASBVd.

Organela #	Contagem das partículas de ouro			
	por organela		por um2	
	S	I	S	I
Cloroplasto	40	833	0,28	3,28**
Citoplasma	9	71	0,01	0,2*
Mitocôndria	3	4	0,28	0,35
Vacúolo	21	25	0,026	0,034
Núcleo	7	9	0,152	0,101

Dez e 27 células do mesófilo de abacate foram analisadas de plantas controle sadias (S) e infectadas com o ASBVd, respectivamente.

* e ** diferença estatística significativa nas partículas de ouro/unidade de área, em $p < 0,05$ e $p < 0,001$ respectivamente, utilizando-se teste t em duas amostras.

3. FIGURAS

Figuras 1-24. Detecção por imunocitoquímica de antígenos virais *in situ* em tecido foliar de plantas infectadas por diferentes vírus.

Figuras 25-28. Detecção por hibridização *in situ* de ácidos nucleicos em tecido foliar de abacateiro infectado pelo ASBVd.

Chave para abreviações: * - partículas virais

AD - agregado denso

C - cloroplasto

IC - inclusão cilíndrica

IF - inclusão fibrosa

M - mitocôndria

N - núcleo

NC - nucleocapsídeo

NU - nucléolo

P - parede celular

PX - peroxissoma

VP - viroplasma

Figura 1. Efeito citopático de célula do parênquima de *Datura stramonium* infectada com o TSWV, mostrando partículas contidas nas cavidades do retículo endoplasmático (seta), inclusão fibrilar e agregado denso.

Figura 2. Imunomarcacão em agregados densos de nucleocapsídeo viral, em célula do parênquima de *N. rustica* infectada com o isolado de lentilha do TSWV (*Lens culinaria*) com o anti-soro Br3 (TCSV).

Figura 3. Imunomarcacão de agregados densos de nucleocapsídeo em células do parênquima de *Nicotiana rustica* infectada pelo isolado de lentilha (*Lens culinaria*) tratada com o anti-soro específico Br1 (TSWV).

Figura 4. Célula do parênquima de *Nicotiana rustica* infectada GRSV demonstrando marcação muito intensa sobre agregados de nucleocapsídeo quando tratada com o anti-soro específico Br8 (GRSV).

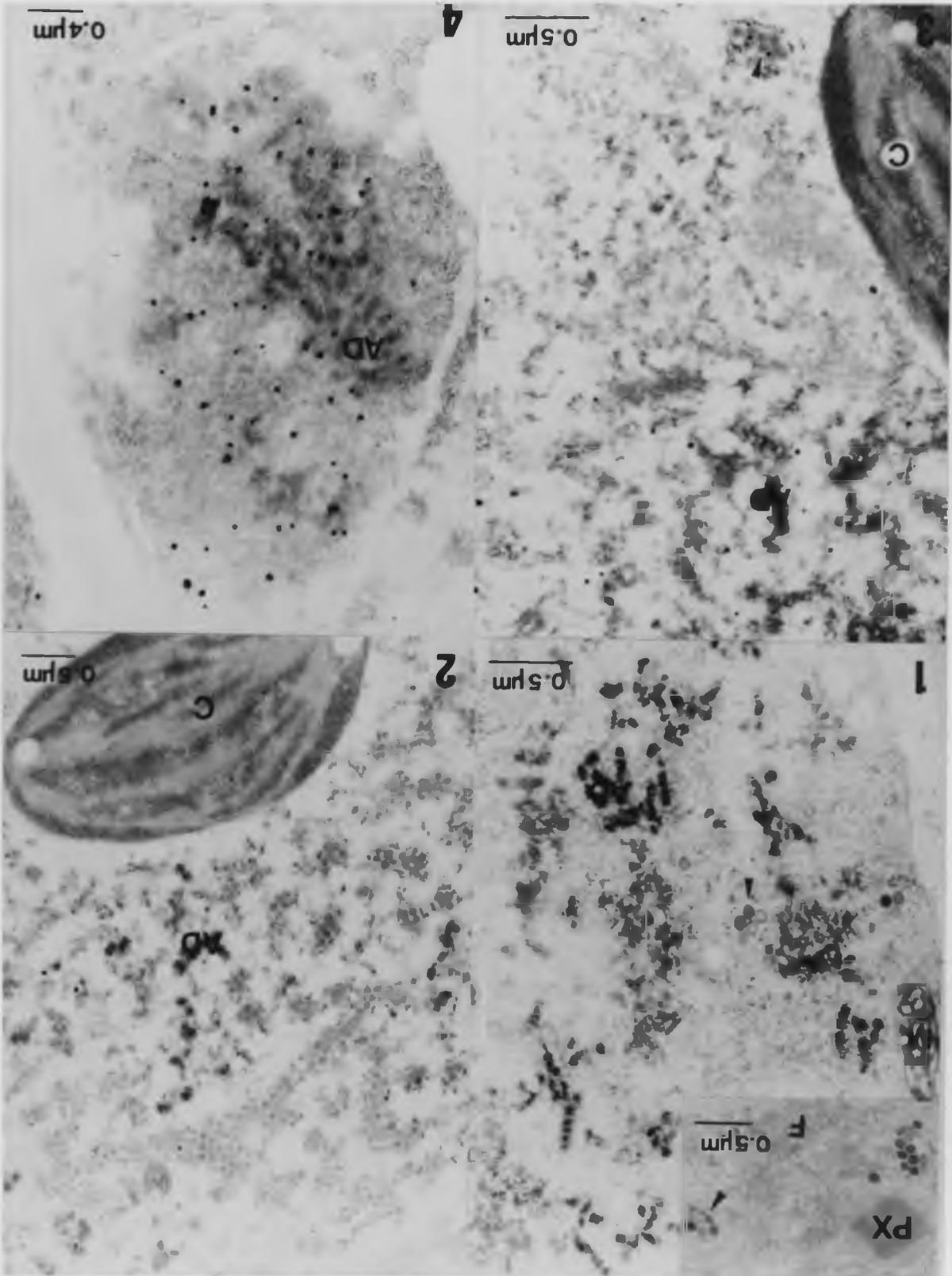


Figura 5. Imunomarcacão muito intensa de partículas virais de célula do parênquima de *Datura stramonium* infectada pelo isolado de maria-pretinha (*Solanum nigrum*) do TSWV com o anticorpo contra a glicoproteína (G2).

Figura 6. Célula do mesófilo de emília (*Emilia sonchifolia*) infectada com o isolado do TSWV mostrando marcao muito intensa sobre agregados densos, quando tratada com anti-soro contra a proteína não estrutural (NSs).

Figura 7 e 8. Imunomarcacão específica de inclusões fibrilares em célula do parênquima de *Datura stramonium* infectada pelo isolado de tomate do TCSV quando tratada com o anti-soro contra a proteína não estrutural (NSs).

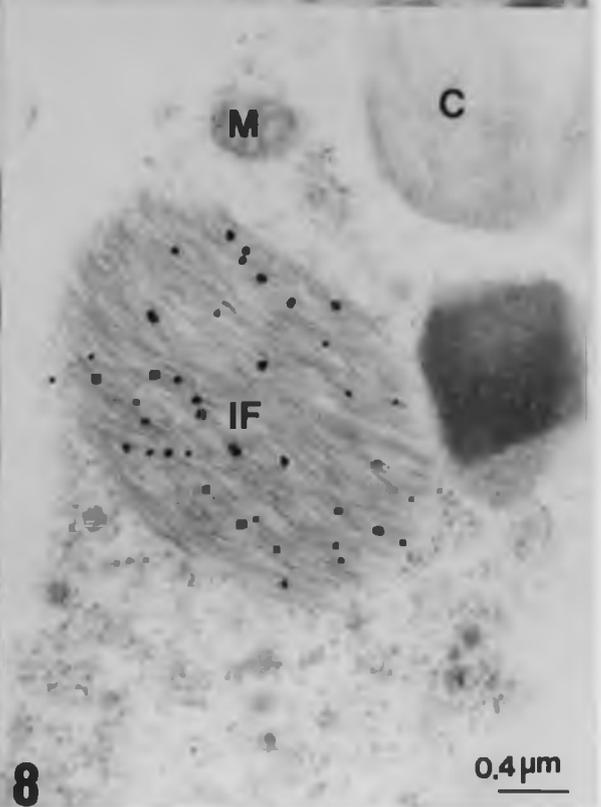
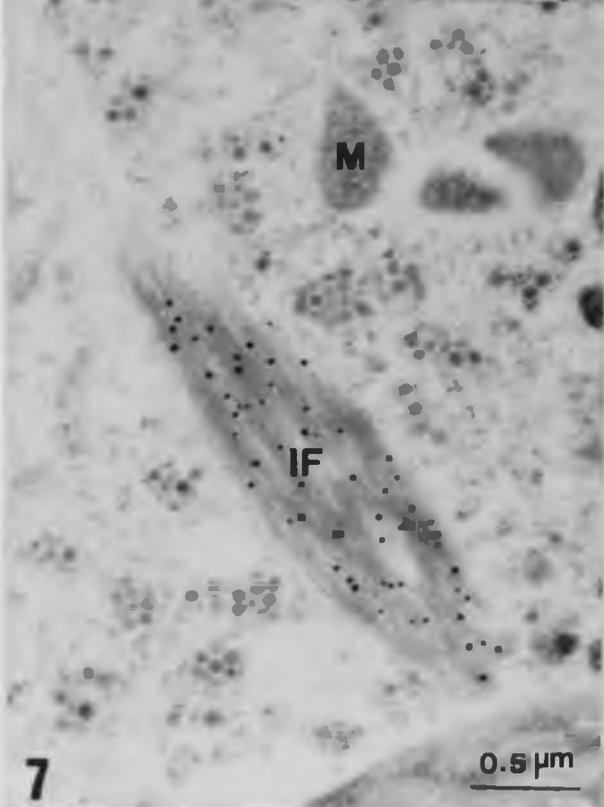
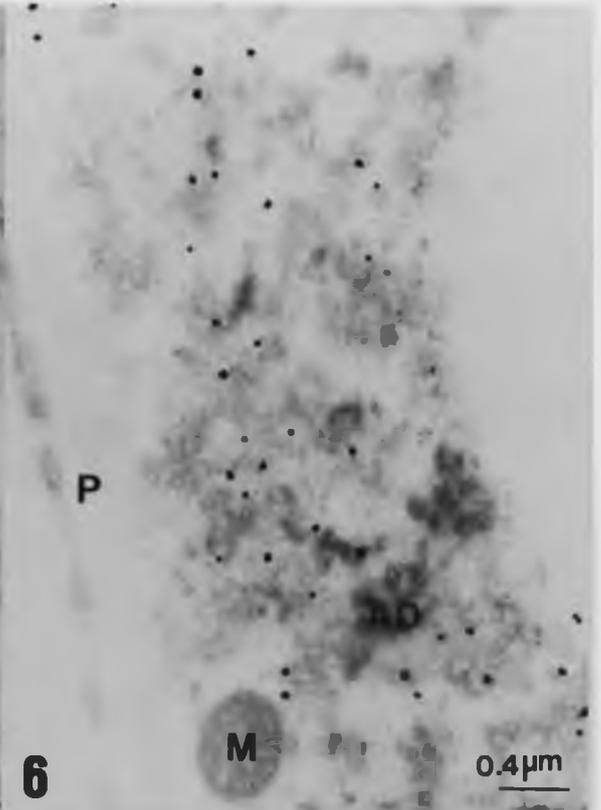
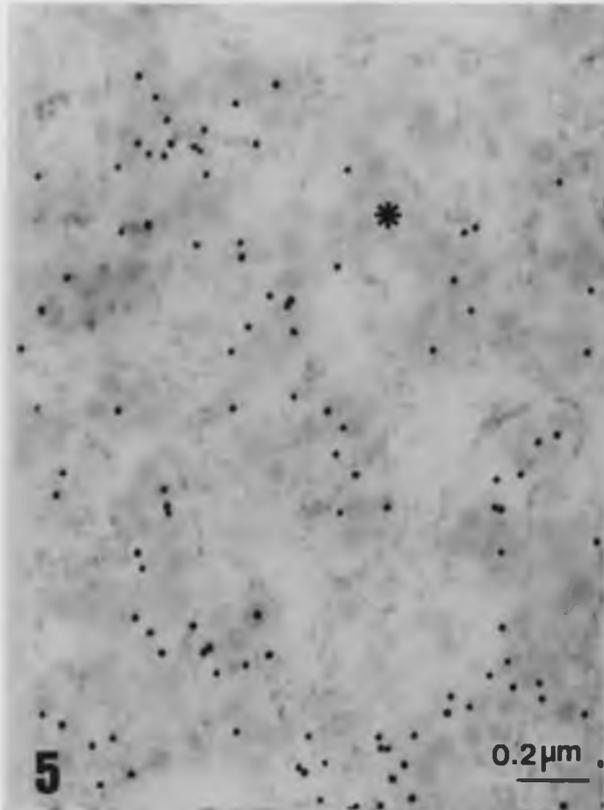


Figura 9. Imunomarcacão específica no citoplasma (*) de célula infectada pelo TEV, quando tratada com o anti-soro contra a proteína capsidal do TEV. Notar a ausência de marcao sobre as IC.

Figura 10. Intensa marcao sobre o citoplasma (*) de célula infectada pelo TEV tratada com o anti-soro contra o TVMV. Não se observa marcao sobre as IC.

Figura 11. Inclusões cilíndricas induzidas pelo TEV fortemente marcadas pelo anticorpo específico. Notar que o citoplasma não se encontra marcado.

Figura 12. Imunomarcacão suave das inclusões cilíndricas em célula infectada pelo TEV tratadas com o anticorpo contra as inclusões cilíndricas do TVMV.

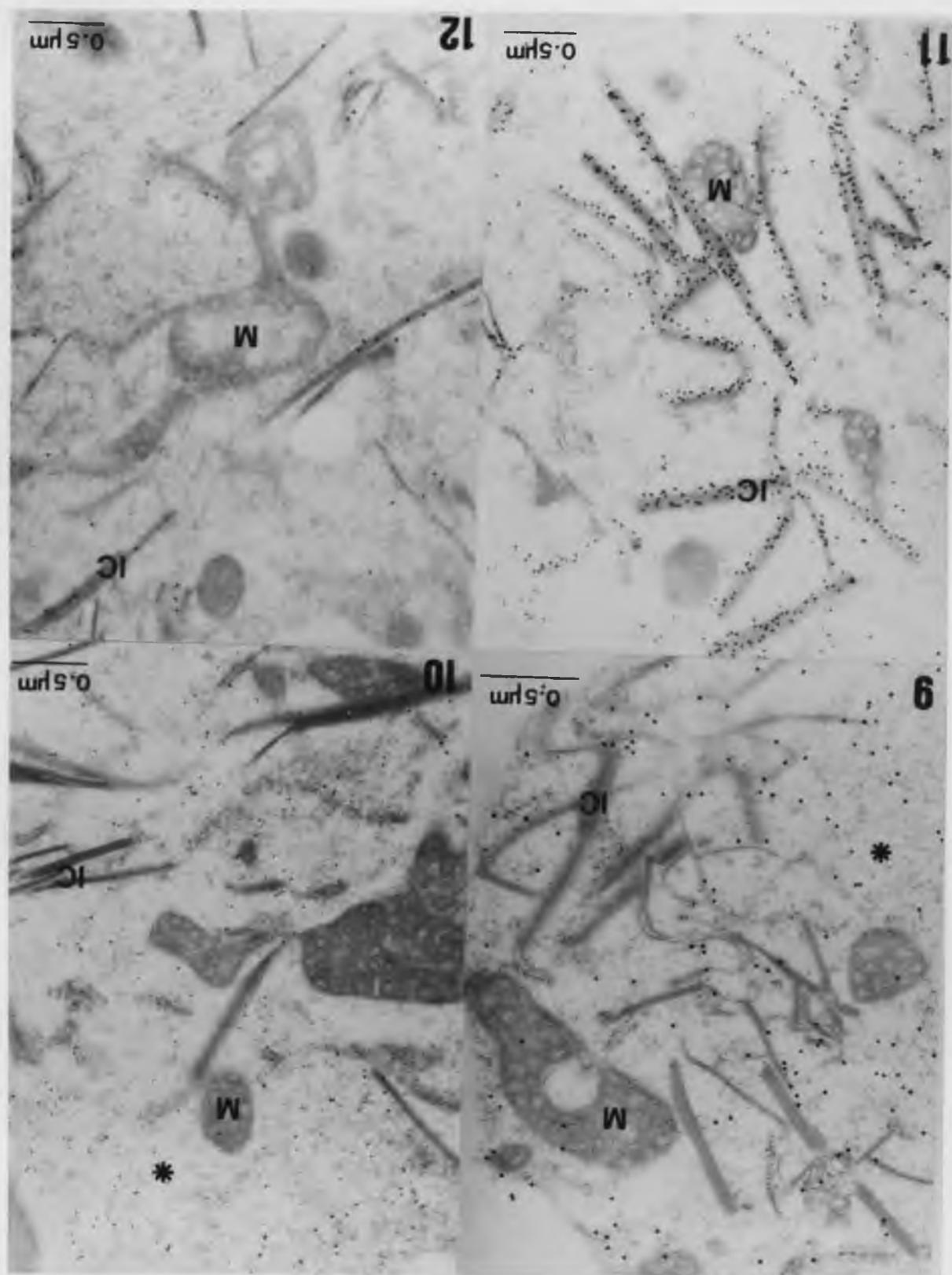


Figura 13. Imunomarcacão específica sobre o citoplasma (*) de célula infectada pelo BYMV. Observar que as inclusões cilíndricas não se encontram marcadas.

Figura 14. Célula sadia do parênquima de graviola (*Annona muricata*) tratada com anti-soro contra o SYBV. Notar a leve marcação esparsa e inespecífica por toda a célula.

Figura 15. Imunomarcacão específica de célula do parênquima de graviola (*Annona muricata*) infectada pelo SYBV. A marcação se dá especificamente sobre as partículas virais (*) presentes nas cavidades do retículo endoplasmático e sobre massas filamentosas de nucleocapsídeos presentes em suas proximidades.

Figura 16. Célula do parênquima infectada com um rhabdovirus isolado de de picão (*Bidens pillosus*) tratada com o anti-soro contra o SYN. Observar a forte marcação das partículas (*) na cavidade perinuclear e também sobre o viroplasma.

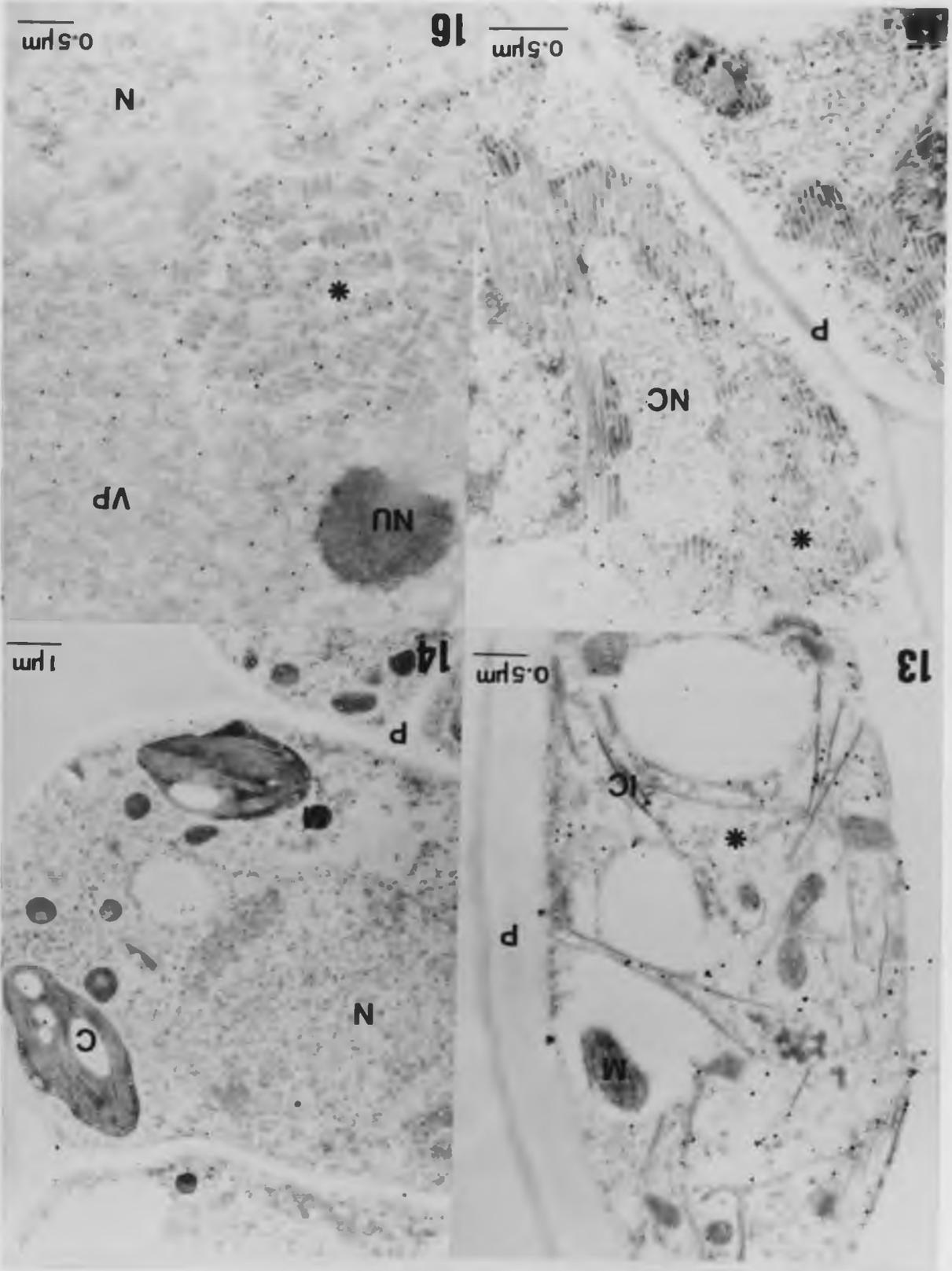


Figura 17 e 18. Imunomarcacão de célula do parênquima de fumo (*Nicotiana tabacum*) infectada pelo BTSV. A marcao acha-se distribuida sobre o citoplasma (*).

Figura 19. Imunomarcacão específica de partículas virais (*) no citoplasma de célula do parênquima foliar de bico-de-tucano infectada pelo PepRSV associadas às mitocôndrias.

Figura 20. Imunomarcacão específica sobre massa fibrosa constituida de partículas virais (*) no citoplasma de célula do parênquima de folha de mandioca infectada pelo CsCMV.

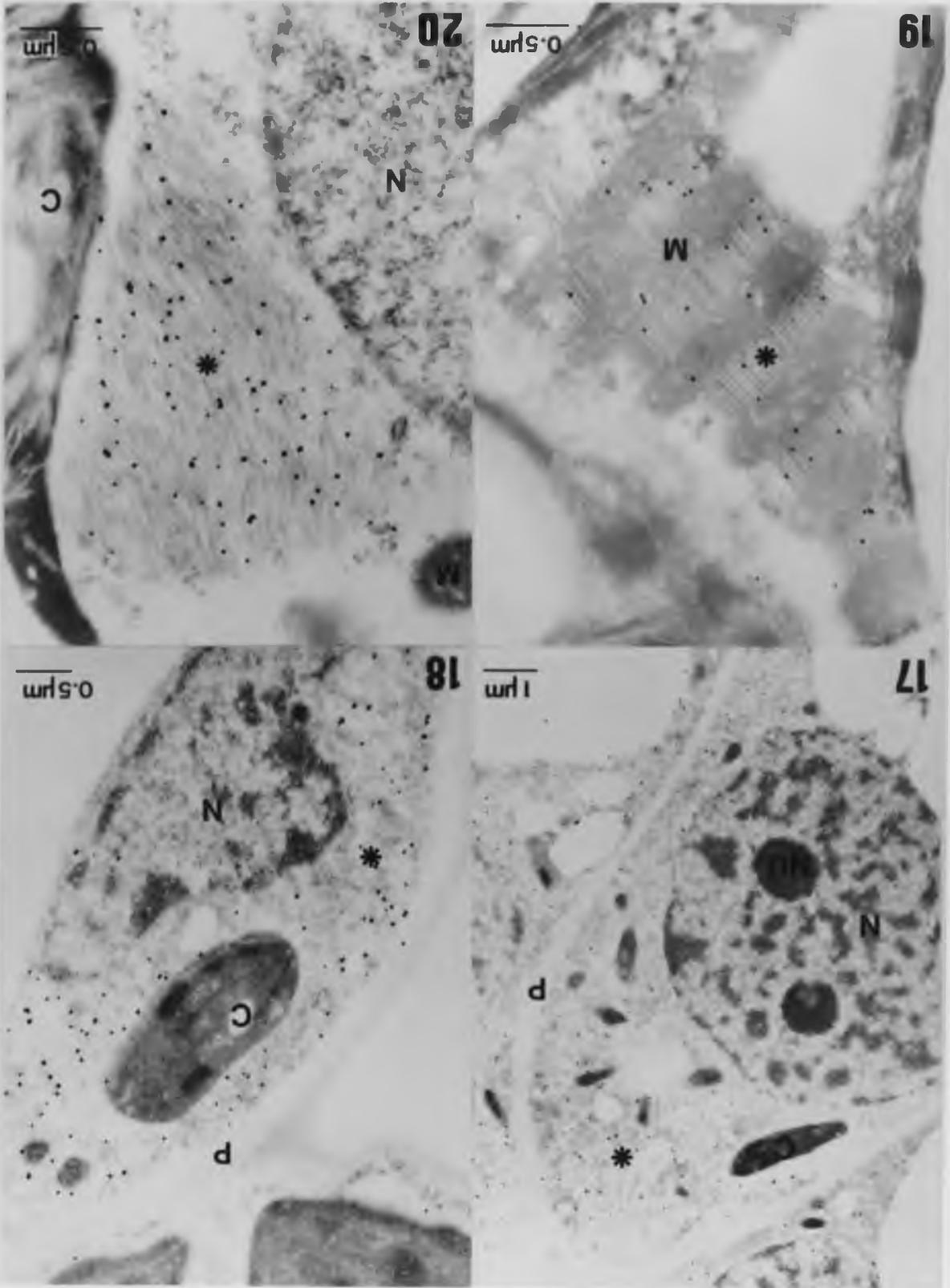
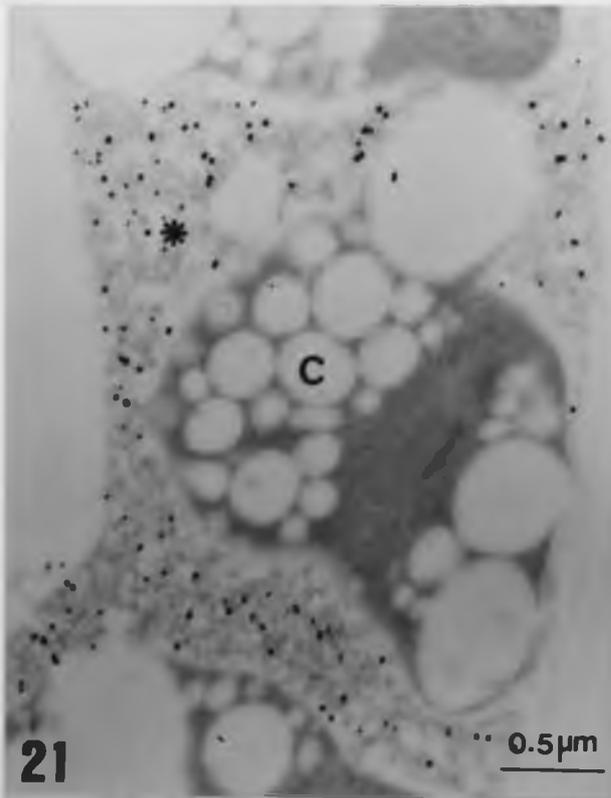


Figura 21. Partículas de vírus do EMV-T (*) no citoplasma de célula foliar de fumo (*Nicotiana tabacum*) marcadas com o anticorpo específico.

Figura 22. Célula do mesófilo de fumo (*Nicotiana tabacum*) infectada com o EMV-T. A marcação é aparente sobre o citoplasma e núcleo. No núcleo, embora não se detecte virions, a marcação indicaria a presença de proteína capsial.

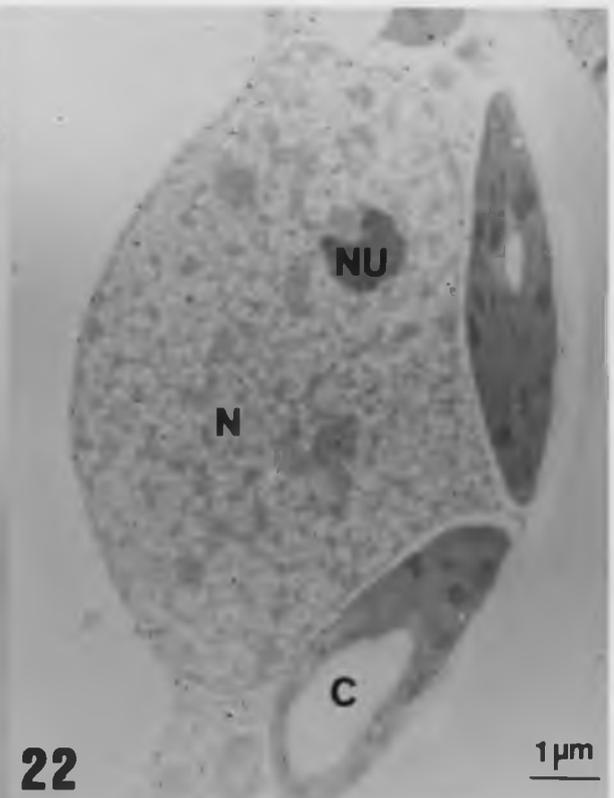
Figura 23. Imunomarcção específica com anti-soro contra PYMV em célula do mesófilo de maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) infectada pelo PYMV. A marcação é aparente sobre o citoplasma onde presumíveis partículas de vírus são encontradas (*).

Figura 24. Imunomarcção específica com anti-soro contra a proteína capsial em célula do parênquima do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) infectada pelo PYMV. A marcação sobre o nucleoplasma indica a presença da proteína do capsídeo.



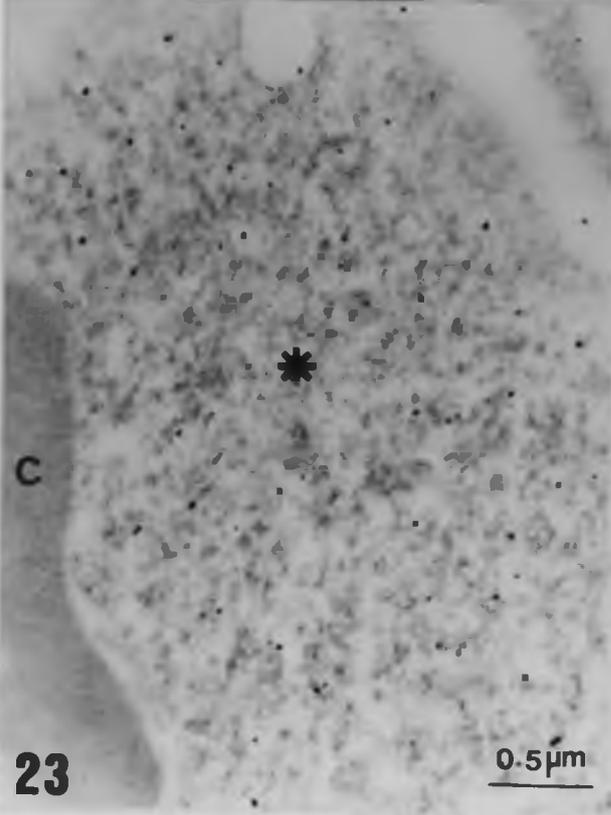
21

0.5 μm



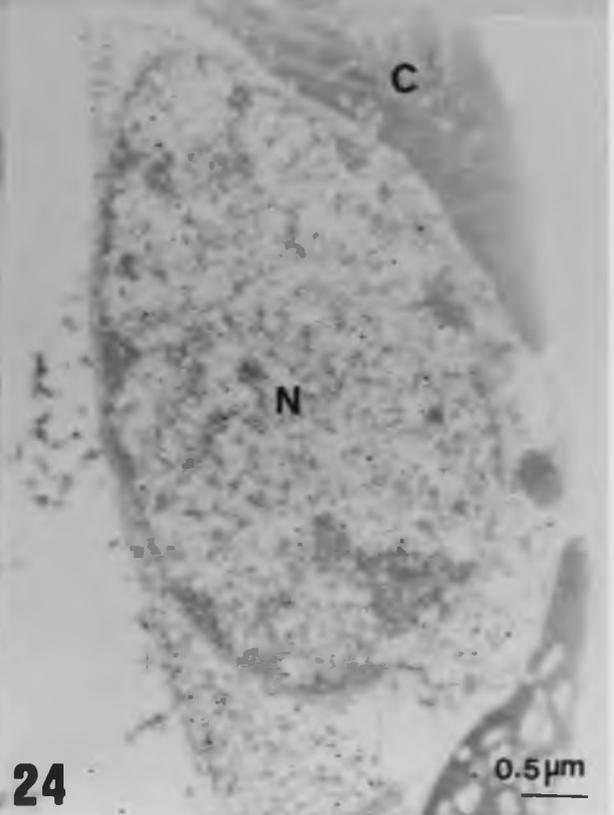
22

1 μm



23

0.5 μm



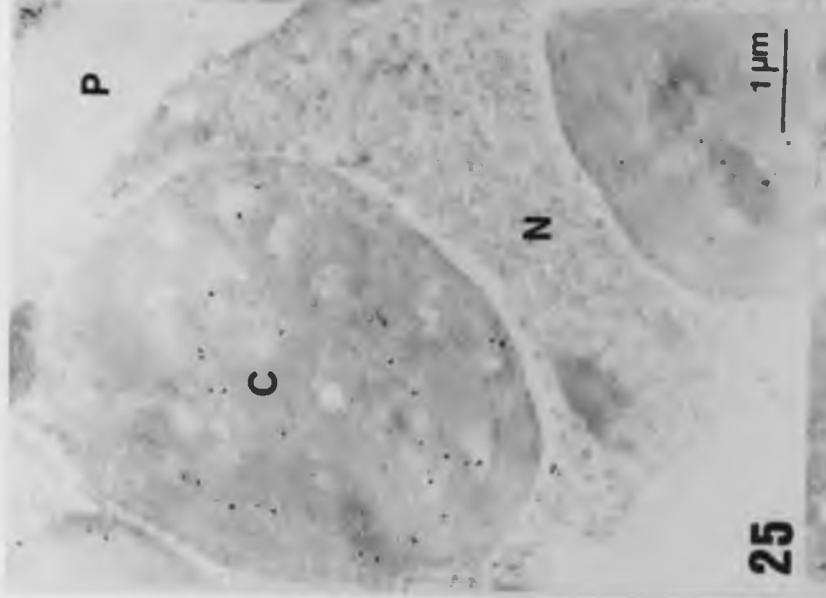
24

0.5 μm

Figura 25 e 26. Parênquima de células de folhas de abacate infectadas pelo ASBVd. Observa-se que a marcação pelas partículas de ouro coloidal é evidente sobre os cloroplastos e ausentes sobre as demais organelas citoplasmáticas.

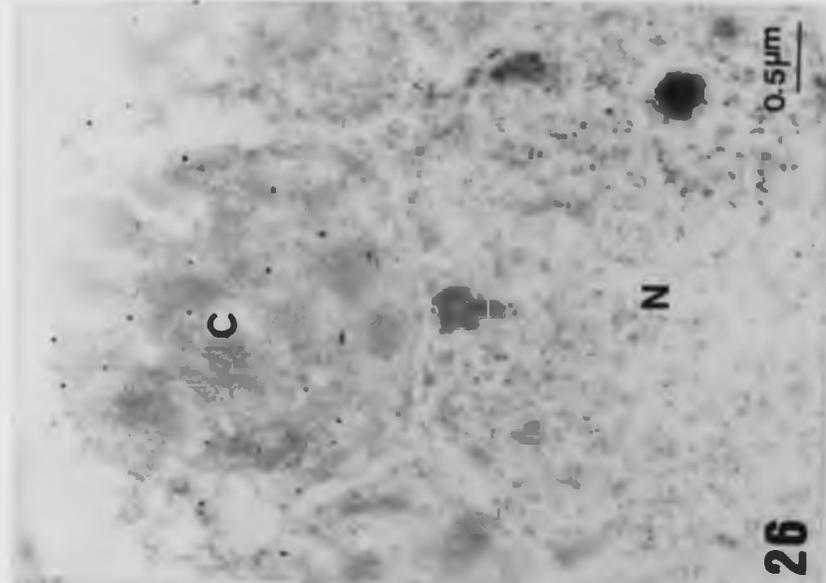
Figura 27. Similar às Figs. 25 e 26, contudo tratada com a sonda contra o CEVd. Nenhuma marcação é observada.

Figura 28. Célula sadia do parênquima de abacate tratada com a sonda contra o ASBVd. Notar que apenas um pequeno background de marcação é observado.



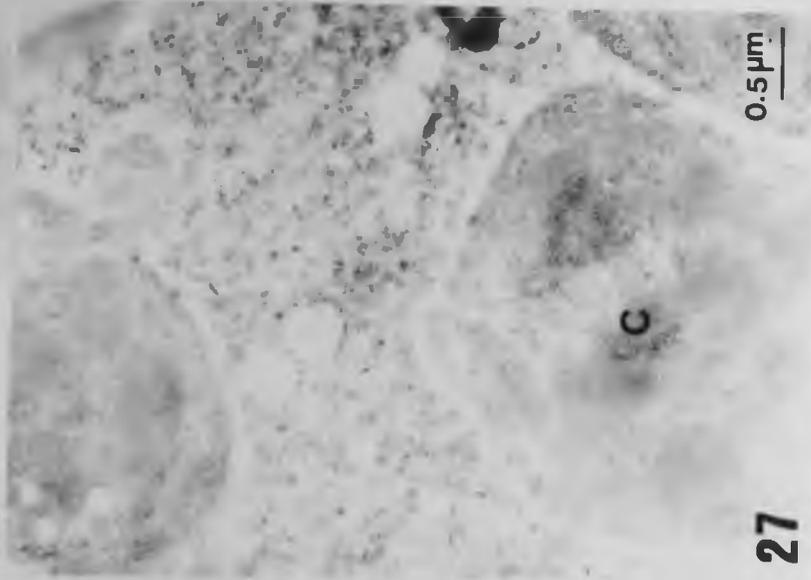
25

1 μm



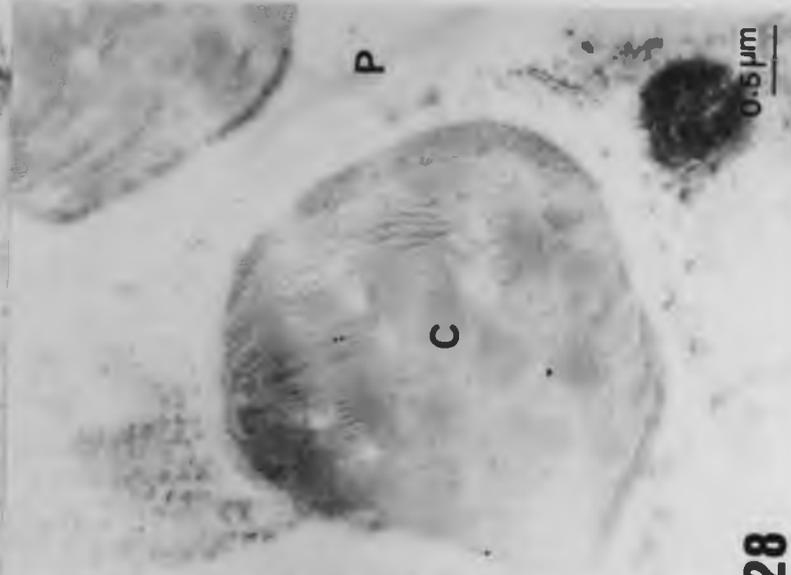
26

0.5 μm



27

0.5 μm



28

0.5 μm

IV. DISCUSSÃO

1. IMUNOCITOQUÍMICA

1.1. Tospovirus

Os aspectos citopatológicos dos isolados de tospovirus estudados neste trabalho (de tomate, emília, maria-pretinha e lentilha) foram essencialmente os já descritos anteriormente (Kitajima et al., 1992), com vírions no retículo endoplasmático, agregados densos de nucleocapsídeos e em alguns casos, massas de material fibrilar no citoplasma. Os dados de imunomarcação *in situ* empregando-se anti-soros policlonais contra nucleocapsídeos dos diferentes vírus deste grupo, 3 dos isolados analisados seriam TSWV e um deles, TCSV. Anticorpo monoclonal contra a glicoproteína marcou apenas as partículas completas, como esperado, em todos os isolados testados. Também, ocorreu marcação sobre inclusões fibrosas ou dispersas sobre o citoplasma, quando utilizou-se anti-soro contra a proteína NSs do TSWV (Kormelink et al., 1991), em todos os isolados, mostrando também ser uma proteína conservada.

Verificou-se variações entre experimentos para o mesmo material, mas isto pode ser atribuído a pequenas diferenças que possam ocorrer nos procedimentos de preparo (fixação à inclusão; lotes de anti-soros, etc.). Recentemente Wescot e colaboradores (1993) propuseram um procedimento rápido para fixação e inclusão que produz excelente preservação dos sítios antigênicos de TSWV, tanto nos tecidos de plantas como do trips vetor.

Embora não possa ser utilizado para fins quantitativos, como o teste de ELISA, a imunomarcacão *in situ* mostrou-se, no caso dos tospovirus, um complemento adequado nos trabalhos de especificacão de isolados no gênero tospovirus.

1.2. Potyvirus

Nos experimentos realizados com os dois potyvirus testados (um isolado do TEV, encontrado em tomateiro, de Honduras, e outro do BYMV, do tremoço, no estado do Paraná) os resultados de imunomarcacão forneceram dados adicionais sobre a comprobatórios da viral dos mesmos.

No caso do TEV, anticorpos contra a proteína capsidal do TEV e do TMV marcaram, *in situ*, com intensidade similar virions do TEV dispersos no citoplasma indicando que, pelo menos com estes anticorpos, há grande similaridade entre as proteínas capsidais do TEV e do TMV. Contudo, como não se pode fazer o teste recíproco, os dados devem ser encarados com certa reserva. Para a proteína que constitui a IC do TEV, a reação homóloga foi significativamente maior do que quando se usou anticorpo contra IC do TMV. Esta observacão contraria o esperado, em que proteínas de IC seriam mais conservadas que as capsidais (Purcifull & Hiebert, 1992). Uma das explicações para isto pode estar relacionada com a qualidade do anti-soro.

Para o BYMV, a imunomarcacão dos virions *in situ* não só confirma sua localizacão citoplasmática, mas também representa mais um dado adicional identificando este potyvirus encontrado em tremoço como BYMV.

1.3. Rhabdovirus

O anticorpo contra virions do SYNÚ marcaram significativamente tanto as partículas completas acumuladas no espaço perinuclear como o viroplasma presente no núcleo, e juntamente com os dados biológicos constituem em uma forte evidência de que este vírus isolado de picão é o SYNÚ ou um vírus proximoamente relacionado. Mencione-se que o SYNÚ já foi encontrado nos EUA, infectando naturalmente o picão (Kuhn et al., 1980). é possível que alguns dos rhabdovirus que se acumulam na cavidade perinuclear e descritos entre nós (Kitajima et al., 1991b) também possam ser o SYNÚ. Isto poderia ser verificado, pois em princípio é possível fazer imunomarcacão em tecidos fixados com OsO4 e emblocados em resinas epóxicas, após oxidar as secções o que permite uma melhor preservacão do tecido (Kitajima, 1983).

Os experimentos de imunomarcacão com anticorpo produzido contra preparacões semi-purificadas de SYBV (Martins, C.R.F., dados não publicados) demonstraram a natureza viral das partículas, apesar do baixo título do mesmo, e da esperada reacão com componentes normais da célula. A absorcão do anti-soro com suco de planta sadia e uso de diluicões maiores asseguraram a especificidade, e assim contribuiu para demonstrar cabalmente que as partículas baciliformes contidas nos elementos do retículo endoplasmático são as dos vírus, e que as massas de material filamentososo em suas proximidades, representam nucleocapsídeos.

1.4. Ilarvirus

Os ilarvirus tem genoma tripartido contido em partículas de tamanho diferentes, variando de 20 a 32nm, isométricas ou ligeiramente deformadas. Como o vírus do mosaico da alfafa, o processo de infecção a partir dos RNAs é ativado pela proteína capsidal, inclusive com proteínas capsidais de vírus heterólogos (van Vloten-Doting, 1975). Apesar de muito estudados do ponto de vista molecular, há escassez de dados sobre aspectos ultraestruturais (Francki et al., 1975). No caso do BSTV, estudos preliminares de Kitajima & Costa (1969) demonstraram a presença de grande número de presumíveis partículas virais em células infectadas. A natureza viral destas partículas está comprovada pelos presentes resultados de imunomarcção.

A infecção pelo BSTV caracteriza-se por uma fase de intensa manifestação de sintomas, 10-14 dias após a inoculação, e depois há uma recuperação, ficando a planta praticamente assintomática, exceto por folhas mais afiladas e quando ocorre a floração, corolas partidas (Costa & Carvalho, 1961). Nas plantas recuperadas, o título do vírus é praticamente nulo, não havendo explicações satisfatórias para o fato. Um seguimento sequencial de plantas inoculadas com imunomarcção *in situ*, acompanhado de métodos moleculares de detecção do ácido nucleico viral poderia fornecer alguns dados adicionais para a compreensão deste fenômeno.

1.5. Tobravirus

A imunomarcção específica das partículas que se associam perpendicularmente às mitocôndrias, encontradas em tecidos de bico-de-tucano e outras hospedeiras que se infectaram experimentalmente com este isolado do PRSV, com anticorpos contra sua proteína capsidal demonstra que tais partículas efetivamente representam o PepRSV. Embora a semelhança morfológica entre estas partículas e aquelas presentes em preparações purificadas levassem a esta suposição (Harrison & Roberts, 1968; Kitajima & Costa, 1969), a imunomarcção *in situ* representa uma forte evidência para tal identificação.

1.6. Potexvirus

Potexvirus ocorrem em alta concentração nos tecidos infectados induzindo massas fibrosas de proporções avantajadas no citoplasma, e que sempre foram tidas como sendo agregados frouxos de partículas de vírus. O presente estudo imunocitoquímico com o CsCMV, um membro dos potexvirus, vem reforçar esta suposição, pois seu anticorpo marcou especificamente tais massas. Resultados similares haviam sido relatados em tecidos de fumo, infectados pelo vírus X da batata (PVX) (Hosokawa & Watanabe, 1988a).

1.7. Tymovirus

Os ensaios sorológicos com vários membros dos tymovirus já conhecidos, não deixam dúvidas de que tanto PYMV como EMV-T são efetivamente participantes deste grupo (Crestani, 1984; Ribeiro, 1988). Seus efeitos citopáticos também enquadram-se àqueles descritos para os tymovirus, especialmente as vesículas periféricas nos cloroplastos, e a abundância de presumíveis partículas virais no citoplasma e no vacúolo (Lesemann, 1977). Presumíveis vírus de alguns tymovirus foram detectados no núcleo, mas isto não foi constatado com estes dois vírus (Crestani, 1984; Ribeiro, 1988).

A imunomarcacão *in situ* do PYMV e EMV-T com os respectivos anti-soros policlonais indicaram a presença abundante de antígenos no citoplasma e no vacúolo, especialmente sobre as massas de presumíveis virions, o que confirma sua natureza viral. Houve marcação também no nucleoplasma, apesar da ausência de virions visíveis, o que permite inferir que proteínas capsidais migram para o núcleo. Isto talvez represente uma peculiaridade comum a todos os tymovirus, sendo que em alguns casos, chegaria mesmo a ocorrer montagem das partículas (Lesermann, 1977), ficando para ser averiguado se conteriam ou não vRNA. A presença de proteínas capsidais do EMV-T no núcleo já havia sido notada, através de imunomarcacão, por Ribeiro (1988). Resta assim esclarecer um interessante fenômeno que é o da migração da proteína capsidal para o núcleo, se isto seria mediado por proteínas do tipo "chaperone" e qual o seu significado biológico.

1.8. Comentários gerais

Em todos os ensaios de imunomarcacão *in situ* de antígenos virais, em geral proteínas capsidais, mas em alguns casos, contra proteínas não estruturais, houve deteco precisa dos antígenos em estudo. Certamente há vários fatores que podem interferir numa marcao específica: qualidade do anti-soro, preservao do tecido, uso de resinas adequadas para emblocamento, condioes e tempo de reao, uso de bloqueadores apropriados para evitar reaoes não específicas, contrastao, etc., e que devem ser pesquisados com antecedência. O protocolo usado nos experimentos descritos baseou-se essencialmente naquele apresentado por van Lent et al. (1990a) e testado exaustivamente nos trabalhos com os tospovirus (Kitajima et al., 1992), que foi modificado em pequenos pontos em alguns experimentos, e como acima discutido, mostrou-se bastante consistente. Embora não houvessem sido feitos estudos comparativos, a resina LRGold, polimerizada  baixa temperatura, parece preservar muito bem os sítios antigênicos e permitir seu acesso aos anticorpos. Talvez resultados melhores, especialmente quando se trabalha com antígenos que ocorrem em pequena quantidade, possam ser obtidos se se utilizar crio-ultramicrotomia, no caso presente de antígenos virais que ocorrem em grande quantidade, o protocolo aqui usado é mais do que suficiente. Este método, contudo, é demorado; especialmente o processo de desidratao, inclusão e polimerizao, requerendo praticamente 1 semana, a partir da fixao até obter o bloco em ponto de corte. Westcot e colaboradores (1993) propuseram um protocolo mais rápido,

especialmente para os tospovirus, que parece promissor, mas não houve tempo de ser testado neste presente trabalho.

2. HIBRIDIZAÇÃO *in situ*

A imunocitoquímica permite detectar adequadamente proteínas de natureza variada, desde que se disponha do anticorpo apropriado. No caso de infecção viral pode-se assim localizar proteínas estruturais ou não estruturais, mas não se pode precisar a localização de seu ácido nucleico, encapsidado ou não. A situação se complica mais no caso de viróides, que não são dotados de proteína envoltória. A introdução recente de técnicas de hibridização *in situ* veio resolver alguns destes problemas, desde que se disponha de sondas com sequências complementares e marcadas para permitir sua localização.

Este processo, empregado para detectar os RNAs do ASBVd permitiu sua localização preferencial nos cloroplastos, com alguma marcação em menor escala no citoplasma, a julgar pelos controles. Dados similares foram obtidos por um grupo australiano (Bonfiglioli, com. pess.). Os dados de certa maneira estão de acordo com aqueles relatados por Mohamed & Thomas (1980) e refinados por Marcos & Flores (1990), usando fracionamento celular, quando observaram que as frações citoplasmática e de cloroplastos eram as infecciosas, em contraposição com a nuclear, no caso do PSTVd (Schumacher et al., 1983) e "coconut cadang-cadang viroid"-CCCVd (Bonfiglioli, com.pess.). Atribuíram eles, contudo, à infectividade da fração do cloroplasto à possível adsorção dos viróides na organela.

Este ponto de vista deve ser considerado, pois os dados do presente trabalho indicam que a maioria dos sinais procedem dos cloroplastos (ca.80%), ficando cerca de 10% no citoplasma. Isto sugere que há acúmulo do ASBVd no cloroplasto, e possivelmente sua replicação. A favor deste último aspecto estão os dados de Marcos & Flores (1992) que verificaram ser a replicação do ASBVd insensível à ação da alfa-amanitina. Esta droga normalmente inibe a polimerase 2, e afeta a infecção de viróides que se localizam e replicam no núcleo como PSTVd, e em contrapartida, a polimerase 2 de cloroplastos é insensível a ela (Bottomley et al., 1971 a,b). Isto reduz a possibilidade de o ASBVd ser replicado no núcleo e, rapidamente, translocado para o cloroplasto onde se acumularia, e favorece a tese de que a sua replicação dar-se-ia nos cloroplastos. A marcação residual no citoplasma seria o resultado do tráfego do ASBVd ou eventual liberação dos cloroplastos que se danificam. O envolvimento do cloroplasto no processo de infecção pelo ASBVd já foi sugerido em um trabalho morfológico de da Graça & Martin (1981) que observaram um aumento de volume e desorganização no sistema lamelar dos cloroplastos. No presente estudo, dados morfométricos sugerem que há praticamente uma duplicação no volume dos cloroplastos (Tabelas 4 e 5).

Se confirmada a replicação do ASBVd e dada sua propriedade de ribozoma (Marcos & Flores, 1992), isto traz a tona a intrigante possibilidade de que bactérias fotossintetizantes possam ter sido a ligação entre alguns RNAs do tipo viróide ancestrais, remanescentes da vida pré-celular (Diener, 1989; Elena et al., 1991) com "modernos" viróides como o ASBVd. Tal

idéia será fortalecida se se demonstrar que um outro viróide recém descoberto, "peach latent mosaic viroid"-PLMVd (Hernández & Flores, 1992) com propriedades auto-catalíticas, e candidato ao mesmo subgrupo taxonômico do ASBVd, também tenha localização no cloroplasto.

V. RESUMO

"IMUNOCITOQUÍMICA E HIBRIDIZAÇÃO *in situ* NA MICROSCOPIA ELETRÔNICA - METODOLOGIA COMPLEMENTAR NA CARACTERIZAÇÃO DE VÍRUS E VIRÓIDES"

A virologia foi, provavelmente, um dos campos que mais se beneficiou com a introdução do microscópio eletrônico como ferramenta de pesquisa. A microscopia eletrônica desempenha um importante papel na caracterização dos vírus, fornecendo dados sobre a morfologia das partículas e citopatologia. Estes dados podem contribuir para complementar a caracterização viral e consolidar a taxonomia dos mesmos, além de ser um importante auxiliar na diagnose da doença. Estes benefícios da microscopia eletrônica se estendem naturalmente à virologia vegetal.

Tecidos de plantas infectados por vírus, quando observados ao microscópio eletrônico, podem apresentar efeitos citopáticos típicos que geralmente incluem o aparecimento dos corpúsculos de inclusão. Estas inclusões podem ser formadas por partículas virais ou estruturas induzidas pela infecção viral, presentes no citoplasma ou núcleo das células infectadas. No citoplasma, estas inclusões podem estar representadas por partículas virais, proteínas não estruturais ou alterações celulares, ou mesmo uma mescla de todos eles. No núcleo, as inclusões podem estar relacionadas com o nucléolo, presentes no nucleoplasma ou espaço perinuclear.

Contudo, diversas são as limitações das técnicas convencionais e histologia ultraestrutural para se identificar de forma inequívoca os vírions, a natureza de certas inclusões ou

mesmo a localização de ácidos nucleicos envolvidos no processo da infecção viral.

Diante destes aspectos, técnicas auxiliares como a imunocitoquímica e a hibridização *in situ* muitas vezes podem ser capazes de solucionar estes problemas. A imunocitoquímica tem por finalidade localizar proteínas através da identificação de sítios onde se dá a reação antígeno-anticorpo e sua visualização através de um marcador - o ouro coloidal. Já a hibridização *in situ*, consiste no fenômeno do pareamento de bases entre dois ácidos nucleicos complementares, um dos quais se acha marcado e funciona como sonda molecular.

Este trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo básico para imunocitoquímica e hibridização *in situ* de vírus e viróides de plantas, respectivamente em nossas condições. Os resultados de ensaios imunocitoquímicos com vírus pertencentes aos grupos tospovirus, potyvirus, rhabdovirus, ilarvirus, tobnavirus, tymovirus e potexvirus permitiram a detecção dos antígenos de proteínas estruturais e não estruturais destes vírus demonstrando a consistência do método. A detecção de ácidos nucleicos pela hibridização *in situ* permitiu a localização de RNAs do "avocado sunblotch viroid"-ASBVd nos cloroplastos indicando a probabilidade de ser este o sítio de replicação deste viróide.

VI. ABSTRACT

"IMMUNOCYTOCHEMISTRY AND *in situ* HYBRIDIZATION IN ELECTRON MICROSCOPY - COMPLEMENTARY METHODS IN VIRUS AND VIROIDS CHARACTERIZATION"

Virology was one of the area of biological sciences most benefited by the introduction of the electron microscopy as a research tool. Electron microscopy has an important role in virus characterization, providing informations on particle morphology and cytopatology. These data can help to complement viral characterization, orient their taxonomy, and on the practical aspects contributing to the disease diagnosis. In this context, plant virology was also strongly formed by electron microscopy during progress.

Virus infected plant tissues observed in electron microscopy may present typical cytopathic effects among which the common is the appearance of inclusion bodies. These inclusions can be formed by viral particles or structures produced by the viral infection, and be present in the infected cells cytoplasm or nucleus. These inclusions present in the cytoplasm can be viral particles, non structural proteins or cellular modifications or even a mixture of them. In the nucleus, these inclusions can be related to the nucleolus, present in the nucleoplasm or in the perinuclear space.

However, the conventional ultrastructural procedures have several limitations to identify virions and the nature of inclusions and to identify and localize virus related nucleic acids.

Considering these limitations, complementary techniques as immunocytochemistry and *in situ* hybridization has been developed to solve part of these problems. The aim of immunocytochemistry is the localization of viral proteins detected by specific antibodies, and the sites of antigen-antibody reaction are visualized by colloidal gold particles used as markers. The *in situ* hybridization consists in the detection of a given nucleic acid by its pairing with a complementary strand (molecular probe), labelled such way that it can be traced indirectly with a colloidal gold traced marker.

The aim of the present studie was to establish a basic protocol to apply immunocytochemistry and *in situ* higridization of plants virus and viroids, respectively under our conditions. Immunoctytochemical assays were caried out with representatives of tospovirus, potyvirus, rhabdovirus, ilarvirus, tobnavirus, tymovirus and potexvirus groups and permitted thus detection of either structural and non structural viral proteins demonstrating the sensibility of the method employed. On the the other hand, *in situ* hybridization enabled the localization of the avocado sunblotch viroid-ASBVd RNAs in the cloroplast indicating that this organele may be the replication site of this viroid.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ammar, E.D., Gingery, R.E. & Nault, L.R. (1985). Two types of inclusions in maize infected with maize stripe virus. **Phytopathology** 75, 84-89.
- Ausubel, F.M., Brant, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (1988). **Current Protocols in Molecular Biology**. Wiley Interscience, USA.
- Bassi, M. & Favali, M.A. (1972). Electron microscopy of maize rough dwarf virus assembly sites in maize. Cytochemical and autoradiographic observations. **J. Gen. Virol.** 16, 153-160.
- Bassi, M., Favali, M.A. & Conti, G.G. (1974). Cell wall protrusions induced by cauliflower mosaic virus in chinese cabbage leaves: A cytochemical and autoradiographic study. **Virology** 60, 353-358.
- Baunoch, D.A., Das, P. & Hari, V. (1990). Potato virus Y helper component protein is associated with amorphous inclusions. **J. Gen. Virol.** 71, 2479-2482.
- Baunoch, D.A., Das, P., Browning, M.E. & Hari, V. (1991). A temporal study of the expression of the capsid, cytoplasmic inclusion and nuclear inclusion proteins of tobacco etch potyvirus in infected plants. **J. Gen. Virol.** 72, 487-492.
- Bertuol, L., Barros, T.S.L. & Kitajima, E.W. (1992). Purificação, produção de anti-soros e caracterização da proteína capsidial de alguns vírus de plantas. **2o Seminário de Pesquisa da UnB- Graduação e Pós Graduação**. (resumo).
- Black, L., Morgan, C. & Wycoff, R. (1950). Visualization of tobacco mosaic virus. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 73, 119-122.

- Borges, M.L.V. (1976). **Aspéctos da ultraestrutura das células de espermatófitas com vírus. Curso de atualização e extensão universitária - Soc. Port. Ciênc. Nat., Lisboa.**
- Bottomley, W., Smith, H.J. & Bogorad, L. (1971a). RNA polymerase of maize: partial purification and properties of the chloroplast enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 2412-2416.**
- Bottomley, W., Spencer, D., Wheeler, A. & Whitefield, P.R. (1971b). The effect of a range of RNA polymerase inhibitors on synthesis in higher plant chloroplasts and nuclei. **Arch. Bioch. Bioph. 143, 269-275.**
- Brakke, M.K., Ball, E.M., Hsu, Y.H. & Langenberg, W.G. (1987). Wheat streak mosaic virus cylindrical inclusion body protein. **J. Gen. Virol. 68, 281-287.**
- Brunt, A.A. & Kitajima, E.W. (1973). Intracellular location and some properties of Mirabilis mosaic virus, a new member of the cauliflower mosaic group of viruses. **Phytopathol. Z. 76, 265-275.**
- Conti, M. & Apiano, A. (1973). Barley yellow striate mosaic virus and associated viroplasms in barley cells. **J. Gen. Virol. 21, 315-322.**
- Costa, A.S. & Carvalho, A.M.B. (1961). Studies on brazilian tobacco streak. **Phytopathol. Z. 42, 113-138.**
- Costa, A.S. & Kitajima, E.W. (1972). Cassava common mosaic virus. **CMI/AAB Description of Plant Viruses 90.**
- Crestani, D.A. (1984). Caracterização do vírus do mosaico amarelo do maracujá. **Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília.**

- Crestani, D.A., Kitajima, E.W., Lin, M.T., Marinho, V.L.A. & Pimentel, J.P. (1984). Uma nova virose em maracujazeiro-mosaico amarelo- causada por um tymovirus. **Fitopatologia Brasileira 9**, 394.
- Cupertino, F.P., De Sá, P.B. & Kitajima, E.W. (1991). Propriedades biológicas de um isolado do vírus do anel do pimentão causando faixa amarela em tomates no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira 16**, 251-256.
- da Graça, J.V. & Martin, M.M. (1981). Ultrastructural changes in avocado leaf tissue infected with avocado sunblotch. **Phytopathol. Z. 101**, 185-194.
- Das, P. & Hari, V. (1992). Intracelular distribution of the 126K/183K and capsid proteins in cells infected by some tobamovirus. **J. Gen. Virol. 73**, 3039-3043.
- de Ávila, A.C., Huguenot, C., Resende, R.O., Kitajima, E.W., Golgbach, R.W. & Peters, D. (1990). Serological differentiation of 20 isolates of tomato spotted wilt virus. **J. Gen. Virol. 71**, 2801-2807.
- de Ávila, A.C., Haan, P., Kormelink, R., Resende, R.O., Goldbach, R.W. & Peters, D. (1993). Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. **J. Gen. Virol. 74**, 153-159.
- de Souza, W. (1993). Imunocitoquímica. In **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica**, pp. 9-33. Editado por W. Souza. Rio de Janeiro: Sociedade brasileira de microscopia eletrônica.
- de Zoeten, G.A., Gaard, G. & Diez, F.B. (1972). Nuclear vesiculation associated with pea enation mosaic virus-infected

- plant. **Virology** **48**, 638-647.
- Diener, T.O. (1989). Circular RNAs: relics of precellular evolution? **Proc. Natl. Ac. Sci. U.S.A.** **86**, 9370-9374.
- Dougherty, W.G. & Hiebert, E. (1980). Translation of potyvirus RNA in rabbit reticulocyte lysate: identification of nuclear inclusion proteins as products of tobacco etch virus RNA translation and cylindrical inclusion protein as a product of the potyvirus genome. **Virology** **104**, 174-182.
- Edwardson, J.R. (1966). Electron microscopy of cytoplasmic inclusions in cells infected with rod-shaped viruses. **Am. J. Bot.** **53**, 359-364.
- Edwardson, J.R. (1974). Host ranges of viruses in the PVY-group. **Fla. Agric. Expt. Stn. Monogr. Ser.** **4**, 398pp.
- Edwardson, J.R., Purcifull, D.E. & Christie, R.G. (1968). Structure of cytoplasmic inclusions in plants infected with rod-shaped viruses. **Virology** **34**, 250-263.
- Edwardson, J.R., Christie, R.G. & Ko, N.J. (1984). Potyvirus cylindrical inclusions - subdivision-IV. **Phytopathology** **74**, 1111-1114.
- Elena, S.F., Dopazo, J., Flores, R., Diener, T.O. & Moya, A. (1991). Phylogeny of viroids, viroid-like satellite RNAs, and the viroidlike domain of hepatitis δ virus RNA. **Proc. Natl. Ac. Sci. U.S.A.** **88**, 5631-5634.
- Esau, K. & Cronshaw, J. (1967). Relation of tobacco mosaic virus with host cells. **J. Cell Biol.** **33**, 665-678.
- Esau, K. & Hoefert, L.L. (1972a). Ultrastructure of sugarbeet leaves infected with beet western yellows virus. **J. Ultrastruct. Res.** **40**, 556-571.

- Esau, K. & Hoefert, L.L. (1972b). Development of infection with beet western yellows virus in the sugarbeet. **Virology** 48, 724-734.
- Esau, K. & Hoefert, L.L. (1973). Particles and associated inclusions in sugarbeet infected with the curly top virus. **Virology** 56, 454-464.
- Espinoza, A.M., Hernández, M., Pereira, R., Falk, B. & Medina, V. (1992). In situ Immunogold labeling analysis of the rice hoja blanca virus nucleoprotein and major noncapsid protein. **Virology** 191, 619-627.
- Espinoza, A.M., Pereira, R., Macaya-Lizano, A.V., Hernández, M., Goulden, M. & Rivera, C. (1993). Comparative light and electron microscopic analyses of tenuivirus major noncapsid protein (NCP) inclusion bodies in infected plants, and of the NCP in vitro. **Virology** 195, 156-166.
- Faria, M.L., Almeida, A.M.R., Bianchini, A., Chagas, C.M. & Bairrão, J.M. (1990). 23o Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Goiânia. (resumo).
- Francki, R.I.B. (1973). Plant rhabdoviruses. **Adv. Virus Res.** 18, 257-345.
- Francki, R.I.B., Milne, R.G. & Hatta, T. (1985). Atlas of plant viruses. Boca Raton: CRC Press.
- Garnier, M., Candresse, T. & Bove, J.M. (1986). Immunocytochemical localization of TYMV-coded structural and nonstructural proteins by the protein A-gold technique. **Virology** 151, 100-109.
- Gildow, F.E. (1993). Evidence for receptor-mediated endocytosis regulating luteovirus acquisition by aphids. **Phytopathology**

- Goodman, S.L., Hodges, G.M., Trejdosiewicz, L.K. & Livingston, D.C. (1981). Colloidal gold markers and probes for routine application. *J. Microsc.* **123**, 201-213.
- Guilley, H., Richards, K.E. & Jonard, G. (1983). Observations concerning the discontinuous DNAs of cauliflower mosaic virus. *EMBO J.* **2**, 277-282.
- Harrison, B.D. & Roberts, I.M. (1968). Association of tobacco rattle virus with mitochondria. *J. Gen. Virol.* **3**, 121-124.
- Harrison, B.D., Stefanac, Z. & Roberts, I.M. (1970). Role of mitochondria in the formation of X-bodies in cells of *Nicotiana clevelandii* infected by tobacco rattle viruses. *J. Gen. Virol.* **6**, 127-140.
- Hatta, T. (1976). Recognition and measurement of small isometric virus particles in thin sections. *Virology* **69**, 237-245.
- Hatta, T. & Ushiyama, R. (1973). Mitochondrial vesiculation associated with cucumber green mottle mosaic virus-infected plants. *J. Gen. Virol.* **21**, 9-17.
- Hiebert, E. & McDonald, J.G. (1973). Characterization of some proteins associated with viruses in the potato Y group. *Virology* **56**, 349-361.
- Hills, G.J., Plaskitt, K.A., Young, N.D., Dunigan, D.D., Watts, J.W., Wilson, T.M.A. & Zaitlin, M. (1987). Immunogold localization of the intracellular sites of structural and nonstructural tobacco mosaic virus proteins. *Virology* **161**, 488-496.
- Hosokawa, D. & Watanabe, M. (1988a). Ultrastructural localization of viral antigen in tobacco cells infected with potato virus X

- by protein A-gold technique. *Ann. Phytopathol. Soc. Jan.* **54**, 557-564.
- Hosokawa, D. & Watanabe, M. (1988b). Ultrastructural localization of viral antigen in tobacco cells infected with cucumber mosaic virus by protein A-gold technique. *Ann. Phytopathol. Soc. Jan.* **54**, 620-624.
- Hosokawa, D., Kobayashi, K. & Horikoshi, M. (1992). Immunogold localization of coat protein and 3a protein of brome mosaic virus in infected barley cells. *Ann. Phytopathol. Soc. Jan.* **58**, 773-779.
- Hosokawa, D., Watanabe, Y. & Okada, Y. (1993). Time course analysis of immunolocalization of coat protein and replicase proteins in protoplasts inoculated with tobacco mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jan.* **59**, 143-154.
- Hull, R. & Covey, S.N. (1983). Does cauliflower mosaic virus replicate by reverse transcription? *Trends Bioch. Sci.* **8**, 119-121.
- Kim, K.S. (1977). An ultrastructural study of inclusions and disease development in plant cells infected by cowpea chlorotic mottle virus. *J. Gen. Virol.* **35**, 535-543.
- Kim, K.S. & Fulton, J.P. (1973). Plant virus-induced cell wall overgrowth and associated membrane elaboration. *J. Ultrastruc. Res.* **45**, 328-342.
- Kitajima, E.W. (1977). The possibilities of the use of the electron microscope in helping the diagnosis of plant virus diseases. *Tropical Agriculture Research Series* **10**, 197-199.
- Kitajima, E.W. & Costa, A.S. (1969). Association of pepper ringspot virus (brazilian tobacco rattle virus) and host cell

mitochondria. *J. Gen. Virol.* **4**, 177-181.

Kitajima, E.W., Lauritis, J.A. & Swift, H. (1969). Fine structure of zinnia leaf tissues infected with dahlia mosaic virus. *Virology* **39**, 240-249.

Kitajima, E.W. & Galves, G.E. (1973). Flexuous, threadlike particles in leaf cells of *Echinochloa colonum* infected with rice hoja blanca virus. *Ciência e Cultura* **25**, 979-982.

Kitajima, E.W. & Costa, A.S. (1978). The fine structure of the intranuclear, fibrous inclusions associated with the infection by celery yellow mosaic virus. *Fitopatologia Brasileira* **3**, 287-293.

Kitajima, E.W. & Costa, A.S. (1986). Observações preliminares sobre a ultraestrutura da infecção pelo vírus da necrose branca do fumo ("brazilian tobacco streak virus"). **19o Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Brasília.** (resumo).

Kitajima, E.W., Martins, C.R.F., Lima, M.I. & Oliveira, L.H. (1991a). Faixa amarela das folhas de bico-de-tucano (*Columnnea* sp., *Generiaceae*) associada ao vírus do anel-do-pimentão. **24o Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Rio de Janeiro.** (resumo).

Kitajima, E.W., Martins, C.R.F., Lima, M.I. & Lovato, F.A. (1991b). Natural infection of *Bidens pilosus* by a rhabdovirus related to sowthistle yellow vein virus. **24o Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Rio de Janeiro.** (resumo).

Kitajima, E.W. & Quiroz, S. (1991). A geminivirus and potyvirus associated with "colocha" disease of tomato in Honduras. **24o Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Rio de Janeiro.** (resumo).

- Kitajima, E.W., de Ávila, A.C., Resende, R.O., Goldbach, R.W. & Peters, D. (1992). Comparative cytological and immunogold labelling studies on different isolates of tomato spotted wilt virus. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **24**, 1- 14.
- Kitajima, E.W. & Martins, C.R.F. (1993). Identification of a rhabdovirus in soursop (*Annona muricata*). *Plant Disease* **77**, 276-278.
- Kormelink, R., Kitajima, E.W., de Haam, P., Zuidema, D., Peters, D. & Goldbach, R. (1991). The nonstructural protein (NSs) encoded by the ambisense S RNA segment of tomato spotted wilt virus is associated with fibrous structures in infected plant cells. *Virology* **181**, 459-468.
- Kuhn, G., Lin, M.T. & Costa, C.L. (1980). Transmissão, círculo de hospedeiras e sintomatologia do vírus do mosaico do picão. *Fitopatologia Brasileira* **5**, 36-50.
- Lafleche, D., Bové, C., Mouches, C., Astier, T., Garnier, M. & Bové, J.M. (1972). Site of viral RNA replicaton in the cells of higher plants. TYMV (turnip yellow mosaic virus)- RNA synthesis on the chloroplasts outer membrane system. *Proc. Fed. Eur. Biochem. Soc.* **72**, 43-71.
- Langenberg, W.G. & Schroeder, H.F. (1975). The ultrastructural appearance of cowpea mosaic virus in cowpea. *J. Ultrastruc. Res.* **51**, 166-175.
- Langenberg, W.G. (1986). Virus protein association with cylindrical inclusions of two viruses that infect wheat. *J. Gen. Virol.* **67**, 1161-1168.
- Langenberg, W.G. (1988). Barley stripe mosaic virus but not brome mosaic virus binds to wheat streak mosaic virus cylindrical

- inclusions *in vivo*. **Phytopathology** **78**, 589-594.
- Langenberg, W.G. (1991). Cylindrical inclusion bodies of wheat streak mosaic virus and three other potyviruses only self-assemble in mixed infections. **J. Gen. Virol.** **72**, 493-497.
- Lawson, R.H. & Hearon, S.S. (1973). Ultrastructure of carnation etched ring virus-infected **Saponaria vaccaria** and **Dianthus caryophyllus**. **J. Ultrastruc. Res.** **48**, 201-207.
- Lesemann, D.-E. (1977). Virus group-specific and virus-specific cytological alterations induced by members of the tymovirus group. **Phytopathol. Z.** **90**, 315-336.
- Liu, D.H., Robinson, D.J., Duncan, G.H. & Harrison, B.D. (1991). Nuclear location of the 16K non-structural protein of tobacco rattle virus. **J. Gen. Virol.** **72**, 1811-1817.
- Lockhart, B.E.L. (1990). Evidence for a double-stranded circular DNA genome in a second group of a plant viruses. **Phytopathology** **80**, 127-131.
- Lopez, J.F.M. (1991). Estudios sobre la localización subcelular y el mecanismo de replicación del viroide del manchado solar del aguacate. **Dissertação de Doutorado, Universidade de Valência, Espanha.**
- Mackenzie, D.J. & Tremaine, J.H. (1988). Ultrastructural location of non-structural protein 3A of cucumber mosaic virus in infected tissue using monoclonal antibodies to a cloned chimeric fusion protein. **J. Gen. Virol.** **69**, 2387- 2395.
- Marcos, J.F. & Flores, R. (1990). Subcellular location of avocado sunblotch viroid in avocado leaves. **Plant Science** **67**, 237-244.
- Marcos, J.F. & Flores, R. (1992). Characterization of RNA specific to avocado sunblotch viroid synthesized *in vitro* by a

- cell-free system from infected avocado leaves. **Virology** 186, 481-488.
- Martelli, G.P. & Russo, M. (1977). Plant virus inclusions bodies. **Adv. Virus Res.** 21, 175-266.
- Martín, M.T., García, J.A., Cervera, M.T., Goldbach, R.W. & van Lent, J.W.M. (1992). Intracellular localization of three non-structural plum pox potyvirus proteins by immunogold labelling. **Virus Research** 25, 201-211.
- Martins, C.R.F., de Ávila, A.C. & Kitajima, E.W. (1993). Purificação de nucleocapsídeos do rhabdovirus da mancha amarela da gravioleira. **Viroológica** 93, PD-4-01, p.368. (resumo).
- Martins, C.R.F. & Kitajima, E.W. (1993). Purificação parcial e caracterização das proteínas estruturais do rhabdovirus da mancha amarela da gravioleira. **XXVI Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Aracaju.** (resumo).
- Mathews, R.E.F. (1991). Plant virology. London: Academic Press.
- Matsui, C. & Yamaguchi, A. (1964). Electron microscopy of host cells infected with tobacco etch virus. I. Fine structures of leaf cells at later stages of infection. **Virology** 22, 40-47.
- Matsui, C. & Yamaguchi, A. (1966). Some aspects of plant viruses *in situ*. **Adv. Virus Res.** 12, 127-174.
- Mazzolini, L., Bonneville, J.M., Volovitch, M., Magazin, M. & Yot, P. (1985). Strand-specific viral DNA synthesis in purified viroplasms isolated from turnip leaves infected with cauliflower mosaic virus. **Virology** 145, 293-303.
- Mcfadden, G.I. (1991). *In situ* hybridization techniques: molecular cytology goes ultrastructural. In **Electron**

- microscopy of plant cells**, pp. 219-255. Edited by J.L. Hall and C. Hawes. London: Academic Press.
- Meshi, T., Hosokawa, D, Kawagishi, M., Watanabe, Y. & Okada, Y. (1992). Reinvestigation of intracellular localization of the 30K protein in tobacco protoplasts infected with tobacco mosaic virus RNA. **Virology** **187**, 809-813.
- Mohamed, N.A. & Thomas, W. (1980). Viroid-like properties of an RNA species associated with the sunblotch disease of avocado. **J. Gen. Virol.** **46**, 157-167.
- Murphy, J.F., Jarlfors, U. & Shaw, J.G. (1991). Development of cylindrical inclusions in potyvirus-infected protoplasts. **Phytopathology** **81**, 371-374.
- Oliveira, M.L. & Kitajima, E.W. (1981). Propriedades biológicas do vírus do mosaico amarelo do salsaão. **Fitopatologia Brasileira** **6**, 35-46.
- Oliveira, M.L., Lin, M.T. & Kitajima, E.W. (1981a). Purificação e sorologia do vírus do mosaico amarelo do salsaão. **Fitopatologia Brasileira** **6**, 57-65.
- Oliveira, M.L., Kitajima, E.W., Ribeiro, M.I.S.D. & Ribeiro, R.L.D. (1981b). Ocorrência do vírus do mosaico amarelo do salsaão no D.Federal e no Est.R.Janeiro. **Fitopatologia Brasileira** **6**, 105-108.
- Park, K. (1989). Factors affecting efficiency of colloidal gold staining: pH-dependent stability of protein-gold conjugates. In **Scanning Microscopy Supplement 3**, pp. 15-25. Edited by . Chicago: AMF O Hare.
- Pease, D. & Baker, R.F. (1948). Sectioning techniques for electron microscopy using a conventional microtome. **Proc. Soc.**

Exptl. Biol. Med. 67, 470-474.

Pfeifler, P. & Hohn, T. (1983). Involvement of reverse transcription in the replication of cauliflower mosaic virus: A detailed model and test of some aspects. **Cell 33, 781-789.**

Pinheiro, D.M. (1993). Purificação e sequência parcial da proteína do capsídeo do vírus do mosaico da berinjela, estirpe fumo. **Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília.**

Purcifull, D.E. & Hiebert, E. (1982). Tobacco etch virus. **CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses 258.**

Purcifull, D.E. & Hiebert, E. (1992). Serological relationships involving potyviral nonstructural proteins. In **Potyvirus Taxonomy**, pp. 97-122. Edited by D.W. Barnet. Springer-Verlag Wien New York.

Ramagem, R.D. (1993). Caracterização de uma estirpe necrótica do vírus do mosaico amarelo do feijoeiro. **Dissertação de Mestrado-Universidade de Brasília.**

Reinke, K.J. & Zoeten, G.A. (1991). In situ localization of plant viral gene products. **Phytopathology 81, 1306-1314.**

Resende, R.O., de Ávila, A.C., Kitajima, E.W., Goldbach, R. & Peters, D. (1991a). Defective isolates of tomato spotted wilt virus. In **Virus-Thrips-Plant Interactions of Tomato Spotted Wilt Virus, Proceedings of a USDA Workshop, Beltsville, Maryland, April 10-19, 1990**, pp. 71-76. Edited by H.T. Hsu & R.H. Lawson. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service.

Resende, R.O., Haan, P., de Ávila, A.C., Kitajima, E.W., Kormelink, R., Goldbach, R. & Peters, D. (1991b). Generation of envelope and defective interfering RNA mutants of tomato

- spotted wilt virus by mechanical passage. *J. Gen. Virol.* **72**, 2375-2383.
- Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **35**, 208-212.
- Ribeiro, S.G. (1988). Caracterização de um tymovirus encontrado em plantação comercial de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) no estado de Santa Catarina. **Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília.**
- Robards, A.W. & Kidwai, P. (1969). Vesicular involvement in differentiating plant vascular cells. *New Phytologist* **68**, 343-349.
- Roberts, I.M. (1989). Indian cassava mosaic virus: ultrastructure of infected cells. *J. Gen. Virol.* **70**, 2729-2739.
- Romano, E.L. & Ron, M. (1984). Historical aspects. In **Colloidal gold: Principles, methods, and applications**, pp. 3-80. Edited by M.A. Hayat. London: Academic Press.
- Saito, T., Hosokawa, D., Meshi, T. & Okada, Y. (1987). Immunocytochemical localization of the 130K and 180K Proteins (putative replicase components) of tobacco mosaic virus. *Virology* **160**, 477-481.
- Schlegel, D.E. & DeLisle, D.E. (1971). Viral protein in early stages of clover yellow mosaic virus infection of *Vicia faba*. *Virology* **45**, 747-754.
- Schumacher, J., Sanger, H.L. & Riesner, D. (1983). Subcellular localization of viroids in highly purified nuclei from tomato leaf tissue. *EMBO J.* **2**, 1549-1555.
- Shalla, T.A. & Shepard, J.F. (1972). The structure and antigenic

- analysis of amorphous inclusion bodies induced by potato virus X. **Virology** 49, 654-667.
- Shepherd, R.J., Wakeman, R.J. & Romanko, R.R. (1968). DNA in cauliflower mosaic virus. **Virology** 36, 150-152.
- Stussi-Garaud, C., Garaud, J.-C., Berna, A. & Godefroy-Colburn, T. (1987). In situ location of an alfalfa mosaic virus non-structural protein in plant cell walls: correlation with virus transport. **J. Gen. Virol.** 68, 1779-1784.
- Suzuki, Y., Fuji, S., Takahashi, Y. & Kojima, M. (1992). Immunogold localization of rice stripe virus particle antigen in thin sections of insect host cells. **Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.** 58, 480-484.
- Tomenius, K., Clapham, D. & Meshi, T. (1987). Localization by immunogold cytochemistry of the virus-coded 30K protein in plasmodesmata of leaves infected with tobacco mosaic virus. **Virology** 160, 363-371.
- Tsao, P.W. (1963). Intracellular inclusion bodies in the leaves of cotton plants infected with leaf crumple virus. **Phytopathology** 53, 243-244.
- Ullman, D.E., Cho, J.J., Mau, R.F.L., Westcot, D.M. & Custer, D.M. (1992). A midgut barrier to tomato spotted wilt virus acquisition by adult western flower thrips. **Phytopathology** 82, 1333-1342.
- Ullman, D.E., German, T.L., Sherwood, J.L., Westcot, D.M. & Cantone, F.A. ((1993). Tospovirus replication in insect vector cells: Immunocytochemical evidence that the nonstructural protein encoded by the S RNA of tomato spotted wilt tospovirus. **Phytopathology** 83, 456-463.

- Urban, L.A., Huang, P.-Y. & Moyer, J.W. (1991). Cytoplasmic inclusions in cells infected with isolates of L and I serogroups of tomato spotted wilt virus. *Phytopathology* **81**, 525-529.
- Ushiyama, R. & Matthews, R.E.F. (1970). The significance of chloroplast abnormalities associated with infection by turnip yellow mosaic virus. *Virology* **42**, 293-303.
- van Lent, J., Groenen, J.T.M., Klinge-Roode, E.C., Rohrmann, R., Zuidema, D. & Vlak, J.M. (1990a). Localization of the 34Kd polyhedral envelope protein in *Spodoptera frugiperda* cells infected with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Arch. Virol.* **111**, 103-114.
- van Lent, J., Wellink, J. & Goldbach, R. (1990b). Evidence for the involvement of the 58K and 48K proteins in the intercellular movement of cowpea mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **71**, 219-223.
- van Lent, J., Storms, M., van der Meer, F., Wellink, J. & Goldbach, R. (1991). Tubular structures involved in movement of cowpea mosaic virus are also formed in infected cowpea protoplasts. *J. Gen. Virol.* **72**, 2615-2623.
- van Vloten-Doting, L. (1975). Coat protein is required for infectivity of tobacco streak virus: biological equivalence of the coat protein of tobacco streak and alfalfa mosaic viruses. *Virology* **65**, 215-220.
- Warmke, H.E. (1968). Fine structure of inclusions formed by the aucuba strain of tobacco mosaic virus. *Virology* **34**, 149-159.
- Warmke, H.E. & Edwardson, J.R. (1966). Electron microscopy of crystalline inclusions of tobacco mosaic virus in leaf tissue.

- Weintraub, M. & Ragetli, H.W.J. (1968). Intracellular characterization of bean yellow mosaic virus-induced inclusions by differential enzyme digestion. *J. Cell Biol.* **38**, 316-320.
- Westcot, D.M., Ullman, D.E., Sherwood, J.L., Cantone, F.A. & German T.L. (1993). Rapid fixation and embedding method for immunocytochemical studies of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV) in plant and insect tissues. *Microsc. Res. Tech.* **24**, 514-520.
- Wijkamp, I., van Lent, J., Kormelink, R., Goldbach, R. & Peters, D. (1993). Multiplication of tomato spotted wilt virus in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *J. Gen. Virol.* **74**, 341-349.
- Willison, J.H.M. (1976). The hexagonal lattice spacing of intracellular crystalline tobacco mosaic virus. *J. Ultrastruc. Res.* **54**, 176-182.
- Yokoyama, M., Ogawa, M., Nozu, Y. & Hashimoto, J. (1990). Detection of specific RNAs by *in situ* hybridization in plant protoplasts. *Plant Cell Physiol.* **31**, 403-406.