

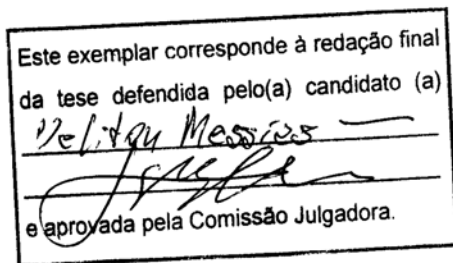
SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

UELITON MESSIAS

**Atividade da superóxido dismutase, catalase, peroxidases
e acúmulo de H_2O_2 associados à infecção de um Carlavirus
em soja e um Potyvirus no feijoeiro**



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

Orientador: Prof. Dr. Jorge Vega

Campinas, 2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

M563a

Messias, Ueliton

Atividade da superóxido dismutase, catalase, peroxidases e acúmulo de H_2O_2 associados à infecção de um Carlavirus em soja e um Potyvirus no feijoeiro / Ueliton Messias. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Jorge Vega.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Estresse oxidativo. 2. Vírus de plantas. 3. Espécies reativas de oxigênio. 4. Lignificação. 5. Relação hospedeiro-vírus. I. Vega, Jorge. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(scs/lb)

Título em inglês: Activity of superoxide dismutase, catalase, peroxidase and accumulation of H_2O_2 associated with the infection of a Carlavirus in soybean and a Potyvirus in bean.

Palavras-chave em inglês: Oxidate stress; Virus of plants; Reactive oxygen species; Lignification; Host-virus relationship.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Doutor em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Jorge Vega, Sérgio Florentino Pascholati, Jorge Alberto Marques Rezende, Claudia Regina Baptista Haddad, Ladaslav Sodek.


Data da defesa: 12/09/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

Campinas, 12 de setembro de 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jorge Vega (Orientador)


Assinatura


Prof. Dr. Ladaslav Sodek


Assinatura

Prof(a). Dr(a). Claudia Regina Baptista Haddad


Assinatura


Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati


Assinatura


Prof. Dr. Jorge Alberto Marques Resende


Assinatura

Prof(a). Dr(a). Marlene Aparecida Schiavinato


Assinatura

Dr. Valdir Atsushi Yuki


Assinatura

Prof(a). Dr(a). Célia Regina Baptista Grassi


Assinatura

*Dedico esta tese a minha esposa Rosana e
ao nosso filho Renan*

Agradecimentos

Ao povo brasileiro que, por intermédio da Unicamp e do CNPq, me concedeu mais esta oportunidade de aperfeiçoamento acadêmico.

A toda minha família, em especial aos meus pais José Expedito e Maria Creuza, aos meus irmãos Douglas e Maiara, a minha esposa Rosana e ao meu filho Renan pela compreensão incondicional e pela amizade de todas as horas.

Ao Professor Jorge Vega pela ciência e paciência na orientação, pela confiança e pelo apoio sempre que necessário durante esses anos, fica registrado minha gratidão.

A todos os professores, funcionários e estudantes, que fazem do Departamento de Fisiologia Vegetal da Unicamp um local favorável para o aprendizado, em especial ao amigo Gilberto Costa Justino.

Ao Dr. Valdir Atsushi Yuki e ao Prof. Jorge Alberto Marques Resende pela disposição em ajudar e colaborar.

Aos professores Ladaslav Sodek, Claudia Regina Baptista Haddad e Sérgio Florentino Pascholati pela análise prévia do trabalho e pelas valiosas sugestões.

Índice

Resumo.....	viii
Summary	x
1. Introdução.....	1
1.1. Interação <i>Glycine max</i> e <i>Cowpea mild mottle virus</i> (CPMMV).....	7
1.2. Interação <i>Phaseolus vulgaris</i> e <i>Cowpea aphid-borne virus</i> (CABMV).....	9
2. Objetivo geral.....	11
2.1. Objetivos específicos.....	11
3. Material e Métodos.....	12
3.1. Material vegetal e CPMMV.....	12
3.2. Material vegetal e CABMV.....	12
3.3. Condições experimentais.....	13
3.4. Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio.....	14
3.5. Atividade da superóxido dismutase	14
3.6. Atividade da catalase	15
3.7. Atividade da ascorbato peroxidase.....	15
3.8. Atividade da guaiacol peroxidase	16
3.9. Atividade da siringaldazina peroxidase	17
3.10. Imuno-localização do CPMMV e do CABMV.....	17
3.11. Localização das peroxidases	18
3.12. Localização da siringaldazina peroxidase.....	19
3.13. Delineamento experimental e análise estatística.....	20
4. Resultados.....	21
4.1. Interação <i>Glycine max</i> e <i>Cowpea mild mottle virus</i> (CPMMV).....	21
4.1.1. Concentração de peróxido de hidrogênio.....	24

4.1.2. Atividade da catalase.....	26
4.1.3. Atividade da ascorbato peroxidase.....	28
4.1.4. Atividade da guaiacol peroxidase.....	30
4.1.5. Atividade da siringaldazina peroxidase.....	32
4.1.6. Imuno-localização do CPMMV.....	34
4.1.7. Localização das peroxidases	39
4.1.8. Localização da siringaldazina peroxidase.....	42
4.2. Interação <i>Phaseolus vulgaris</i> 'BT2' e <i>Cowpea aphid-borne virus</i> (CABMV).....	45
4.2.1. Concentração de peróxido de hidrogênio.....	47
4.2.2. Atividade da superóxido dismutase.....	48
4.2.3. Atividade da catalase	49
4.2.4. Atividade da ascorbato peroxidase.....	50
4.2.5. Atividade da guaiacol peroxidase.....	51
4.2.6. Atividade da siringaldazina peroxidase	52
4.2.7. Imuno-localização do CABMMV.....	53
4.2.8. Localização das peroxidases	56
4.2.9. Localização da siringaldazina peroxidase.....	58
5. Discussão.....	60
5.1. Interação <i>Glycine max</i> e <i>Cowpea mild mottle virus</i> (CPMMV).....	60
5.2. Interação <i>Phaseolus vulgaris</i> 'BT2' e <i>Cowpea aphid-borne virus</i> (CABMV).....	65
6. Considerações finais.....	68
7. Literatura citada.....	70

Resumo

As plantas defendem-se continuamente contra ataques de bactérias, vírus, fungos, invertebrados e de outras plantas. O estresse oxidativo é um tipo de resposta fisiológica da planta após o reconhecimento do patógeno, podendo resultar em sintomas nas plantas dependendo da sensibilidade do hospedeiro, e também relacionada à mecanismos de defesa. Foram analisadas plantas de soja cultivares BRS132 (muito sensível) e IAC17 (pouco sensível) infectadas pelo *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV) e plantas de feijoeiro cultivar BT2 infectado pelo *Cowpea aphid-borne virus* (CABMV). O trabalho teve como objetivos avaliar a concentração de peróxido de hidrogênio, analisar a resposta antioxidante das plantas à infecção viral quanto às variações na atividade da superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, guaiacol peroxidase e siringaldazina peroxidase e verificar as localizações dos vírus e das peroxidases em diferentes tecidos das plantas.

O CPMMV induziu uma doença aguda, com sintomas severos e culminando com a morte da planta de soja 'BRS132'. Na soja 'IAC17', o vírus induziu uma doença crônica com mosaico leve a partir da segunda folha trifoliolada. As concentrações de peróxido de hidrogênio e as atividades da catalase, ascorbato peroxidase, guaiacol peroxidase e siringaldazina peroxidase foram maiores nas plantas infectadas, tanto na soja 'BRS132' como na soja 'IAC17', em relação às plantas saudáveis. O CPMMV foi localizado nos tecidos do pecíolo e do caule, na soja 'BRS132' nas regiões periféricas e medula, e na soja 'IAC17' principalmente nas regiões periféricas.

No feijoeiro cultivar BT2, o CABMV induziu resposta aguda na primeira folha trifoliolada, apresentando sintomas de mosaico, maior rugosidade, lesões necróticas nas nervuras e folíolos "fechados". Nesta cultivar, todos os parâmetros avaliados

foram maiores nas plantas infectadas, exceto a atividade da superóxido dismutase, que apresentou valores similares nas plantas infectadas e nas sadias. O CABMV foi localizado nas regiões periféricas e medula dos tecidos do pecíolo, e no caule a invasão foi limitada à região periférica.

As peroxidases e a siringaldazina peroxidase foram localizadas nas mesmas regiões do pecíolo onde foram detectados o CPMMV e o CABMV.

No feijoeiro 'BT2', a infecção viral induziu uma resposta semelhante à observada na soja 'BRS132', com algumas diferenças relacionadas ao fato de que neste caso, a infecção pelo CABMV não resultou na morte da planta de feijoeiro. Também se observou aumento expressivo de atividade da siringaldazina peroxidase no 7º dia após inoculação, diferente da soja 'BRS132' em que este aumento ocorreu mais tarde. A invasão generalizada dos vírus no pecíolo foi semelhante em feijoeiro 'BT2' e soja 'BRS132', principalmente nos dias em que começou a ocorrer abscisão dos folíolos. Já a invasão do caule foi generalizada em soja 'BRS132' e limitada à região periférica em feijoeiro.

Possivelmente, o aumento precoce de atividade da siringaldazina peroxidase em feijoeiro, já no 7º dia após inoculação, limitou a invasão do vírus aos tecidos periféricos do caule. Isto explicaria o fato de o feijoeiro 'BT2' não sofrer morte da gema apical e da planta.

Summary

Plants defend themselves from attacks of bacteria, fungi, viruses, invertebrate and other plants. Oxidative stress is a kind of physiological response of the plant related to defense mechanisms after recognition the pathogen, which may result in disease symptoms depending on host sensitivity. In this work, plants of two varieties of soybean infected by *Cowpea Mild Mottle Virus* (CPMMV), one highly sensitive (BRS132) and other with low sensitivity (IAC17) to the virus, were analyzed. Also, responses of bean plants (cv. Black Turtle 2, BT2) to *Cowpea Aphid-Borne Mosaic Virus* (CABMV) were examined. The parameters assessed included peroxide content (as hydrogen peroxide, H_2O_2), and activity of the following enzymes: superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, guayacol peroxidase and syringadazine peroxidase. Distribution of virus and peroxidases in different tissues was also examined.

In soybean cv BRS132, CPMMV induced an acute disease with severe symptoms finally resulting in plant death. In the less sensitive soybean cv IAC17, CPMMV induced a chronic disease with mild mosaic which was only visible in the second trifoliate and later leaves. Peroxide content and activity of guayacol and syringaldazine peroxidases were higher in infected plants of both cultivars. The virus was immuno-localized in stem and petiole cross sections, appearing in peripheral tissues and pith in cv BRS132, whereas in cv IAC17 it was localized mainly in the peripheral portion.

In bean cv BT2, CABMV induced a acute response in the first trifoliate leaf, which presented a rough mosaic, necrotic lesions in veins and a “wilted” aspect. In this species all the assessed parameters showed higher values in the infected plants. Only the activity of superoxide dismutase was similar in healthy and infected plants.

The virus was localized in the pith and peripheral tissues of bean petioles, and only in the peripheral region of stems.

Peroxidase and syringaldazine peroxidase activities were localized in the same tissues of the petiole where the CPMMV was localized in soybean plants and CABMV in bean plants.

The response to CABMV observed in bean cv BT2 was similar to the response of soybean BRS132 to CPMMV, with some differences, since in bean the virus infection did not induce plant death. A significant rise in syringadazine activity was detected seven days after inoculation (DAI) in beans, while in soybean this increase occurred one day later. Both species also showed similar pattern of invasion of petiole tissues by the virus, mainly at the moment of abscission of leaflets. However, the virus invasion of stem was generalized in soybean BRS132 and contrastingly, limited to the peripheral tissues in bean.

One possibility is that the early increase in syringaldazine activity observed in bean 7 DAI is indicative of some type of restriction to the spread of the virus, limiting it to the stem peripheral tissues. Probably this restricted spread of the virus in the stem underlies the survival of the apical meristem in bean cv BT2 in contrast to the death of the meristem in soybean cv BRS132.

1. Introdução

As plantas defendem-se continuamente contra ataques de bactérias, vírus, fungos, invertebrados e de outras plantas (Buchanan *et al.* 2000). As interações entre planta-microrganismo têm evidentes efeitos sobre o desenvolvimento da civilização, desde quando os humanos começaram a contar com produtos cultivados para alimentação (Jackson & Taylor, 1996). A doença, que é o tema central da fitopatologia, é resultante da interação entre hospedeiro, agente causal e ambiente. Do ponto de vista fisiopatológico, as interações entre planta e microrganismo são caracterizadas por desordens fisiológicas dos processos vitais da planta.

As investigações científicas de doenças de plantas conhecidas por viroses começaram no início do século XIX (Hull, 2004). Para estudos das propriedades intrínsecas dos vírus, o agente causal do mosaico do fumo (*Tobacco mosaic virus*, TMV), foi usado como modelo porque é estável, apresenta alta concentração na seiva das plantas infectadas e é de fácil transmissão (van der Want & Dijkstra, 2006).

Atualmente, a importância econômica das doenças infecciosas causadas por vírus preocupa os pesquisadores do assunto. Segundo Strange & Scott (2005), muitas das 700 viroses de plantas conhecidas causam prejuízos e estão amplamente distribuídas nos hospedeiros. As interações entre planta e vírus são complexas e envolvem diversos tipos de respostas, que podem ou não causar doenças para o hospedeiro (Soosaar *et al.* 2005).

As reações de incompatibilidade são frequentemente associadas ao aparecimento de lesões necróticas no sítio de entrada do patógeno. Esta resposta da planta ao ataque de patógeno é conhecida como reação de hipersensibilidade, que é caracterizada por restringir o crescimento ou espalhamento do patógeno (Agrios, 2005). Entretanto, quando um microrganismo infecta e se replica em um hospedeiro

produzindo doença, o mesmo é descrito como patógeno e a planta é descrita como suscetível, sendo esta interação chamada de compatível (Soosaar *et al.* 2005).

Em interações compatíveis o sistema de defesa da planta é tardiamente ativado ou não ativado, levando à doença (Resende *et al.* 2003). Plantas infectadas sistemicamente são exemplos de relações compatíveis, cujos sintomas podem variar de acordo com a interação hospedeiro-vírus. As doenças causadas por agentes virais são geralmente reconhecidas através da observação de sintomas. Na infecção sistêmica, o vírus move-se do local de inoculação para outras partes da planta, via sistema vascular (van der Want & Dijkstra, 2006).

As infecções sistêmicas por vírus podem resultar em respostas fisiopatológicas. O estresse oxidativo é um tipo de resposta fisiológica da planta após o reconhecimento do patógeno, podendo resultar em sintomas nas plantas dependendo da sensibilidade do hospedeiro. Em contraste com reações de hipersensibilidade, em interação compatível entre planta-vírus pouco se conhece sobre o envolvimento de espécies reativas de oxigênio no desenvolvimento da patogênese e sintomas nas plantas (Mehdy, 1994; Riedle-Bauer, 2000; Li & Burritt, 2003; Arias, *et al.* 2005).

As espécies reativas de oxigênio (“Reactive Oxygen Species” - ROS), como superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\cdot OH$), são produzidas constantemente como subprodutos de várias vias metabólicas localizadas em diferentes compartimentos celulares (Apel & Hirt, 2004). Em células de plantas as ROS, principalmente o H_2O_2 , são geradas no citosol, cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomas e espaço apoplástico (Mittler, 2002; Navrot *et al.* 2007). As espécies reativas de oxigênio ocorrem normalmente no metabolismo celular, porém, quando acumuladas tornam-se tóxicas (Quan, *et al.* 2008). Recentes

investigações têm revelado que as ROS, especialmente o H_2O_2 , são componentes centrais de sinais de transdução em cascata, envolvidos em adaptações a mudanças ambientais (Neill *et al.* 2002b), as quais ocorrem sob vários estresses bióticos e abióticos (Dat *et al.* 2000; Neill *et al.* 2002a).

O peróxido de hidrogênio tem sido aceito como mensageiro secundário para sinais gerados por meio de ROS, porque tem vida relativamente longa e alta permeabilidade através da membrana (Yang & Poovaiah, 2002). O envolvimento do H_2O_2 na interação planta-patógeno tem sido demonstrado em diversos sistemas planta-vírus (Clarke *et al.* 2002; Diaz-Vivancos *et al.* 2006; Quecini *et al.* 2007). O *Sunflower chlorotic mottle virus* em interação compatível com girassol, provocou aumento nas concentrações de peróxido de hidrogênio na planta com ativação de respostas antioxidantes (Arias *et al.* 2005).

Para minimizar os efeitos do estresse oxidativo, as plantas possuem um complexo sistema antioxidante composto pelas moléculas glutatona e ascorbato (Noctor & Foyer, 1998) e pelas enzimas removedoras de ROS (scavenging), como a superóxido dismutase (Gupta *et al.* 1993), catalase (Feierabend, 2005) e peroxidase (Banci, 1997). As enzimas “scavenging” estão presentes em diversos compartimentos celulares, como peroxissomas e glioxissomas (Buchanan *et al.* 2000), cloroplastos (Nakano & Asada, 1981), parede celular, citosol e vacúolo (Goldberg *et al.* 1983; Asada, 1992). O sistema antioxidante determina o tempo de vida do H_2O_2 nos compartimentos celulares da planta (Foyer & Noctor, 2003).

A superóxido dismutase (E.C 1.15.1.1, SOD) converte O_2^- e HO_2^+ em H_2O_2 e pode estar ligada a um metal. As plantas, normalmente, têm Cu/Zn - SOD no citosol, Cu/Zn e/ou Fe-SOD no cloroplasto e Mn - SOD na mitocôndria (Resende *et al.* 2003).

Tais enzimas são importantes durante o processo de remoção de ROS e na geração de peróxido de hidrogênio.

As catalases (E.C 1.11.1.6, CAT) são enzimas que convertem o H_2O_2 em H_2O e O_2 em plantas e estão presentes nos peroxissomas e glioxissomas (Willekens *et al.* 1997; del Río *et al.* 1998). Estas enzimas são codificadas por famílias multigênicas (Suzuki *et al.* 1995; Frugoli *et al.* 1996). Sendo que as três principais isoformas de catalase são CAT1, CAT2 e CAT3 (Havir *et al.* 1989; Willekens *et al.* 1994). Uma nomenclatura básica dividida em classes tem sido proposta para evitar confusão entre as isoenzimas nas diferentes espécies estudadas: classe 1 é altamente expressa em folhas e remove H_2O_2 produzido durante a fotorespiração; a classe 2 é encontrada em tecidos vasculares; a classe 3 está presente abundantemente em sementes e plantas jovens e sua atividade está relacionada à remoção de H_2O_2 produzido durante a degradação de ácidos graxos no glioxissoma (Dat *et al.* 2000).

As plantas necessitam de mecanismos enzimáticos alternativos à catalase para remoção do H_2O_2 e proteção contra danos oxidativos. As peroxidases participam de inúmeros processos fisiológicos como lignificação, suberização, catabolismo de auxina, tolerância à salinidade, mecanismos de defesa contra patógenos e herbívoros (Hiraga *et al.* 2001). As peroxidases são proteínas heme que catalisam a oxidação de grande variedade de substratos através da reação com peróxido de hidrogênio (Banci, 1997; Yoshida *et al.* 2003).

As peroxidases presentes em eucariontes e procariontes são divididas em três superfamílias, com base na sua estrutura e propriedade catalítica (Hiraga *et al.* 2001). Dentro da terceira superfamília, estão contidas três classes de peroxidases vegetais (Barceló *et al.* 2003). A classe I é constituída de enzimas intracelulares em plantas, bactérias e leveduras, como a citocromo c peroxidase (E.C 1.11.1.5) e

ascorbato peroxidase (E.C 1.11.1.11, APX) de cloroplasto e citosol. A classe II é formada de enzimas extracelulares de fungos e a classe III é constituída por peroxidases (E.C 1.11.1.7, POX) que são secretadas no apoplasto (Hiraga *et al.* 2001).

Segundo Asada (2006), a catalase está ausente no cloroplasto, dessa forma a remoção do H₂O₂ nesta organela é realizada pelo ciclo ascorbato-glutationa, numa reação envolvendo a ascorbato peroxidase. No cloroplasto existem duas diferentes isoenzimas de ascorbato peroxidase, uma localizada nos tilacóides e outra no estroma (Yoshimura *et al.* 2000; Asada, 2006). Além das isoenzimas do cloroplasto, o citosol apresenta uma ascorbato peroxidase que é induzida por alta temperatura (Panchuk *et al.* 2002). Em *Arabidopsis thaliana*, em condições de estresse luminoso, foi demonstrado que a ausência da ascorbato peroxidase removedora de H₂O₂ citosólico ocasionou o colapso do sistema removedor de H₂O₂ do cloroplasto, o aumento na concentração de H₂O₂ e a oxidação de proteínas (Davletova *et al.* 2005).

As peroxidases pertencentes à classe III apresentam uma ampla variedade de substratos, comumente reagindo com compostos que contém grupo hidroxila ligado a anel aromático. Estas peroxidases são denominadas pela sigla POX e apresentam grande número de isoformas. Usualmente, utiliza-se o substrato guaiacol (*o*-metoxi fenol) para se avaliar a atividade das peroxidases totais (Hiraga *et al.* 2001; Mika & Luthje, 2003). A guaiacol peroxidase (GPOX) está localizada no vacúolo, citosol e parede celular, e ausente em organelas celulares como peroxissomas e cloroplastos (Asada, 1992).

Diversos trabalhos têm enfatizado o envolvimento do peróxido de hidrogênio (Olson & Varner, 1993) e de peroxidases (Mcdougall, 1992; Polle *et al.* 1994) no processo de lignificação. As POXs desempenham várias funções na defesa celular

devido a sua participação na lignificação e no metabolismo da parede celular, sendo classificadas por van Loon *et al.* (2006), como proteínas relacionadas à patogênese (proteínas- PR) pertencentes à família PR-9. Catesson *et al.* (1978) (*Apud* Goldberg *et al.* 1983) demonstraram que peroxidases da parede celular apresentavam afinidade especial pelo substrato siringaldazina, até então utilizado em testes histoquímicos. Estudos posteriores sugeriram que a atividade da siringaldazina peroxidase (SPOX) estava relacionada ao processo de lignificação. A oxidação da siringaldazina está envolvida na síntese de lignina e suberina (Christensen *et al.* 1998).

A deposição de ligninas na parede celular é um dos mecanismos que permitiu o desenvolvimento e a adaptação das plantas ao ambiente terrestre (Boudet, 2000). A lignina é um polímero fenólico complexo que confere à planta rigidez mecânica, além de contribuir para a formação de barreiras contra patógenos. Para Vance *et al.* (1980) o processo de lignificação é um mecanismo de resistência a doenças.

O processo de lignificação é observado em muitas espécies de plantas em resposta à infecção por agentes patogênicos tais como fungos, bactérias, nematóides e vírus (Sticher *et al.* 1997). Kimmins & Wuddah (1977) examinaram a resposta de folhas de feijão à infecção por vírus e concluíram que a lignificação ao redor de lesões locais é parte da barreira ao espalhamento do vírus.

As propriedades e a localização da siringaldazina peroxidase foram estudadas por Goldberg *et al.* (1985). Os autores confirmaram a relação da enzima com os estágios finais da biossíntese de ligninas, verificando que a enzima tem alta atividade na parede celular, é estável sob altas temperaturas e apresenta afinidade de 100 a 1000 vezes maior pelo substrato siringaldazina do que pelo guaiacol.

1.1. Interação *Glycine max* e *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV)

A soja (*Glycine max*) é considerada uma importante fonte de proteína e óleo vegetal, tanto para a alimentação humana como animal (Costa, 1996). Atualmente a cultura da soja é o principal produto do agronegócio brasileiro. O país é o segundo maior produtor mundial da oleaginosa, com uma safra de 58,49 milhões de toneladas e uma área plantada de 20,87 milhões de hectares na temporada 2007/2008 (Conab, 2008).

A produtividade e a importância econômica da soja no agronegócio dependem de vários fatores. Entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos em soja, estão as perdas por doenças que são estimadas em cerca de 20% (Almeida *et al.* 2005a).

Diversas viroses afetam a soja, sendo que recentemente tem preocupado pesquisadores e produtores a constatação do vírus causador da necrose da haste, identificado como o *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV), do grupo Carlavirus. O CPMMV apresenta partículas filamentosas, flexuosas, com comprimento de 610-700 nm e diâmetro de 12-15 nm, RNA de fita simples, sentido positivo (Almeida, 2005b).

O CPMMV foi descrito primeiramente em Gana infectando caupi (Brunt & Kenten, 1973), e caracterizado em Israel (Antignus & Cohen, 1987). O mesmo vírus foi reportado infectando soja na Costa do Marfim (Thouvenel *et al.* 1982) e na Tailândia (Iwaki *et al.* 1982). Este último trabalho demonstra a transmissão pela mosca branca *Bemisia tabaci*. No Brasil, a ocorrência de um Carlavirus infectando feijoeiro 'Jalo' e transmitido pela *B. tabaci*, foi comunicada por Costa *et al.* (1983). Este vírus foi posteriormente identificado como o CPMMV (Gaspar *et al.* 1985). No Brasil, até o presente momento apenas soja, caupi e feijoeiro cv. Jalo foram infectados pelo CPMMV (Almeida *et al.* 2005a), e o mesmo foi isolado de campos de

produção de soja causando necrose da haste da soja, por Almeida *et al.* (2005b). Os danos têm sido severos e, dependendo da variedade, as plantas infectadas apresentam paralisação do crescimento, mosaico e necrose da haste, podendo levar a planta à morte. A necrose da haste da soja está, atualmente, entre as principais doenças da soja causadas por vírus no país, e já foi diagnosticada em lavouras nos estados do Mato Grosso, Bahia, Maranhão e, recentemente, Paraná (Embrapa, 2008b).

Vários desafios no campo da sanidade ocupam a atenção dos melhoristas, fitopatologistas e entomologistas brasileiros de soja. De acordo com a Coodetec (2008), os produtores, a assistência técnica e os pesquisadores devem ficar atentos, uma vez que a necrose da haste da soja tem potencial para tornar-se um problema grave na cultura da soja.

Um aspecto ainda pouco estudado é a resposta fisiológica da planta de soja à infecção pelo CPMMV. Nesse sentido, é importante estudar as alterações fisiológicas em cultivares de sojas muito sensíveis e pouco sensíveis ao CPMMV, para obtenção de informações fisiopatológicas, a fim de identificar possíveis cultivares resistentes ao vírus, permitindo ao agricultor escolher as mais adequadas para as regiões onde o problema já se manifestou.

1.2. Interação *Phaseolus vulgaris* e *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV)

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) é um dos mais importantes constituintes da dieta da população brasileira, por ser reconhecidamente uma excelente fonte protéica, além de possuir boa concentração de carboidratos e de ser rico em ferro (Vieira *et al.* 2006). O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão comum (Embrapa, 2008a).

A estimativa da área plantada e da produção de grãos de feijão foi de 3,87 milhões de hectares e 3,24 milhões de toneladas, respectivamente, na temporada 2007/2008 (Conab, 2008). Ao mesmo tempo em que inovações tecnológicas têm sido cada vez mais utilizadas na cultura do feijoeiro visando ganhos na produtividade, novos desafios têm surgido, principalmente em relação às doenças causadas por patógenos virais, que reduzem a produção e depreciam a qualidade do produto.

O feijoeiro comum é cultivado durante todo o ano, em uma grande diversidade de ecossistemas brasileiros, o que facilita a disseminação de doenças. As espécies cultivadas apresentam numerosas doenças de etiologia viral, algumas chegando a ser fatores limitantes da atividade agrícola.

A família *Potyviridae* infecta leguminosas, sendo responsável por perdas consideráveis nos cultivos agrícolas. Esta família tem capacidade de infectar diversas espécies de famílias botânicas, incluindo dicotiledôneas, como o feijoeiro e outras espécies de leguminosas. O maior gênero dentro da família *Potyviridae* é o *Potyvirus*, que contém mais de 100 espécies com partículas filamentosas, medindo entre 700 e 800 nm de comprimento e são transmitidas por afídeos de maneira não persistente (Adams *et al.* 2005). A espécie *P.vulgaris* é hospedeira de grande

variedade dos Potyvirus descritos. Segundo Kitajima (1995), no Brasil dez das mais de vinte viroses descritas em feijoeiro são causadas por Potyvirus.

O Potyvirus causador do endurecimento dos frutos do maracujá pode infectar experimentalmente diversas leguminosas. Dada a semelhança da doença em maracujá, com “passionfruit woodiness” que ocorre na Austrália, o vírus causador foi considerado semelhante e denominado *Passionfruit woodiness virus* (PWV). Do ponto de vista taxonômico, o PWV isolado no Brasil foi, por vários anos, considerado análogo ao vírus de mesmo nome descrito na Austrália. Estudos recentes realizados com diversos isolados brasileiros do PWV revelaram alta identidade com o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (Fischer *et al.* 2005). Desta forma, o CABMV pode ser considerado como a principal espécie de Potyvirus causadora de endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Brasil (Nascimento *et al.* 2004).

O *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) pertence ao gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*, apresenta RNA de fita simples, sentido positivo, cujas partículas flexuosas medem 750-770 nm de comprimento por 12-15 nm de diâmetro (Nascimento *et al.* 2006).

Embora várias espécies de leguminosas sejam experimentalmente suscetíveis ao CABMV, não parece comum a infecção natural em campo de feijoeiro. O feijão comum cvs. Preto 153 e BT2 podem ser infectados sistemicamente pelo CABMV através de transmissão mecânica (Fischer *et al.* 2005; Nascimento *et al.* 2006).

2. Objetivo geral

O trabalho teve o objetivo geral estudar as respostas oxidantes e antioxidantes induzidas pelo CPMMV em duas cultivares de soja BRS132 e IAC17 e pelo CABMV em feijoeiro cultivar BT2.

2.1. Objetivos específicos

Relacionar a concentração de peróxido de hidrogênio à resposta antioxidante das plantas;

Analisar a resposta da planta à infecção viral quanto às variações na atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, guaiacol peroxidase e siringaldazina peroxidase.

Verificar a localização dos vírus em diferentes tecidos da planta;

Localizar em diferentes tecidos as atividades das peroxidases e da siringaldazina peroxidase.

3. Material e Métodos

3.1. Material vegetal e CPMMV

Foram utilizadas duas cultivares de soja (*Glycine max*): uma muito sensível (BRS132) e outra pouco sensível (IAC17) ao *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV), do grupo Carlavirus. As sementes de soja cvs. BRS132 e IAC17 e a fonte de inóculo do CPMMV foram obtidos no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade do Instituto Agrônomo de Campinas. A manutenção do vírus foi realizada por sucessivas inoculações mecânicas em plantas de feijoeiro cv. Jalo, cultivadas em casa de vegetação do Departamento de Fisiologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas.

3.2. Material vegetal e CABMV

O material vegetal utilizado no experimento consistiu em plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) cultivar Black Turtle 2 (BT2), suscetível à infecção sistêmica pelo vírus causador do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*, CABMV, *Potyviridae*). As sementes de feijoeiro cv. BT2 e a fonte de inóculo do CABMV foram obtidas no Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. A manutenção do vírus foi realizada por sucessivas inoculações mecânicas em plantas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) cultivadas em casa de vegetação do Departamento de Fisiologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas.

3.3. Condições experimentais

Sementes de feijoeiro e de soja foram depositadas em bandejas contendo substrato vermiculita, irrigadas com água e mantidas em casa de vegetação, até a germinação. As plantas jovens, na fase de um par de folhas primárias expandidas, foram transplantadas em vasos contendo substrato vermiculita, irrigadas três vezes por semana com 100 mL de solução nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1938) e mantidas em câmara de crescimento com $80 \mu\text{mol/m}^2.\text{s}$ de radiação fotossinteticamente ativa, fotoperíodo de 12 horas e temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

No dia posterior ao transplante, foi realizada a inoculação do CPMMV e CABMV. Para a interação soja – CPMMV a transmissão mecânica manual foi realizada utilizando folhas de feijoeiro cv. Jalo infectadas pelo CPMMV e para a interação feijoeiro - CABMV a transmissão mecânica manual foi realizada utilizando folhas de plantas de maracujazeiro amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa*) infectadas pelo CABMV. As folhas infectadas de maracujazeiro amarelo e feijoeiro cv. Jalo foram maceradas em almofariz com tampão fosfato de potássio 20 mM (pH 7,0) acrescido de sulfito de sódio 20 mM, obtendo-se os extratos vegetais. O extrato vegetal foi utilizado para inocular o primeiro par de folhas sadias expandidas de soja e feijoeiro, previamente, polvilhadas com carborundo.

As análises bioquímicas, imuno-localização e localização de enzimas foram feitas durante o período de aparecimento dos sintomas na primeira folha trifoliolada infectada, no 5º, 7º, 8º e 9º dias após a inoculação nas cultivares de soja 'BRS132' e feijoeiro 'BT2'. Na soja cv. IAC17, as análises foram feitas durante o período de aparecimento dos sintomas na segunda folha trifoliolada infectada, no 14º e 16º dias após a inoculação. Foram consideradas como controles as plantas sadias não inoculadas.

3.4. Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio

A determinação da concentração de peróxido de hidrogênio foi determinada segundo o método proposto por Cheeseman (2006). As amostras de folhas foram pesadas, imediatamente trituradas em N₂ líquido e o extrato obtido pela adição de tampão de extração (fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,4, acrescido de KCN 5 mM). O meio de reação foi constituído de sulfato ferroso amoniacal 250 µM, sorbitol 100 µM, laranja de xilenol 25 mM e etanol 1%. A leitura foi feita medindo a diferença de absorbância entre 550 e 800 nm em espectrofotômetro (Hewlett Packard modelo 8453). A curva padrão foi preparada pela diluição do reagente H₂O₂ 30%. A concentração de H₂O₂ na reação foi calibrada usando absorbância de 240 nm e coeficiente de extinção molar de 43.6 M⁻¹. cm⁻¹. A concentração de peróxido de hidrogênio foi expressa em µmol de H₂O₂ g⁻¹ MF.

3.5. Atividade da superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase foi determinada segundo método utilizado por Gupta *et al.* (1993), com modificações. A extração foi feita em almofariz e pistilo resfriado, onde foi triturado em N₂ líquido 1g de folha fresca e o extrato obtido pela adição de tampão de extração (10 mL de tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH 7,0, EDTA 0,1 mM e PVPP 1%). Em seguida, o extrato foi centrifugado a 15000xg, a 4 °C por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático.

A mistura de reação consistiu de fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 9,9 mM, azul de nitrotetrazolium 57 µM (NBT), riboflavina 44 mM, triton X-100 0,025% e 20 µL de sobrenadante para 1 mL de volume final. A riboflavina foi adicionada por último no tubo contendo o meio de reação. Os tubos de vidro foram expostos dentro de uma câmara com luz fluorescente de 15 Watts por 10 minutos a

10 centímetros da luz. No ensaio, uma unidade SOD foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir em 50% a foto-redução do azul de nitrotetrazolium. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm e a atividade da SOD foi expressa em Unidade SOD . g⁻¹ MF.

3.6. Atividade da catalase

A atividade da catalase foi determinada segundo Costa *et al.* (2005), com modificações. A extração foi feita em almofariz e pistilo resfriado, onde foi macerado 1g de folha fresca em 20 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0). Em seguida, o extrato foi centrifugado a 14000xg, a 4 °C por 10 minutos e o sobrenadante utilizado no ensaio enzimático.

O ensaio para a determinação da catalase consistiu na adição de 60 µL de H₂O₂ 1M em uma mistura de reação contendo 3 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0) e 100 µL do extrato enzimático. O decréscimo do H₂O₂ foi monitorado pela absorbância a 240 nm, em intervalos de 10 segundos por um período de 1 minuto. A diferença de absorbância ($\Delta A_{240 \text{ nm}}$), obtida através de regressão linear, foi dividida pelo o coeficiente de extinção molar do H₂O₂, 39,4 M⁻¹.cm⁻¹ (Aebi, 1984). A atividade da CAT foi expressa em µmol de H₂O₂ mim⁻¹. g⁻¹ MF.

3.7. Atividade da ascorbato peroxidase

A determinação da atividade da ascorbato peroxidase foi feita de acordo com Amako *et al.* (1994). A extração enzimática foi feita em almofariz e pistilo resfriado, onde 1g de folha fresca foi macerado em 5 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 1 mM , EDTA 1 mM. Em seguida, o extrato foi centrifugado

a 14000xg, por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado para a determinação enzimática.

O meio de reação para APX continha tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), peróxido de hidrogênio 1 mM, ácido ascórbico 0,5 mM, EDTA 0,1 mM e 100µL de sobrenadante do extrato. A taxa de oxidação do ascorbato foi estimada pelo monitoramento do decréscimo da absorbância a 290 nm, obtida em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech. Ultrospec 1000), em intervalos de 10 segundos por um período de 1 minuto. A diferença de absorbância, obtida através de regressão linear, foi dividida pelo coeficiente de extinção molar do ascorbato ($2,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e a atividade da APX foi expressa em $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{MF}$.

3.8. Atividade da guaiacol peroxidase

Os ensaios para a determinação da atividade da guaiacol peroxidase foram realizados segundo a metodologia utilizada por Costa *et al.* (2005), com modificações.

As amostras de 1g de folha fresca foram maceradas em almofariz e pistilo resfriado, contendo 5 mL de solução tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0). Posteriormente, o extrato foi centrifugado a 14000xg, a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a determinação enzimática. O meio de reação para determinar a atividade da guaiacol peroxidase continha guaiacol 1,2 mM, tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0). Para 3 mL do meio de reação foram adicionados 50 µL de sobrenadante do extrato.

A reação foi iniciada mediante a adição de 15 µL de H_2O_2 5 mM. A reação foi monitorada a 470 nm, e a leitura da absorbância foi realizada a cada 10 segundos, durante 1 minuto. O coeficiente angular da reta, obtido através de regressão linear,

foi dividido pelo coeficiente de extinção molar do tetraguaiacol ($26,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e a atividade da GPOX foi expressa em $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$.

3.9. Atividade da siringaldazina peroxidase

A atividade da siringaldazina peroxidase foi determinada segundo a metodologia seguida por Peyrano *et al.* (1997), com modificações.

A extração foi feita em almofariz e pistilo resfriado, onde foi macerado 1g de folha fresca em 20 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM (pH 6,0), contendo KCL 1 M e posteriormente adicionado 0,25g de polivinilpirrolidona (PVP) por grama de folha fresca. Em seguida, o extrato foi centrifugado a $14000 \times g$ durante 10 minutos a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, para a obtenção do sobrenadante.

O meio de reação para atividade da siringaldazina peroxidase, que foi mantido a 35°C , continha siringaldazina $19 \mu\text{M}$, peróxido de hidrogênio $54 \mu\text{M}$ e tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,4). Foram adicionados $100 \mu\text{L}$ de sobrenadante do extrato para cada 3 mL do meio de reação. As leituras de absorbâncias a 530 nm, foram obtidas em espectrofotômetro (Hewlett Packard, modelo 8453), por um período de 1 minuto, em intervalos de 10 segundos. O coeficiente angular da reta, obtido através de regressão linear, forneceu uma estimativa da atividade da SPOX, que foi expressa em $\Delta \text{Abs}_{530\text{nm}} \text{ min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$.

3.10. Imuno-localização do CPMMV e do CABMV

Para a localização do CPMMV e CABMV foi utilizada a técnica de “Immuno-print” em cortes transversais no pecíolo da primeira folha trifoliolada do feijoeiro cv. BT2 e soja cv. BRS132 e no pecíolo da segunda folha trifoliolada da soja cv. IAC17. No caule os cortes transversais foram feitos entre o primeiro par de folha expandida

e a primeira folha trifoliolada do feijoeiro cv. BT2 e soja cv. BRS132, na soja cv. IAC17 entre a primeira folha trifoliolada e a segunda folha trifoliolada. Os cortes foram pressionados em membranas de nitrocelulose.

A membrana contendo as impressões foi incubada durante 60 minutos em tampão TBS (Tris-HCL 50 mM, pH 7,5; NaCl 0,2 M), contendo 5% de leite em pó desnatado. Em seguida foram feitas 5 lavagens com TBS-T (TBS contendo 0,1% de Tween-20) trocados a cada 5 minutos. Posteriormente, as membranas foram incubadas com anti-soro de coelho específico para CPMMV OU CABMV diluídos 1:10.000 em TBS, durante 60 minutos, seguido de 5 lavagens com TBS-T trocados a cada 5 minutos. Em seguida, as membranas foram incubadas no conjugado anti-rabbit IgG – alkaline fosfatase (Sigma 9199), diluído 1:10.000 em tampão TBS durante 30 minutos, após a incubação as membranas foram lavadas 5 vezes com TBS-T trocados a cada 5 minutos.

Para a revelação utilizou-se solução contendo 5 mL tampão (Tris-HCL 0,1 mM, pH 9,5; NaCl 0,1 M; $MgCl_2$ 5 mM), 66 μ L de azul de nitrotetrazolium(NBT) e 33 μ L de 5- bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP). Após a obtenção da coloração desejada as membranas foram lavadas com TBS-T, água destilada, e secas entre folhas de papel de filtro. As membranas foram observadas em microscópio ótico de campo claro e fotografadas.

3.11. Localização das peroxidases

Para a localização da atividade das peroxidases foi utilizado o método utilizado por Avdiushko *et al.* (1993), com modificações. Foram feitos cortes transversais no pecíolo da primeira folha trifoliolada do feijoeiro cv. BT2 e soja cv. BRS132 e da segunda folha trifoliolada da soja cv. IAC17. Os cortes foram

pressionados em membranas de nitrocelulose. As membranas contendo impressões de partes de plantas foram transferidas para placa de petri. Em seguida, adicionou-se à membrana de nitrocelulose impressa, 4,5 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0), 1 µL peróxido de hidrogênio 30% e 0,5 mL de substrato 4-cloro-naftol (6 mg/mL de metanol). As membranas foram mantidas em agitação até que a coloração desejada fosse atingida. Após a obtenção da coloração, as membranas foram lavadas com água destilada, secas e mantidas entre papel de filtro. As membranas foram observadas em microscópico ótico de campo claro e fotografadas.

3.12. Localização da siringaldazina peroxidase

A localização da atividade de siringaldazina peroxidase foi determinada segundo a metodologia utilizada por Peyrano *et al.* (1997), com modificações. Foram feitos cortes transversais no pecíolo da primeira folha trifoliolada do feijoeiro cv. BT2 e soja cv. BRS132 e na segunda folha trifoliolada da soja cv. IAC17. Os cortes foram pressionados em membranas de nitrocelulose. O meio de reação continha 4,5 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0), 1 µL peróxido de hidrogênio 30% e 0,5 mL de substrato siringaldazina 0,1% em etanol. Para evitar o deslocamento da siringaldazina, devido sua solubilidade, as membranas foram cobertas com papel de filtro e com auxílio de pipeta Pasteur foram transferidas gotas do meio de reação para a cobertura de papel até o mesmo atingir a membrana. Após a obtenção da coloração, as membranas foram lavadas com água destilada, secas entre papel de filtro e imediatamente observadas em microscópico ótico de campo claro e fotografadas.

3.13. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 repetições (4 plantas). A análise estatística consistiu no cálculo da média e erro padrão, análise de variância, testes de Tukey e t ao nível de 5% de probabilidade.

4. Resultados

4.1. Interação *Glycine max* e *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV)

Nas plantas de soja 'BRS132', o CPMMV induziu uma doença aguda, com sintomas severos e duração de 7 a 12 dias, culminando com a morte da planta. Os sintomas se manifestaram após o 5º dia após inoculação, inicialmente pela paralisação do crescimento durante os primeiros 5 dias após inoculação. No 8º dia após inoculação apareceram sintomas de mosaico e necrose na primeira folha trifoliolada, seguida rapidamente por necrose da haste e morte da gema apical (Figura 1A). O material examinado nos experimentos foi a primeira folha trifoliolada, visando caracterizar a fase aguda da doença, entre o 5º e 9º dia após inoculação.

Nas plantas de soja cv. IAC17, o CPMMV induziu uma doença do tipo crônica com mosaico leve na segunda folha trifoliolada, visível no 14º dia após inoculação (Figura 2A). Não houve sintomas na primeira folha trifoliolada nem necrose da haste ou gema apical. As plantas sadias tiveram crescimento e desenvolvimento normal em ambas cultivares, BRS132 e IAC17.

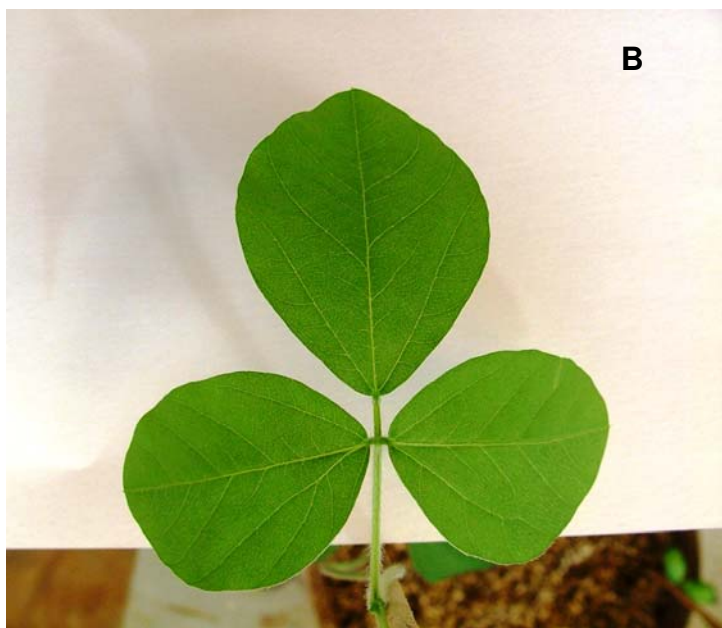
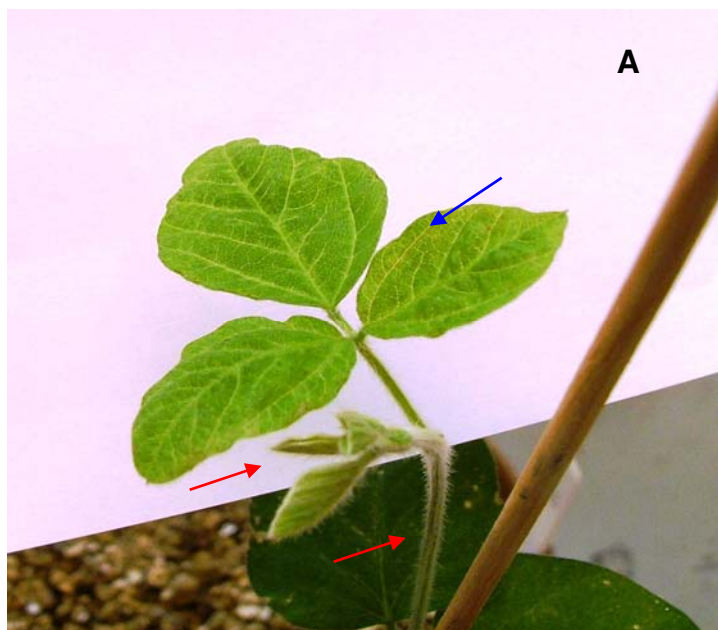


Figura 1. Soja 'BRS132' mostrando sintoma de mosaico e necrose na primeira folha trifoliolada (seta azul) e necrose da haste e da gema apical (seta vermelha), no 9º dia após inoculação (foto A). Planta de soja 'BRS132' sadia (foto B).

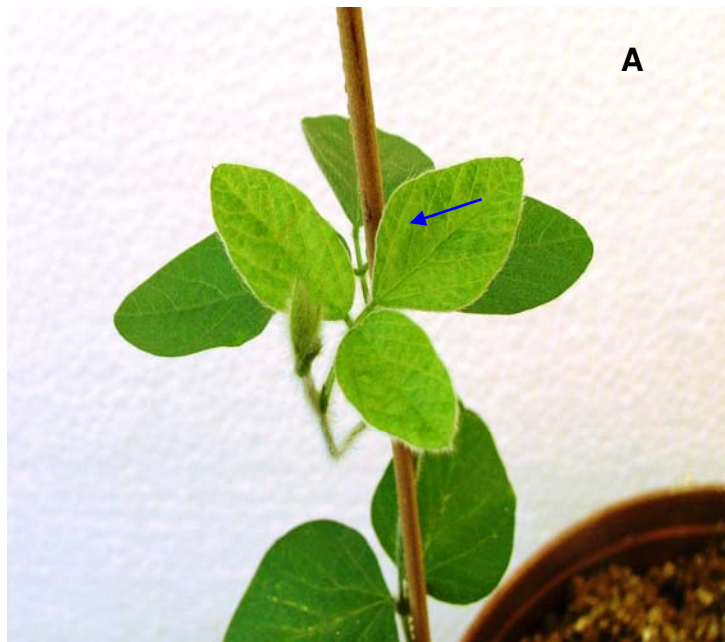


Figura 2. Planta de soja 'IAC17' mostrando sintoma de mosaico leve na segunda folha trifoliolada (seta azul), no 16º dia após inoculação (foto A). Planta de soja 'IAC17' sadia (foto B).

4.1.1. Concentração de peróxido de hidrogênio

A concentração de peróxido de hidrogênio na primeira folha trifoliolada de soja 'BRS132' foi significativamente maior nas plantas infectadas com CPMMV em relação às plantas saudáveis, em média das quatro amostragens (Figura 3).

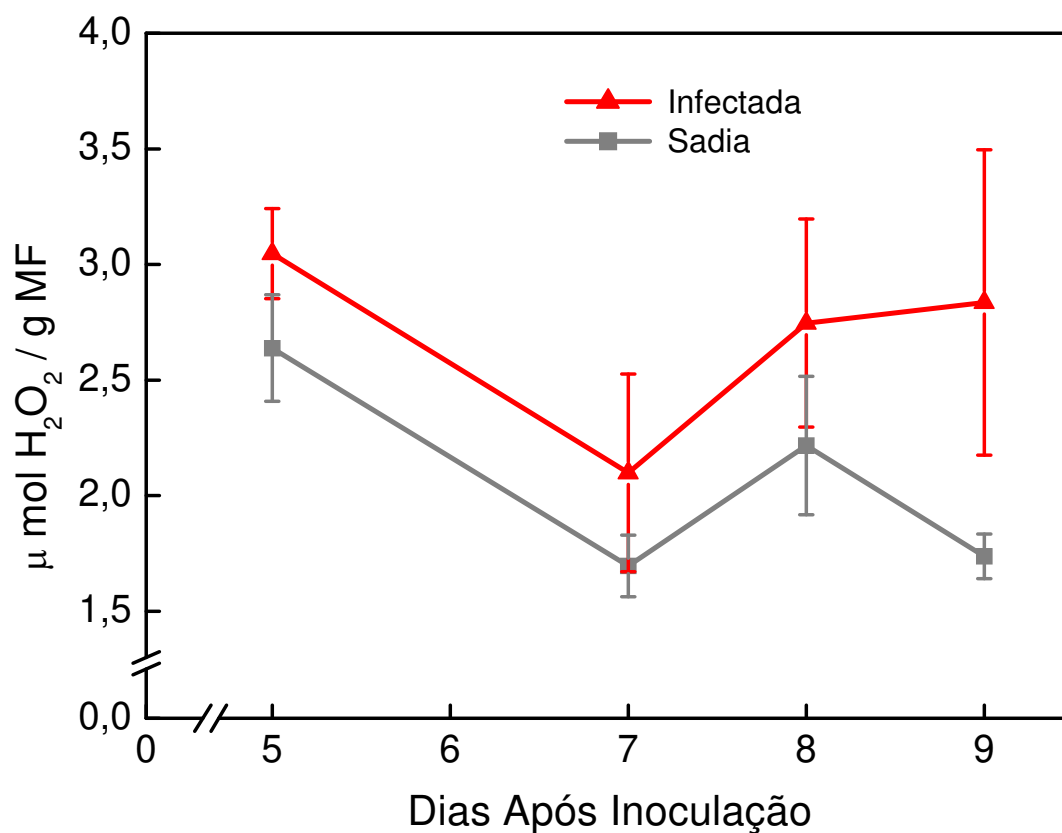


Figura 3. Concentração de peróxido de hidrogênio na primeira folha trifoliolada de soja cv. BRS132. Médias de 4 repetições. Barras representam o erro padrão da média. Massa fresca (MF). Médias gerais entre infectadas e saudáveis significativamente diferentes a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

A concentração de peróxido de hidrogênio na segunda folha trifoliolada de soja cv. IAC17 foi significativamente maior nas plantas infectadas com CPMMV em relação às plantas sadias, em média das duas amostragens (Figura 4). Embora tenha se observado uma redução na concentração de peróxido de hidrogênio, esta foi sempre maior nas plantas infectadas quando comparada com as plantas sadias.

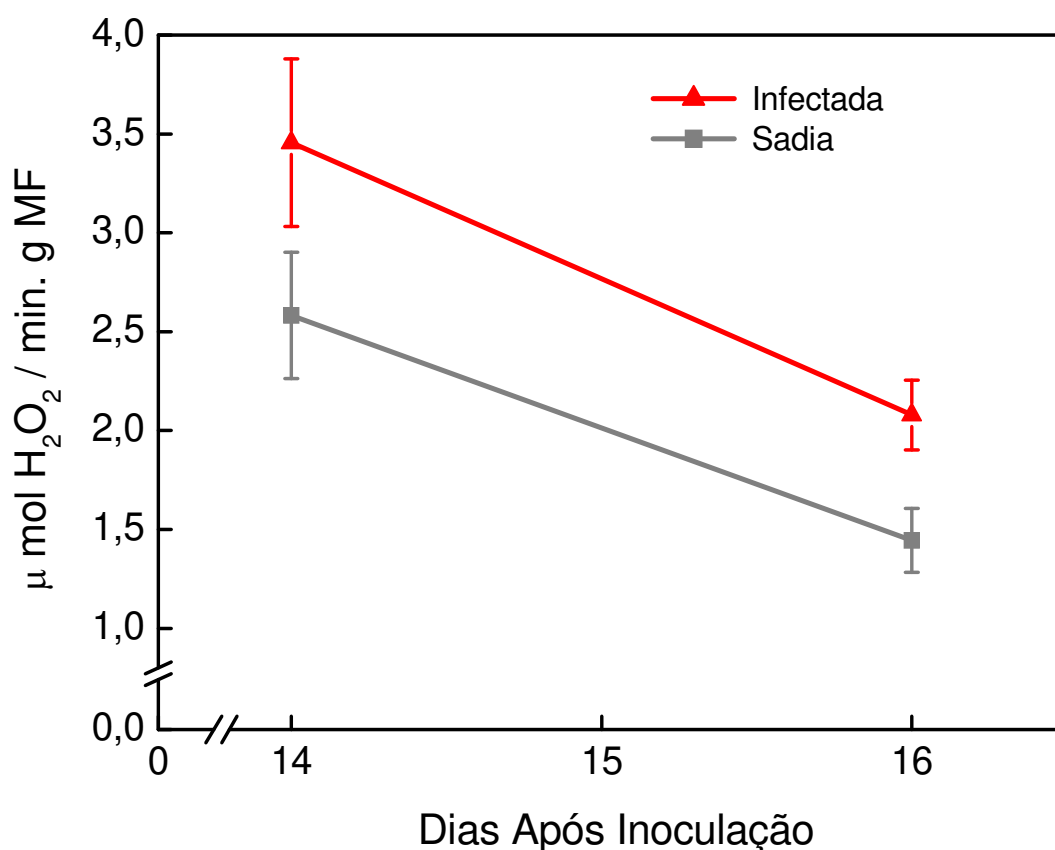


Figura 4. Concentração de peróxido de hidrogênio na segunda folha trifoliolada de soja cv. IAC17. Médias de 4 repetições. Barras representam o erro padrão da média. Massa fresca (MF). Médias gerais entre infectadas e sadias significativamente diferentes a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

4.1.2. Atividade da catalase

Os valores de atividade da CAT foram similares nas plantas de soja cv. BRS132 infectadas e sadias no 5º dia após inoculação (Figura 5). A partir do 7º dia, houve aumento gradual da atividade da CAT nas plantas infectadas. No 9º dia após inoculação, ocorreu aumento na atividade de aproximadamente 50% em relação às plantas sadias. As plantas sadias não mostraram variação na atividade da CAT durante o período analisado.

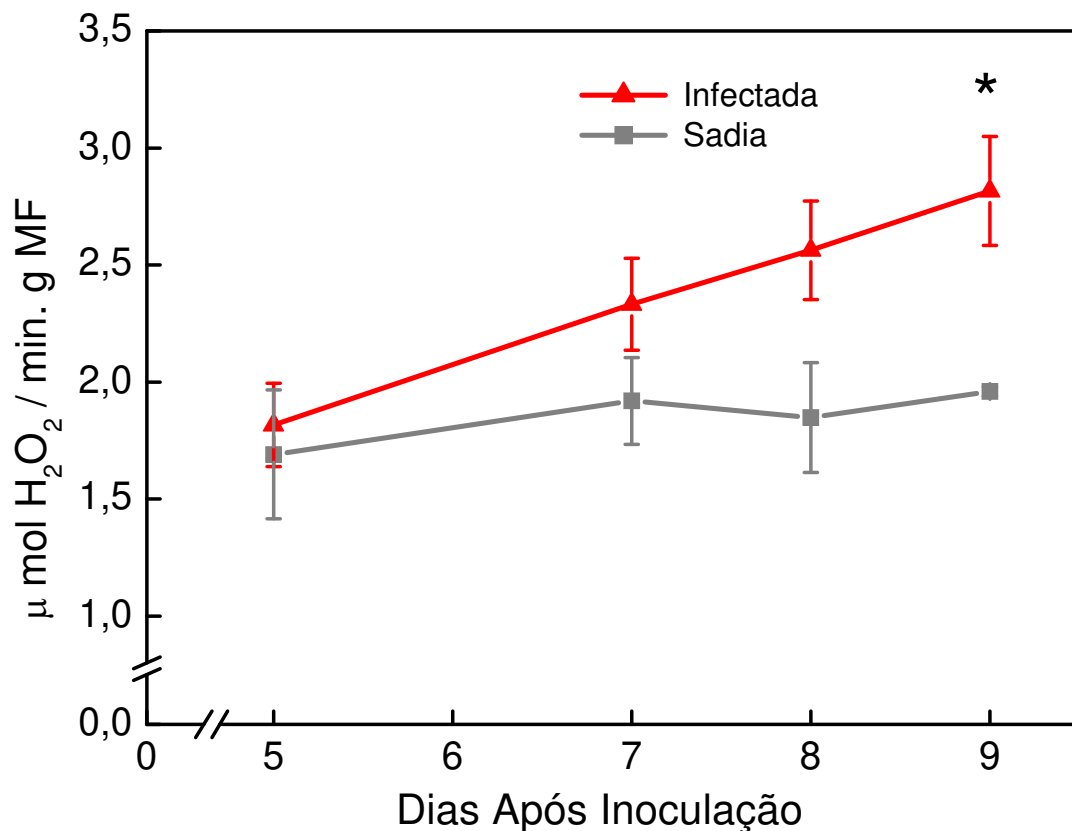


Figura 5. Atividade da catalase na primeira folha trifoliolada de soja cv. BRS132. Médias de 4 repetições. Barras representam o erro padrão da média. Massa fresca MF). * - médias significativamente diferentes a 5% de probabilidade pelo teste t.

Na soja cv. IAC17, a atividade da CAT na segunda folha trifoliolada foi significativamente maior nas plantas infectadas em relação às plantas sadias (Figura 6). No 16º dia após inoculação, a diferença nos valores de atividade da CAT entre as plantas infectadas e plantas sadias foi de cerca de 160%. Nas plantas sadias não houve variação expressiva de atividade da CAT.

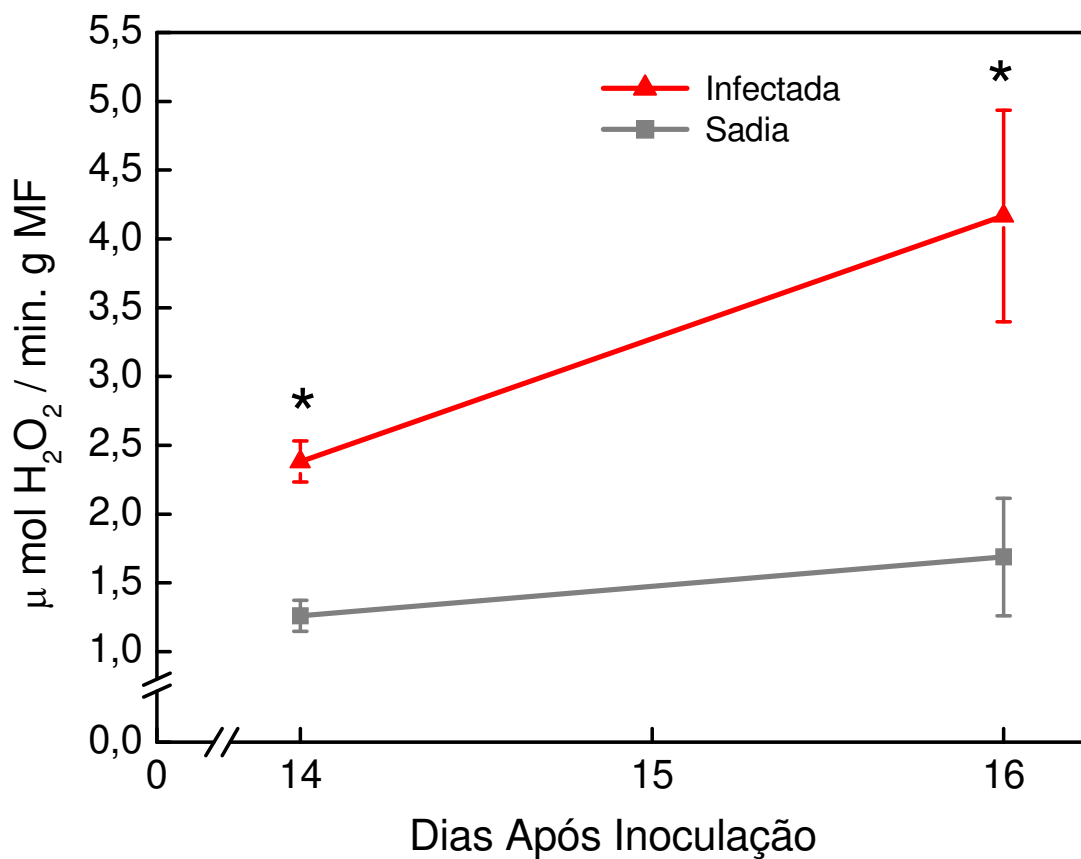


Figura 6. Atividade da catalase na segunda folha trifoliolada de soja cv. IAC17. Médias de 4 repetições. Barras representam o erro padrão da média. Massa fresca (MF). * - médias significativamente diferentes a 5% de probabilidade pelo teste t.

4.1.3. Atividade da ascorbato peroxidase

Os resultados da atividade da ascorbato peroxidase em soja cv. BRS132 mostraram diferenças significativas entre as plantas infectadas e plantas sadias, em média das quatro amostragens (Figura 7). Nas plantas infectadas houve redução expressiva da atividade da APX de aproximadamente 50% entre o 5º e 8º dias após inoculação. Nas plantas sadias não foi observada variação na atividade da ascorbato peroxidase durante os dias analisados.

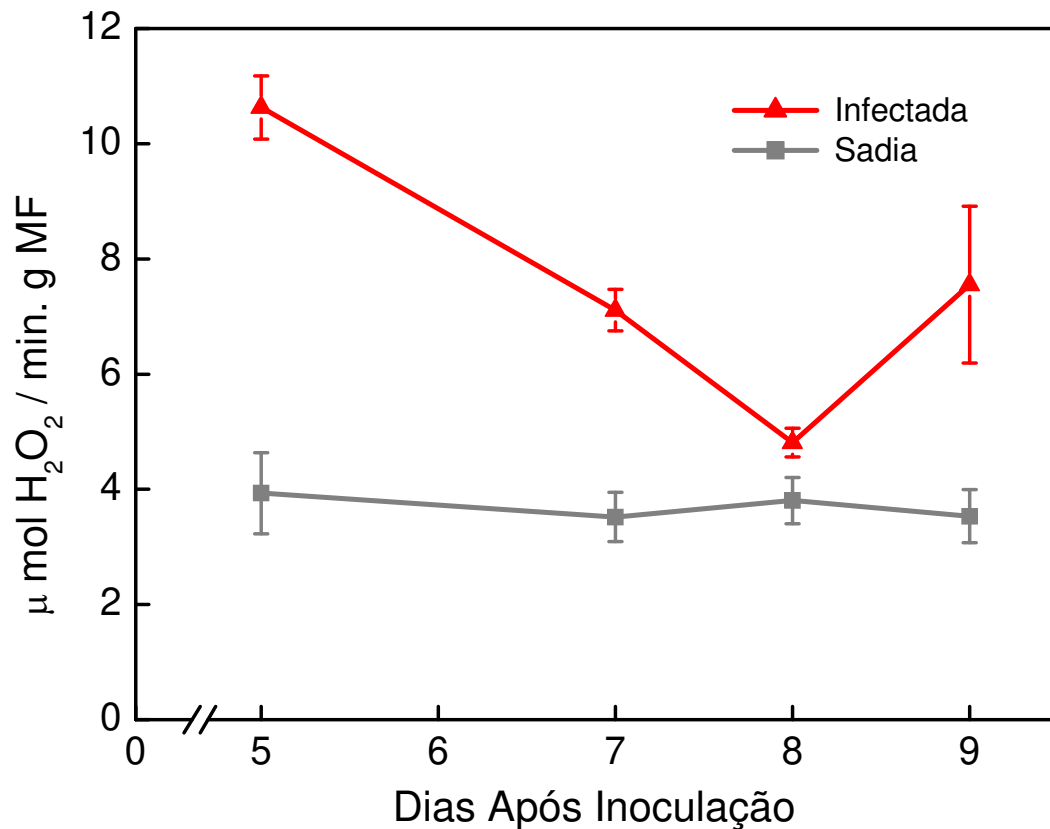


Figura 7. Atividade da ascorbato peroxidase na primeira folha trifoliolada de soja cv. BRS132. Médias de 4 repetições. Barras representam o erro padrão da média. Massa fresca (MF). Médias gerais entre infectadas e sadias significativamente diferentes a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Em soja cv. IAC17, os resultados da atividade da ascorbato peroxidase mostraram que os valores nas plantas infectadas foram significativamente maiores quando comparados com os valores das plantas sadias, em média das duas amostragens (Figura 8).

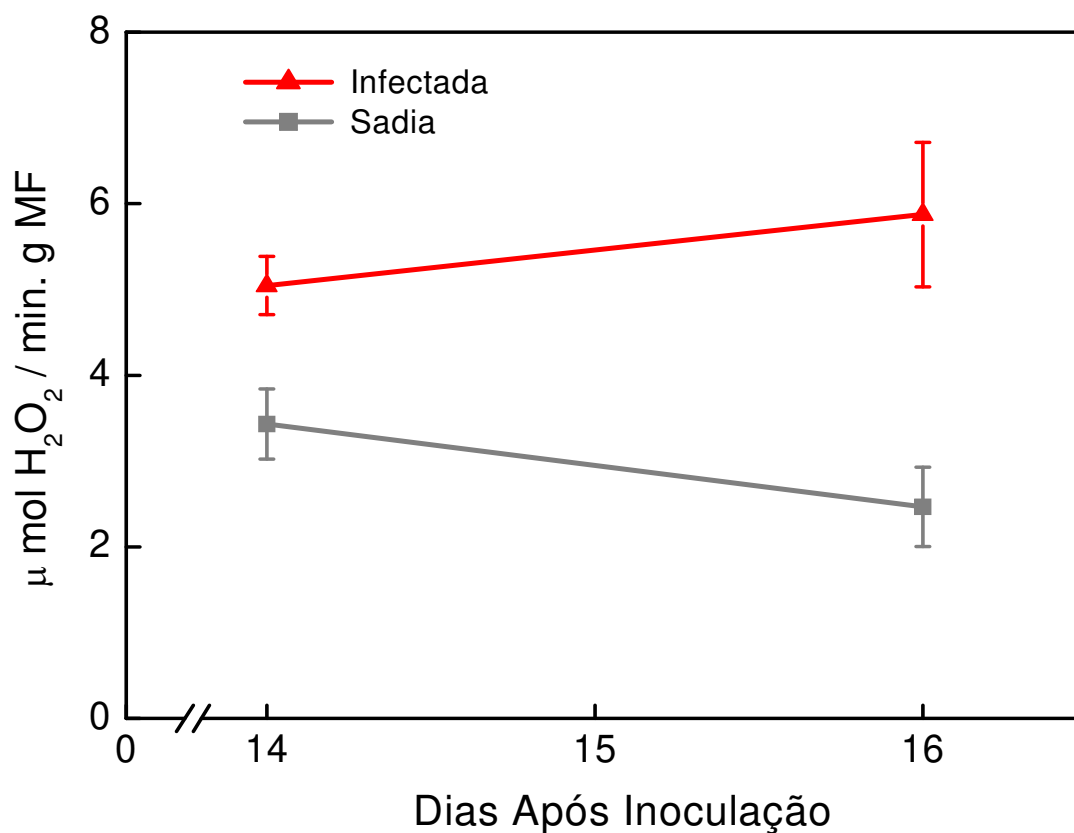


Figura 8. Atividade da ascorbato peroxidase na segunda folha trifoliolada de soja cv. IAC17. Médias de 4 repetições. Barras representam o erro padrão da média. Massa fresca (MF). Médias gerais entre infectadas e sadias significativamente diferentes a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

4.1.4. Atividade da guaiacol peroxidase

As atividades da guaiacol peroxidase na primeira folha trifoliolada foram similares entre as plantas infectadas e plantas sadias da soja cv. BRS132 no 5º dia após inoculação (Figura 9). Nos dias posteriores houve aumento gradual e expressivo de atividade da GPOX nas plantas infectadas de cerca de 2 a 3 vezes em relação ao observado no 5º dia após inoculação. Nas plantas sadias a atividade da GPOX não apresentou alterações expressivas durante o período analisado.

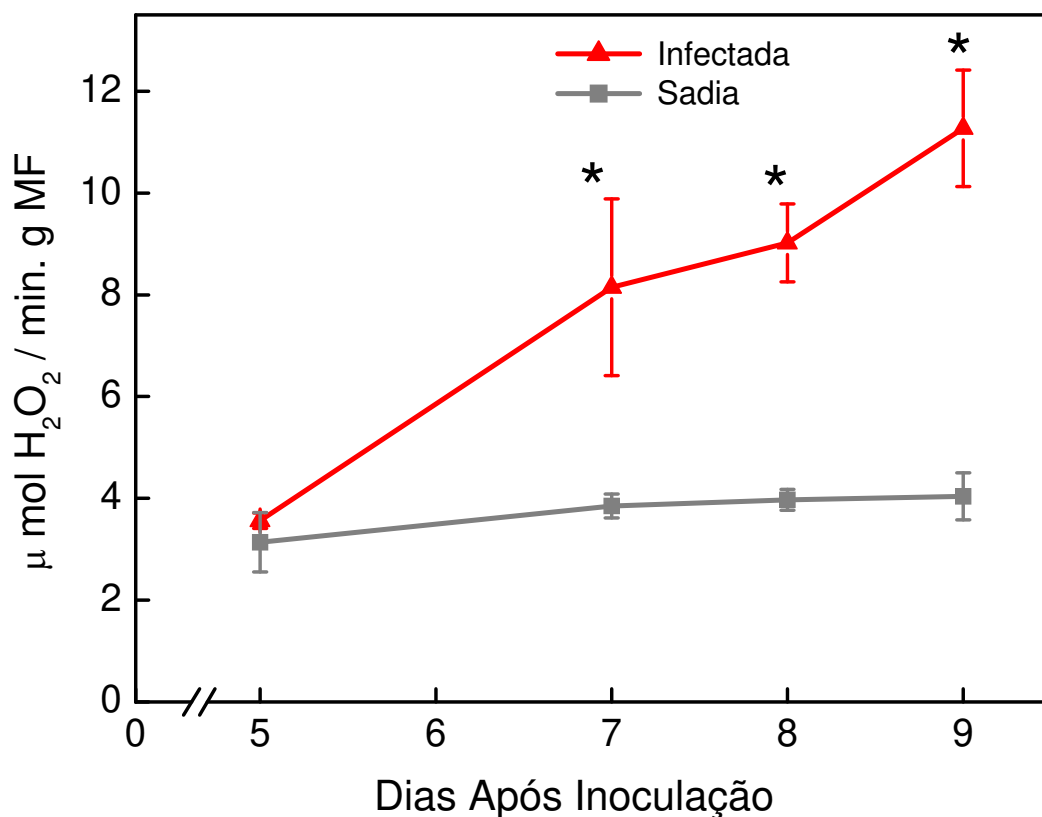


Figura 9. Atividade da guaiacol peroxidase na primeira folha trifoliolada de soja cv. BRS132. Médias de 4 repetições. Barras representam o erro padrão da média. Massa fresca (MF). * - médias significativamente diferentes a 5% de probabilidade pelo teste t.

Na soja cv. IAC17, a atividade da guaiacol peroxidase na segunda folha trifoliolada apresentou maiores valores nas plantas infectadas quando comparadas com as plantas sadias (Figura 10). Embora tenha sido observado aumento de atividade da GPOX tanto nas plantas infectadas como nas plantas sadias, os valores sempre foram maiores nas folhas das plantas infectadas.

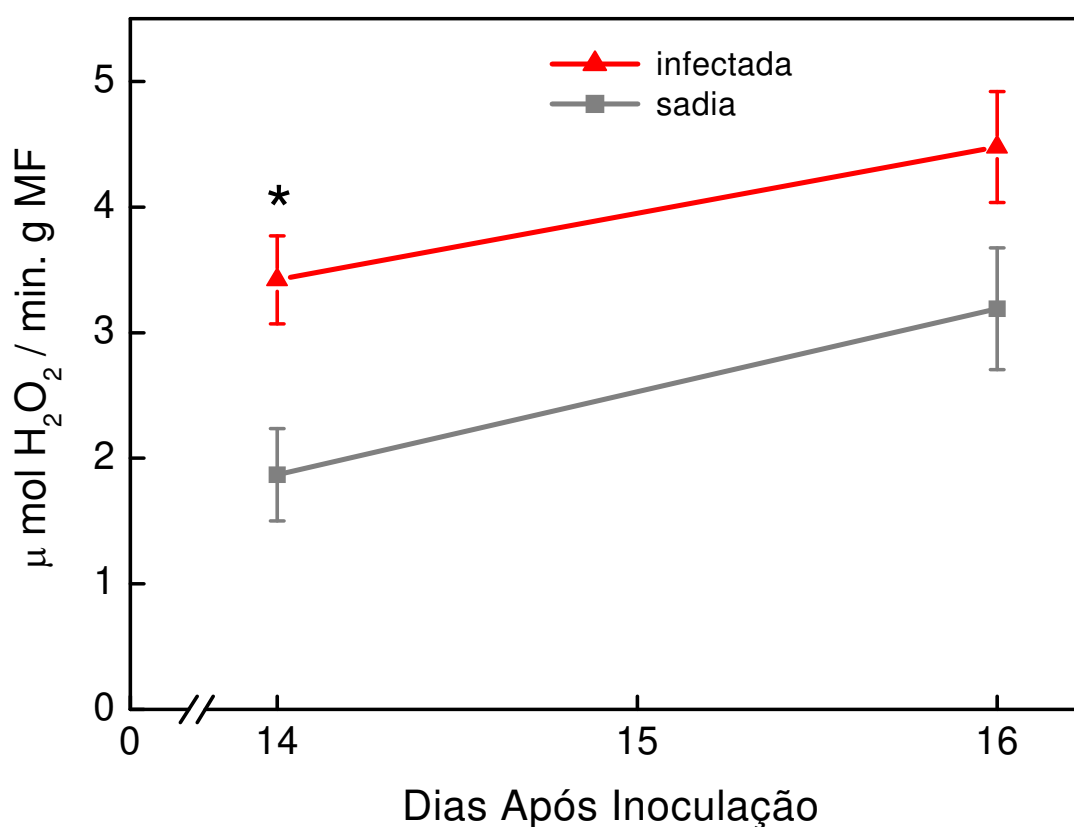


Figura 10. Atividade da guaiacol peroxidase na segunda folha trifoliolada de soja cv. IAC17. Médias de 4 repetições. Barras representam o erro padrão da média. Massa fresca (MF). * - médias significativamente diferentes a 5% de probabilidade pelo teste t.

4.1.5. Atividade da siringaldazina peroxidase

Na soja cv. BRS132, não foram observadas diferenças significativas nos valores de atividade da SPOX entre plantas infectadas e plantas sadias entre o 5º e 7º dias após inoculação (Figura 11). Entre o 7º e 8º dias houve rápido incremento na atividade da SPOX nas plantas infectadas, que no 8º dia apresentavam atividade cerca de 4 vezes maior para as plantas infectadas. Nas plantas sadias não houve variações expressivas na atividade da SPOX.

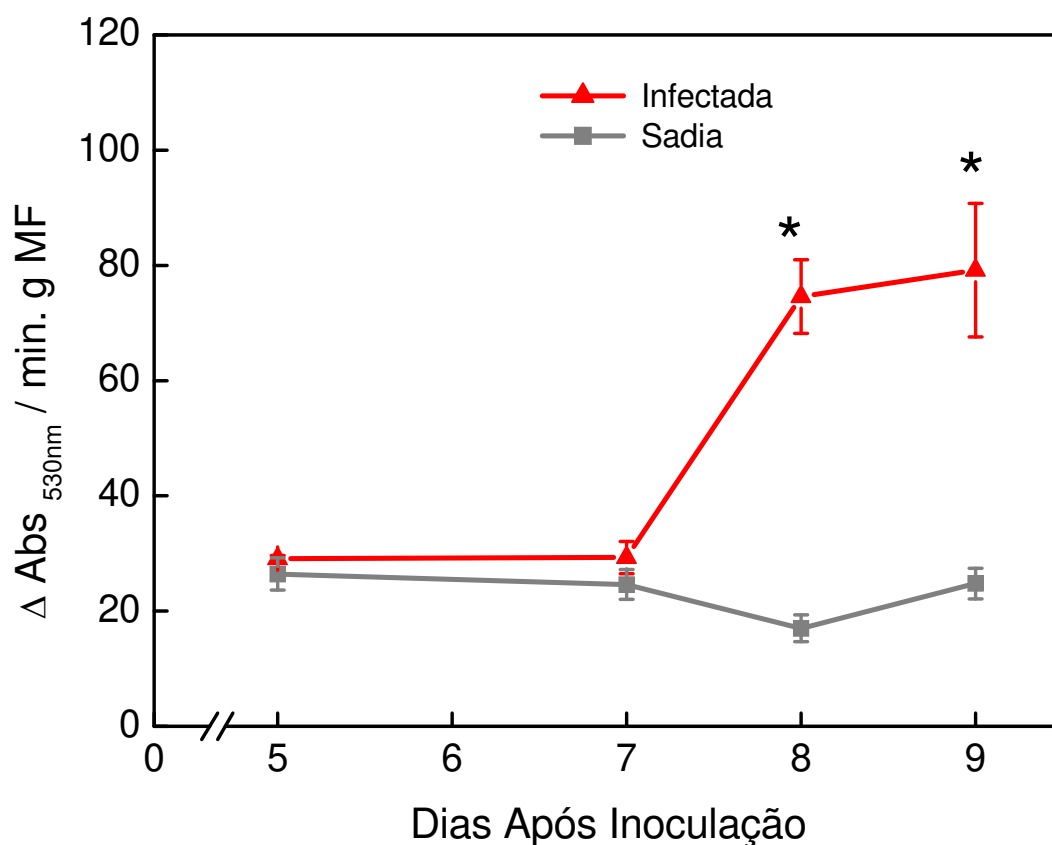


Figura 11. Atividade da siringaldazina peroxidase na primeira folha trifoliolada de soja cv. BRS132. Médias de 4 repetições. Barras representam o erro padrão da média. Massa fresca (MF). * - médias significativamente diferentes a 5% de probabilidade pelo teste t.

Na soja 'IAC17', foi observado aumento significativo na atividade da siringaldazina peroxidase na segunda folha trifoliolada das plantas infectadas em relação às plantas sadias (Figura 12). Nas plantas infectadas houve aumento expressivo de atividade da SPOX, de cerca de 2 vezes em comparação com as plantas sadias no 14º dia após inoculação. Este aumento chegou a ser até 4 vezes maior dois dias depois. Nas plantas sadias não houve variação expressiva na atividade da SPOX durante os dias analisados.

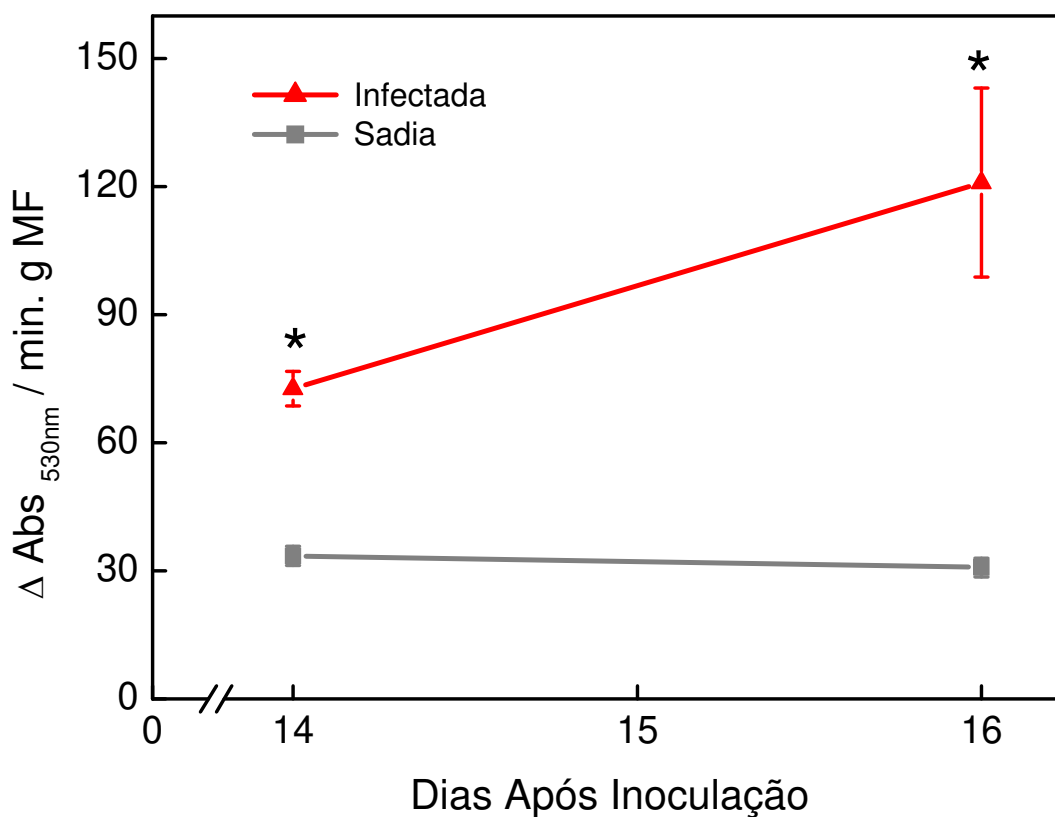


Figura 12. Atividade da siringaldazina peroxidase na segunda folha trifoliolada de soja cv. IAC17. Médias de 4 repetições. Barras representam o erro padrão da média. Massa fresca (MF). * - médias significativamente diferentes a 5% de probabilidade pelo teste t.

4.1.6. Imuno-localização do CPMMV

Na soja 'BRS132' observou-se uma rápida mudança na distribuição do CPMMV nos tecidos do pecíolo da primeira folha trifoliolada e do caule. No pecíolo a coloração que indica a presença do vírus foi observada entre o 5º e 7º dias após inoculação, próximos à região periférica (Figuras 13A e 13B). No 8º dia após inoculação o vírus foi detectado na região da medula, com intensidade de coloração que indica concentrações do CPMMV crescentes e coincidindo com a resposta aguda na primeira folha trifoliolada (Figura 13C). No 9º dia após inoculação, observou-se o pecíolo totalmente invadido pelo CPMMV (Figura 13D).

No caule de soja 'BRS132', a presença do CPMMV ocorreu no 5º dia após inoculação, próximos à região periférica (Figura 14A). No 7º e 8º dias após inoculação, o CPMMV foi detectado também na região da medula, com intensidades de coloração que indicam concentrações crescentes do 7º para o 8º dia (Figura 14B e 14C). No 9º dia após inoculação, quando se iniciou a morte da gema apical, observou-se o caule totalmente invadido pelo CPMMV (Figura 14D).

Na soja 'IAC17', a resposta ao CPMMV foi mais lenta e com estabelecimento de fase crônica, sendo detectado o vírus no pecíolo da segunda folha trifoliolada e no caule só no 14º dia após inoculação, quando já era evidente o mosaico nesta folha. No pecíolo as primeiras colorações ocorreram no 14º dia após inoculação, na região periférica (Figura 15A). Mesmo no 16º dia após inoculação a distribuição do CPMMV ficou restrita à região periférica do pecíolo (Figura 15B). No caule, a invasão do CPMMV foi similar ao descrito para o pecíolo, embora tenha se observado a coloração que indica a presença do CPMMV, próximo à região da medula no 16º dia após inoculação (Figuras 16A e 16B).

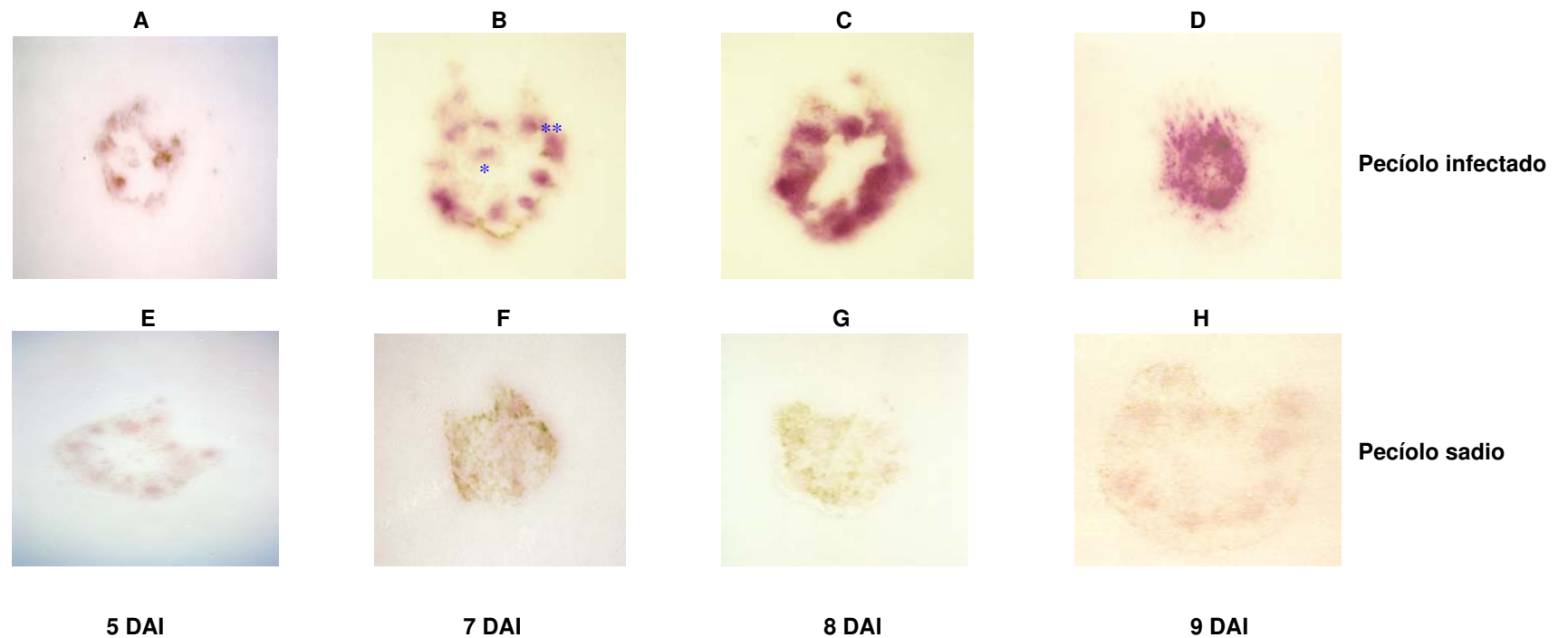


Figura 13. Imuno-localização do CPMMV em membranas de nitrocelulose impressas com cortes transversais no pecíolo infectado (A, B, C e D) e pecíolo sadio (E, F, G e H) da soja cv. BRS132. Dias após inoculação (DAI). Símbolos: ** - região periférica (epiderme, córtex e feixes vasculares) e * - região da medula.

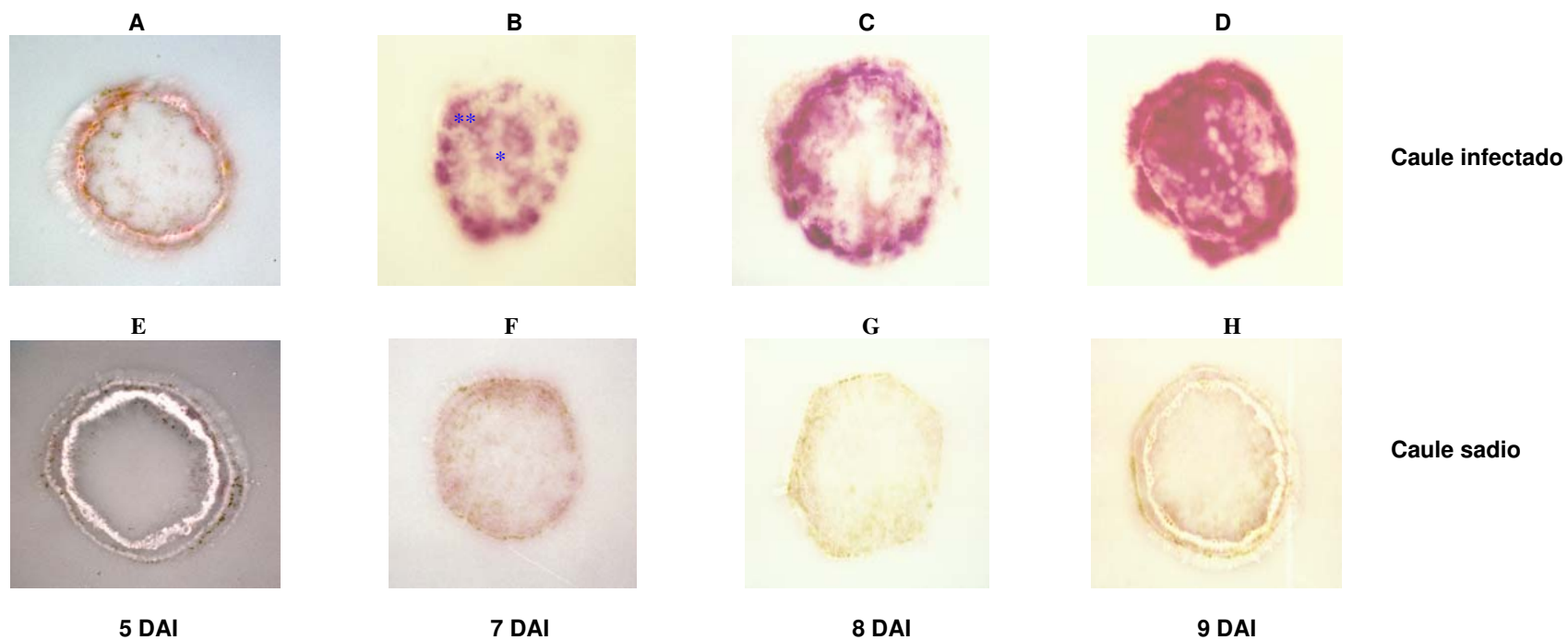


Figura 14. Imuno-localização do CPMMV em membranas de nitrocelulose impressas com cortes transversais no caule infectado (A, B, C e D) e caule sadio (E, F, G e H) da soja cv. BRS132. Dias após inoculação (DAI). Símbolos: ** - região periférica (epiderme, córtex e feixes vasculares) e * - região da medula.

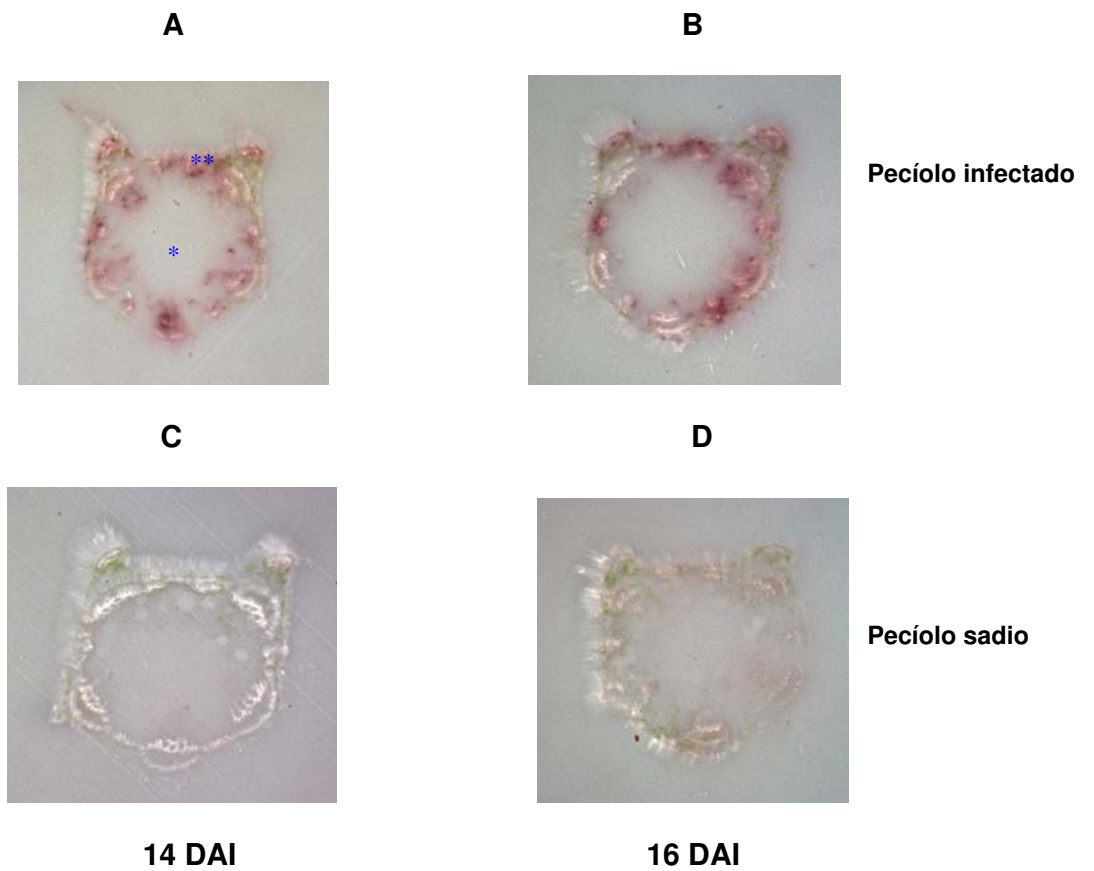


Figura 15. Imuno-localização do CPMMV em membranas de nitrocelulose impressas com cortes transversais no pecíolo infectado (A e B) e pecíolo sadio (C e D) da soja cv. IAC17. Dias após inoculação (DAI). Símbolos: ** - região periférica (epiderme, córtex e feixes vasculares) e * - região da medula.

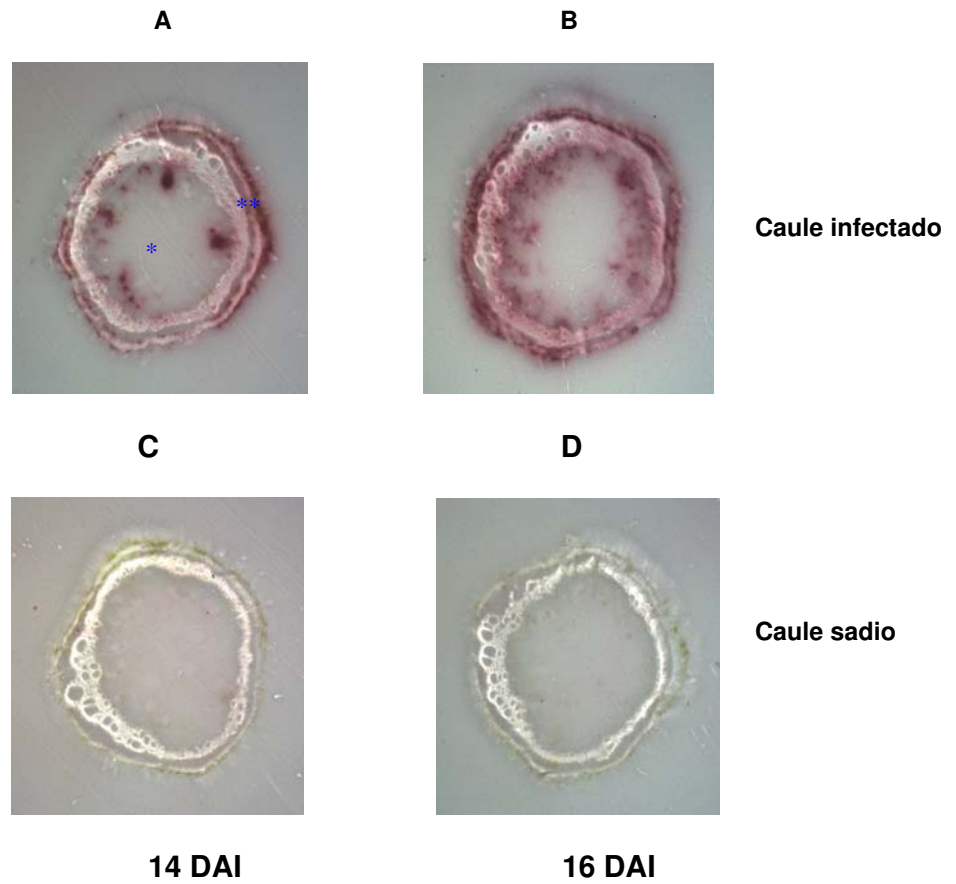


Figura 16. Imuno-localização do CPMMV em membranas de nitrocelulose impressas com cortes transversais no caule infectado (A e B) e caule sadio (C e D) da cultivar cv. IAC17. Dias após inoculação (DAI). Símbolos: ** - região periférica (epiderme, córtex e feixes vasculares) e * - região da medula.

4.1.7. Localização das peroxidases

A atividade das peroxidases foi evidenciada pelo aparecimento da coloração escura característica da oxidação do substrato 4-cloronaftol. No pecíolo da primeira folha trifoliolada de soja 'BRS132' infectada, o primeiro sinal da presença das peroxidases ocorreu no 5º dia após inoculação, próximo à região periférica (Figura 17A). Nas plantas infectadas, a partir do 7º dia após inoculação, a reação foi muito intensa e distribuída na região periférica e na região da medula evidenciando a presença expressiva de atividade das peroxidases (Figuras 17B a 17D). Nas plantas sadias a reação foi observada principalmente na região periférica do pecíolo e com menor intensidade no período analisado (Figuras 17E a 17H).

Na soja cv. IAC17, a visualização da coloração que caracteriza a atividade das peroxidases mostrou que a localização foi principalmente na região periférica com maior intensidade, somente visível no 16º dia após inoculação, nas plantas infectadas em relação às sadias (Figuras 18A a 18D).

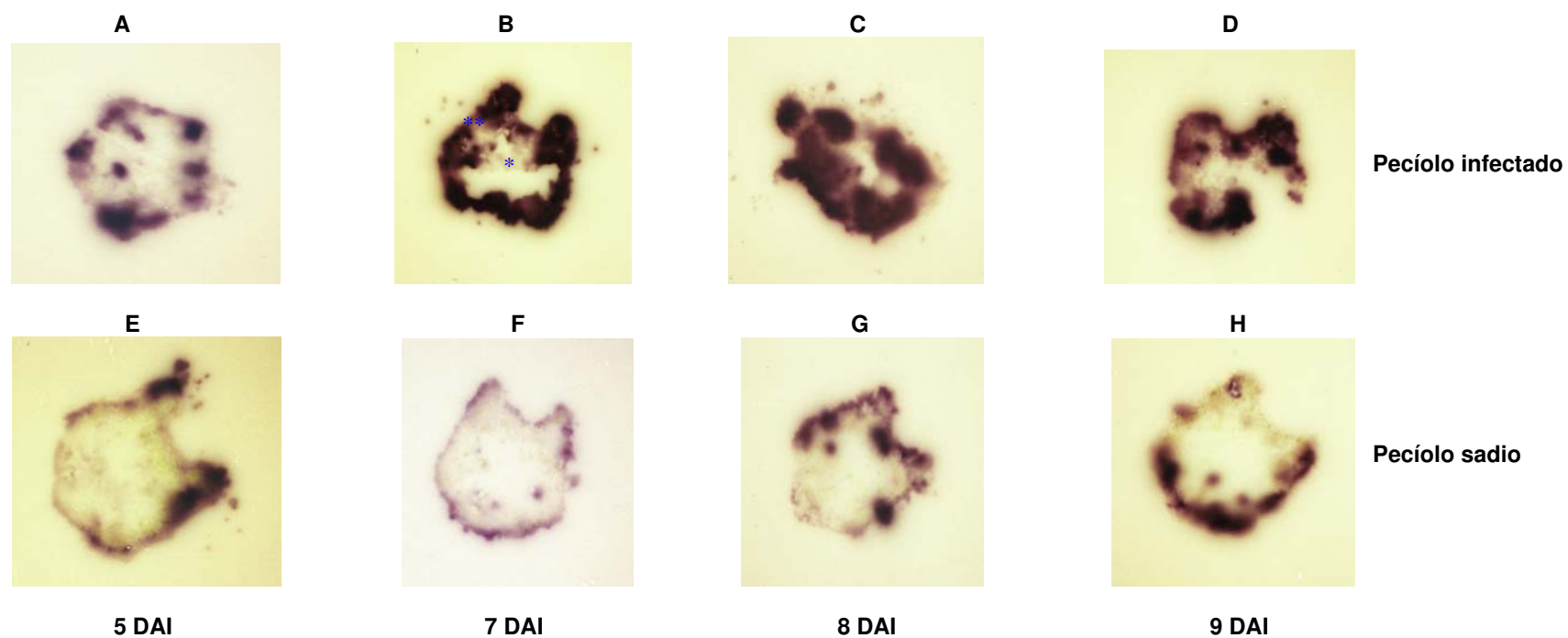


Figura 17. Localização das peroxidases em membranas de nitrocelulose impressas com cortes transversais no pecíolo infectado (A, B, C e D) e pecíolo sadio (E, F, G e H) da soja cv. BRS132. Dias após inoculação (DAI). Símbolos: ** - região periférica (epiderme, córtex e feixes vasculares) e * - região da medula.

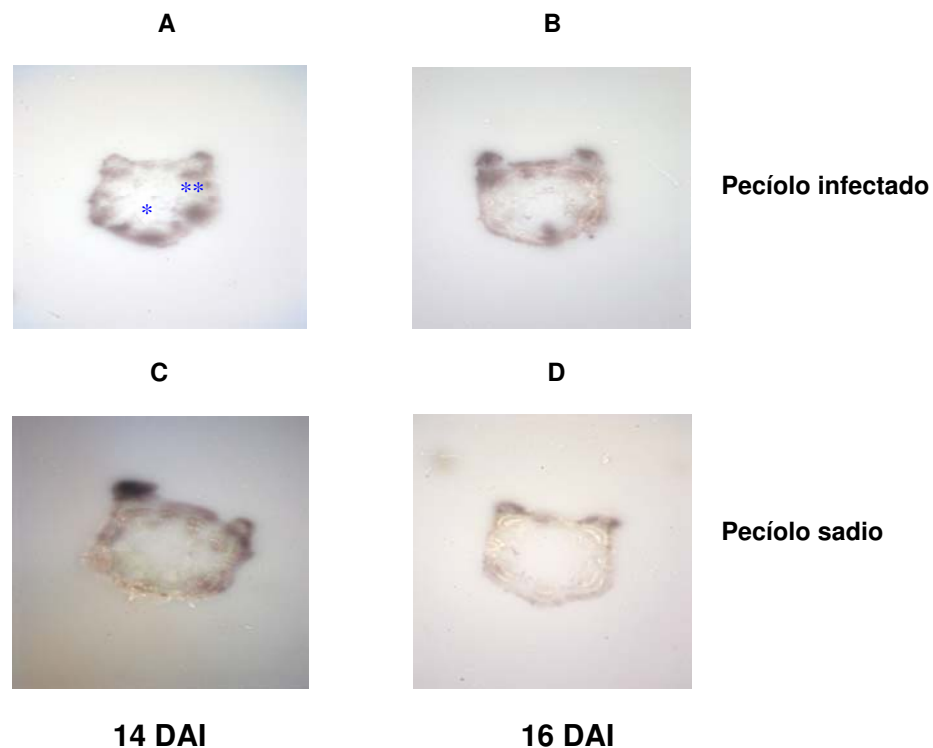


Figura 18. Localização das peroxidases em membranas de nitrocelulose impressas com cortes transversais no pecíolo infectado (A e B) e pecíolo sadio (C e D) da soja cv. IAC17. Dias após inoculação (DAI). Símbolos: ** - região periférica (epiderme, córtex e feixes vasculares) e * - região da medula.

4.1.8. Localização da siringaldazina peroxidase

A atividade da SPOX foi evidenciada pelo aparecimento da coloração rosa característica da oxidação do substrato siringaldazina. No pecíolo da primeira folha trifoliolada infectada de soja 'BRS132', o primeiro sinal da presença da SPOX ocorreu no 5º dia após inoculação, próximo à região periférica (Figura 19A). Nas plantas infectadas, a partir do 7º dia após inoculação, a reação foi muito intensa e distribuída na região periférica e na região da medula evidenciando, a presença expressiva da atividade de siringaldazina peroxidase (Figuras 19B a 19D). Nas plantas saudáveis, a reação foi observada principalmente na região periférica do pecíolo e com menor intensidade no período analisado (Figuras 19E a 19H).

No pecíolo de soja cv. IAC17, a coloração que caracteriza a atividade da siringaldazina peroxidase apresenta-se principalmente na região periférica, com maior intensidade nas plantas infectadas em relação às saudáveis (Figura 20A a 20D).

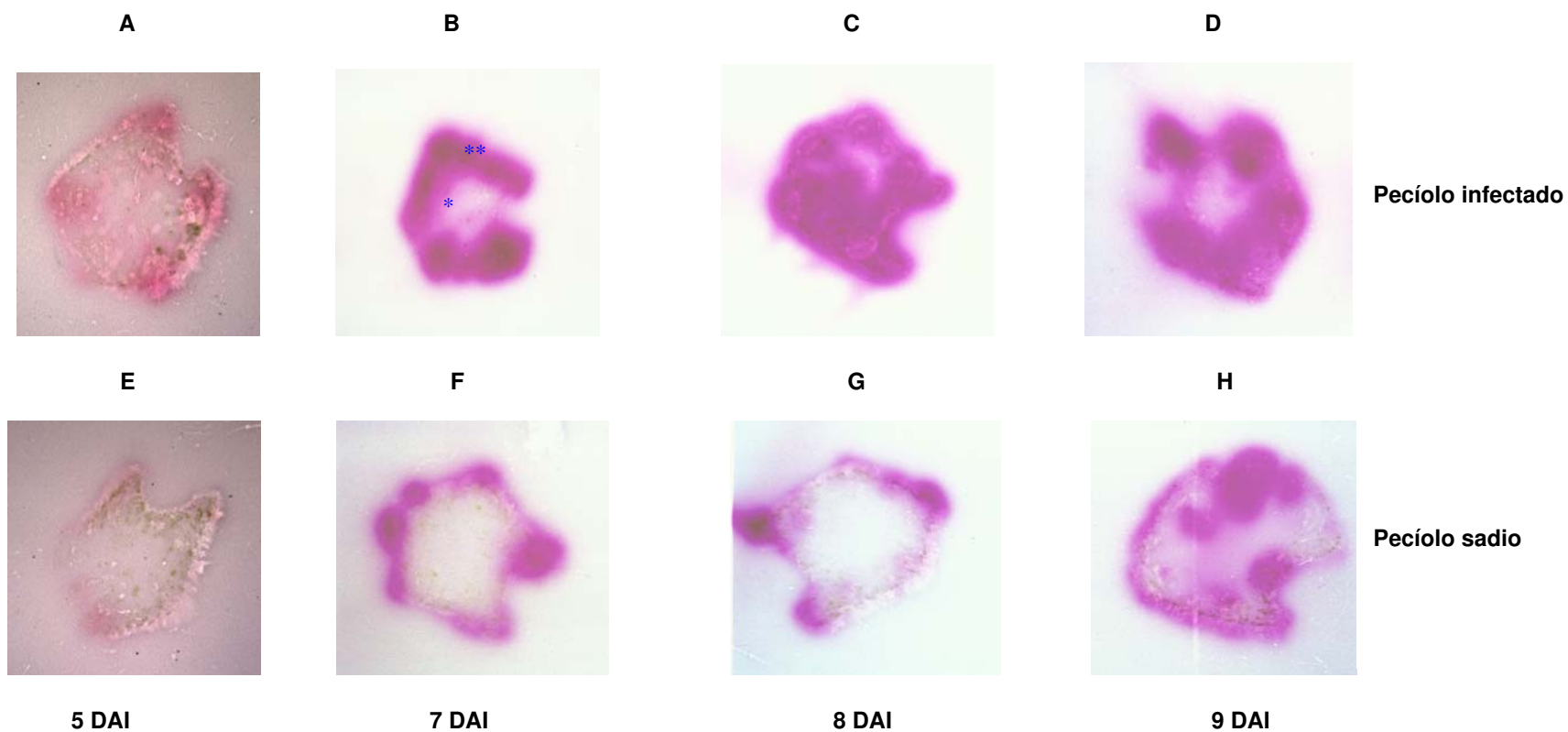


Figura 19. Localização da siringaldazina peroxidase em membranas de nitrocelulose impressas com cortes transversais no pecíolo infectado (A, B, C e D) e pecíolo sadio (E, F, G e H) da soja cv. BRS132. Dias após inoculação (DAI). Símbolos: ** - região periférica (epiderme, córtex e feixes vasculares) e * - região da medula.

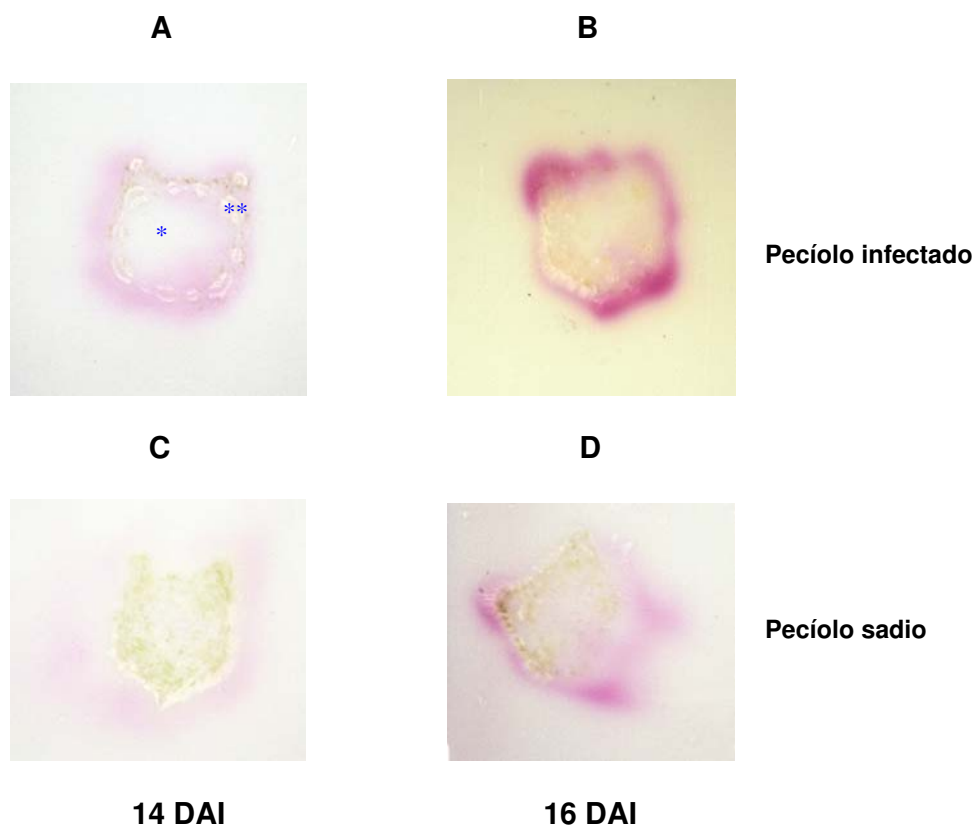


Figura 20. Localização da siringaldazina peroxidase em membranas de nitrocelulose impressas com cortes transversais no pecíolo infectado (A e B) e pecíolo sadio (C e D) da soja cv. IAC17. Dias após inoculação (DAI). Símbolos: ** - região periférica (epiderme, córtex e feixes vasculares) e * - região da medula.

4.2. Interação *Phaseolus vulgaris* 'BT2' e *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV)

Durante os primeiros 5 dias após inoculação não foram visíveis sintomas nas plantas de feijoeiro 'BT2'. Entre o 5º e 7º dia após inoculação ocorreu paralisação do crescimento e iniciou-se a fase aguda da doença. A partir do 8º dia após inoculação, a infecção sistêmica de feijoeiro 'BT2' pelo CABMV induziu resposta aguda com aparecimento sintomas de mosaico, maior rugosidade, lesões necróticas das nervuras e folíolos "fechados" na primeira folha trifoliolada (Figura 21). Frequentemente ocorreu abscisão precoce dos folíolos, sem que a folha tivesse atingido o tamanho normal. Na fase crônica da doença, que ocorreu já na segunda folha trifoliolada, observou-se diminuição do crescimento da planta e as novas folhas mostraram mosaico e deformação severa. O material examinado nos experimentos foi a primeira folha trifoliolada visando caracterizar a fase aguda da doença. As plantas sadias tiveram crescimento e desenvolvimento normais.

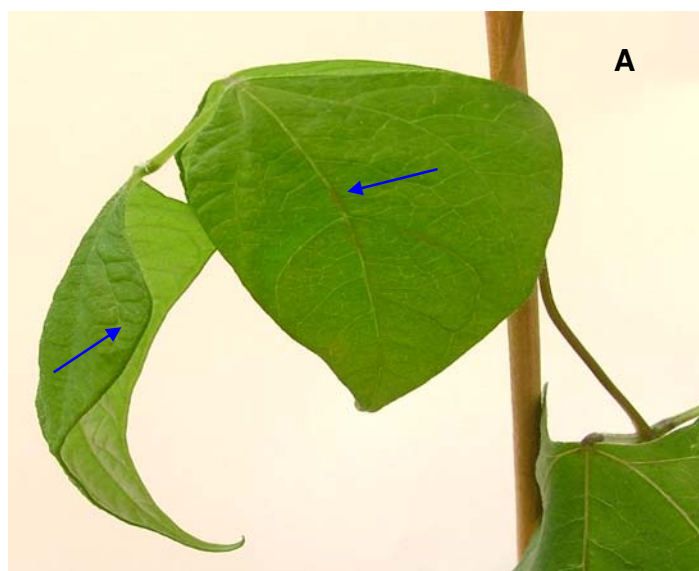


Figura 21. Feijoeiro 'BT2' mostrando sintomas de mosaico, maior rugosidade e lesões necróticas das nervuras e folíolos "fechados" na primeira folha trifoliolada (seta azul), no 9º dia após inoculação (foto A). Feijoeiro 'BT2' sadio (foto B).

4.2.1. Concentração de peróxido de hidrogênio

A concentração de peróxido de hidrogênio na primeira folha trifoliolada foi significativamente maior nas plantas infectadas em relação às plantas sadias, em média das quatro amostragens (Figura 22).

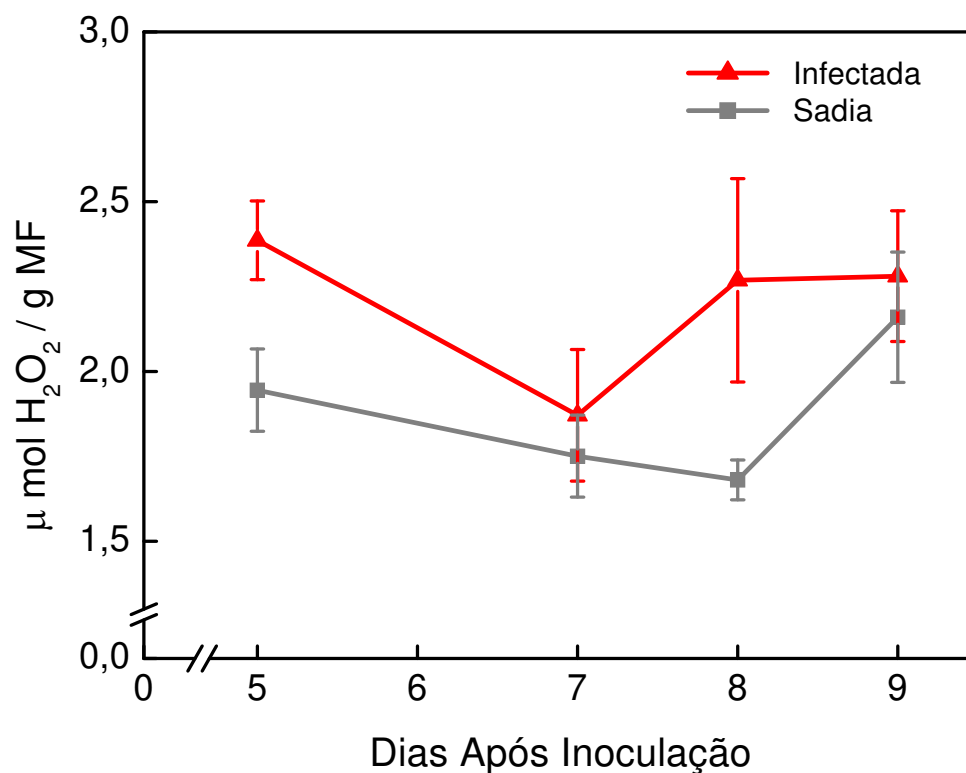


Figura 22. Concentração de peróxido de hidrogênio na primeira folha trifoliolada de feijoeiro cv. BT2. Médias de 4 repetições. Barras representam o erro padrão da média. Massa fresca (MF). Médias gerais entre infectadas e sadias significativamente diferentes a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

4.2.2. Atividade da superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase na primeira folha trifoliolada de feijoeiro 'BT2' apresentou valores similares nas plantas infectadas e nas sadias, em média das quatro amostragens (Figura 23).

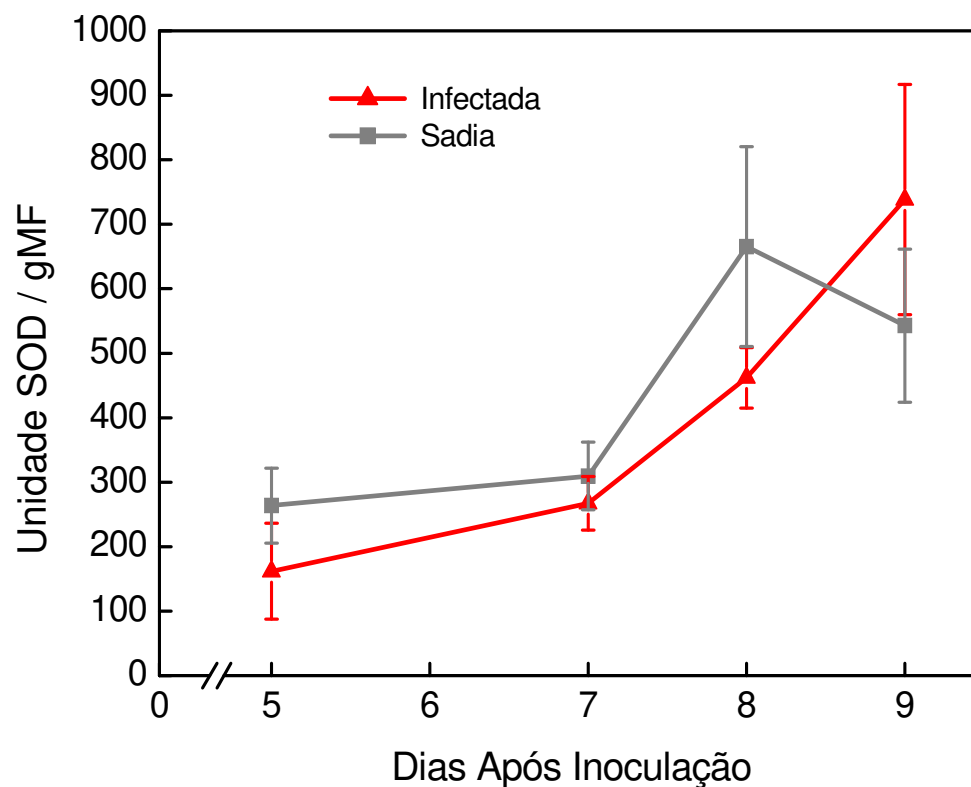


Figura 23. Atividade da superóxido dismutase na primeira folha trifoliolada de feijoeiro cv. BT2. Médias de 4 repetições. Barras representam o erro padrão da média. Massa fresca (MF). Médias gerais entre infectadas e sadias significativamente diferentes a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

4.2.3. Atividade da catalase

A atividade da catalase na primeira folha trifoliolada de feijoeiro cv. BT2 apresentou maiores valores nas plantas infectadas quando comparadas com as plantas sadias, em média das quatro amostragens (Figura 24). Nas plantas infectadas, não foram observadas variações na atividade da catalase durante os dias analisados, ao passo que nas plantas sadias os valores médios de atividade da CAT decresceram a partir do 7º dia após inoculação.

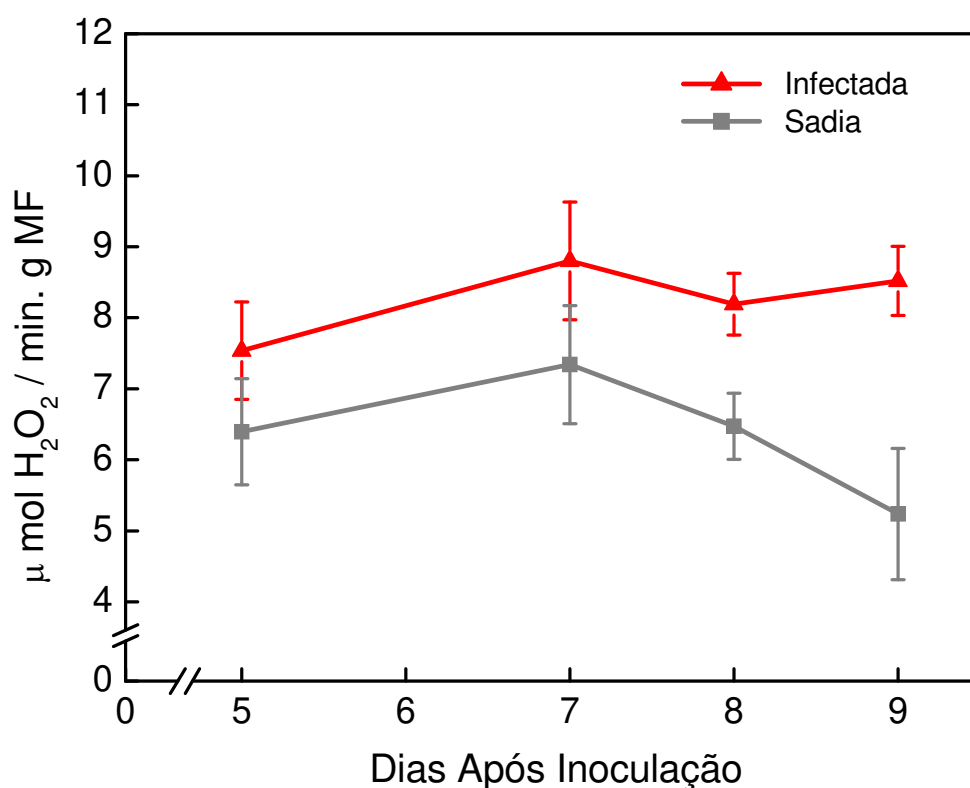


Figura 24. Atividade da catalase na primeira folha trifoliolada de feijoeiro cv. BT2. Médias de 4 repetições. Barras representam o erro padrão da média. Massa fresca (MF). Médias gerais entre infectadas e sadias significativamente diferentes a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

4.2.4. Atividade da ascorbato peroxidase

Os resultados de atividade da ascorbato peroxidase na primeira folha trifoliolada de feijoeiro 'BT2' evidenciaram diferenças significativas entre os valores de atividade nas plantas infectadas em relação às plantas sadias, em média das quatro amostragens (Figura 25). Nas plantas infectadas, a partir do 7º dia após inoculação os valores médios atingiram o dobro de atividade da APX, quando comparados com as plantas sadias.

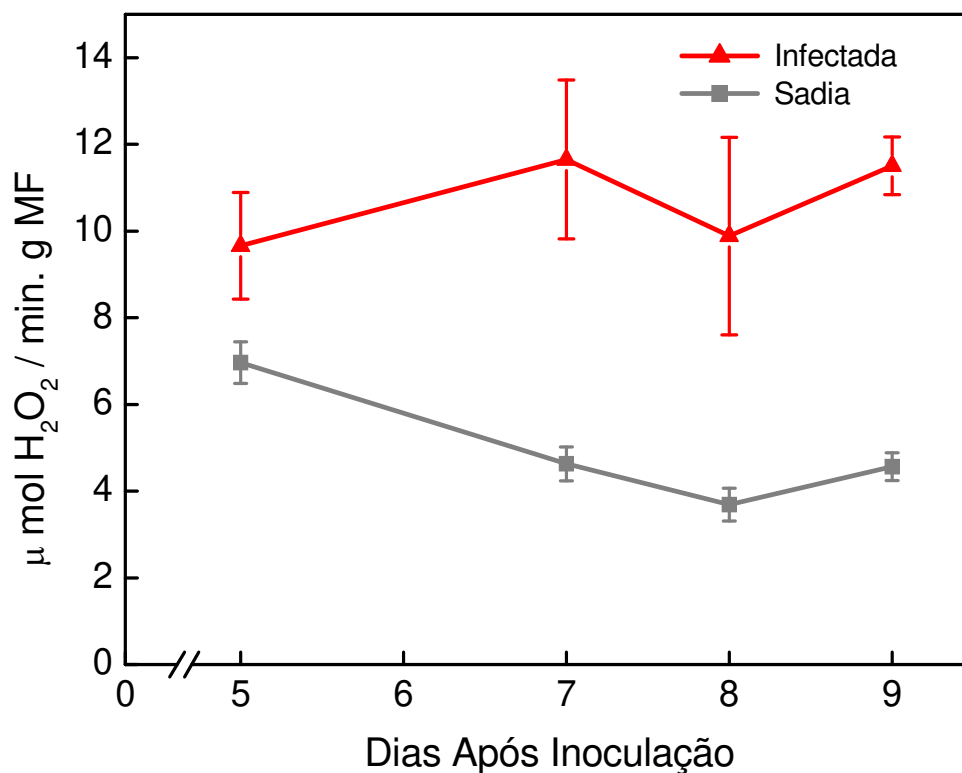


Figura 25. Atividade da ascorbato peroxidase na primeira folha trifoliolada de feijoeiro cv. BT2. Médias de 4 repetições. Barras representam o erro padrão da média. Massa fresca (MF). Médias gerais entre infectadas e sadias significativamente diferentes a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

4.2.5. Atividade da guaiacol peroxidase

A atividade da guaiacol peroxidase na primeira folha trifoliolada de feijoeiro cv. BT2 foi similar entre as plantas infectadas e as plantas sadias no 5º dia após inoculação (Figura 26). A partir do 7º dia após inoculação, a atividade da GPOX foi maior nas plantas infectadas em relação às sadias. No 9º dia após inoculação, a diferença de atividade da GPOX entre plantas infectadas e sadias foi bastante significativa, em torno de duas vezes maior para as plantas infectadas.

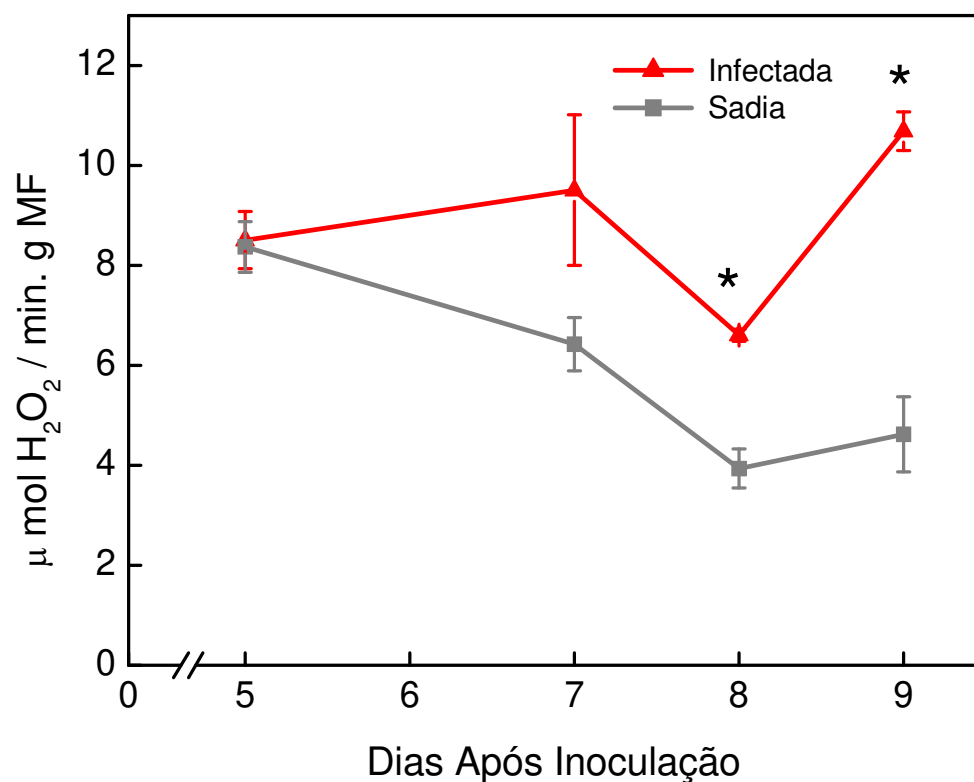


Figura 26. Atividade da guaiacol peroxidase na primeira folha trifoliolada de feijoeiro cv. BT2. Médias de 4 repetições. Barras representam o erro padrão da média. Massa fresca (MF). * - médias significativamente diferentes a 5% de probabilidade pelo teste t.

4.2.6. Atividade da siringaldazina peroxidase

A atividade da siringaldazina peroxidase na primeira folha trifoliolada de feijoeiro 'BT2' aumentou significativamente nas plantas infectadas em relação às plantas sadias (Figura 27). A partir do 7º dia após inoculação, a atividade da SPOX nas plantas infectadas foi de 2 a 3 vezes maior que as observadas nas plantas sadias. As plantas sadias não apresentaram alterações expressivas de atividade da enzima siringaldazina peroxidase durante os dias analisados

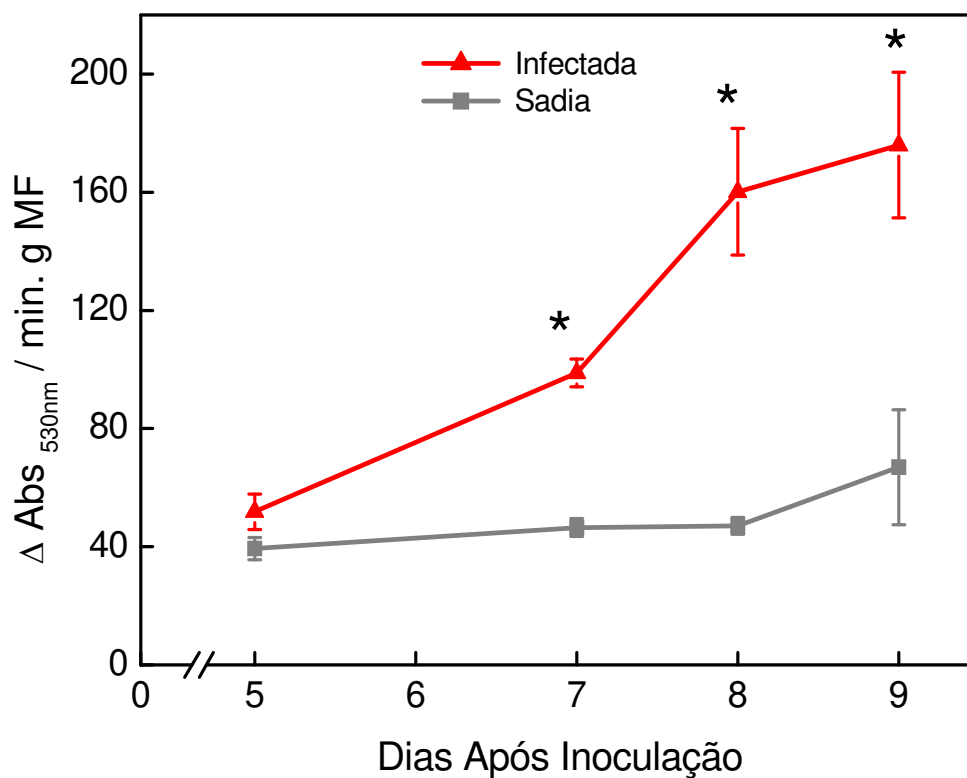


Figura 27. Atividade da siringaldazina peroxidase na primeira folha trifoliolada de feijoeiro cv. BT2. Médias de 4 repetições. Barras representam o erro padrão da média. Massa fresca (MF). * - médias significativamente diferentes a 5% de probabilidade pelo teste t.

4.2.7. Imuno-localização do CABMV

No feijoeiro cv. BT2 observou-se uma mudança gradual na distribuição do vírus nos tecidos do pecíolo da primeira folha trifoliolada e do caule. No pecíolo, as primeiras colorações que indicam a presença do CABMV ocorreram entre o 5º e 7º dia após inoculação, próximos à região periférica (Figuras 28A e 28B). No 8º dia após inoculação o vírus foi detectado na região da medula, com intensidade de coloração que indica concentrações do CABMV crescentes e coincidindo com a resposta aguda na primeira folha trifoliolada (Figura 28C). No 9º dia após inoculação, observou-se o pecíolo invadido, com distribuição generalizada, pelo CABMV (Figura 28D).

No caule do feijoeiro 'BT2', a invasão do CABMV foi detectada na região periférica entre o 5º e 7º dia após inoculação (Figura 29A e 29B). A partir do 8º dia após inoculação, o vírus espalhou-se de forma limitada para a região da medula (Figuras 29C e 29D).

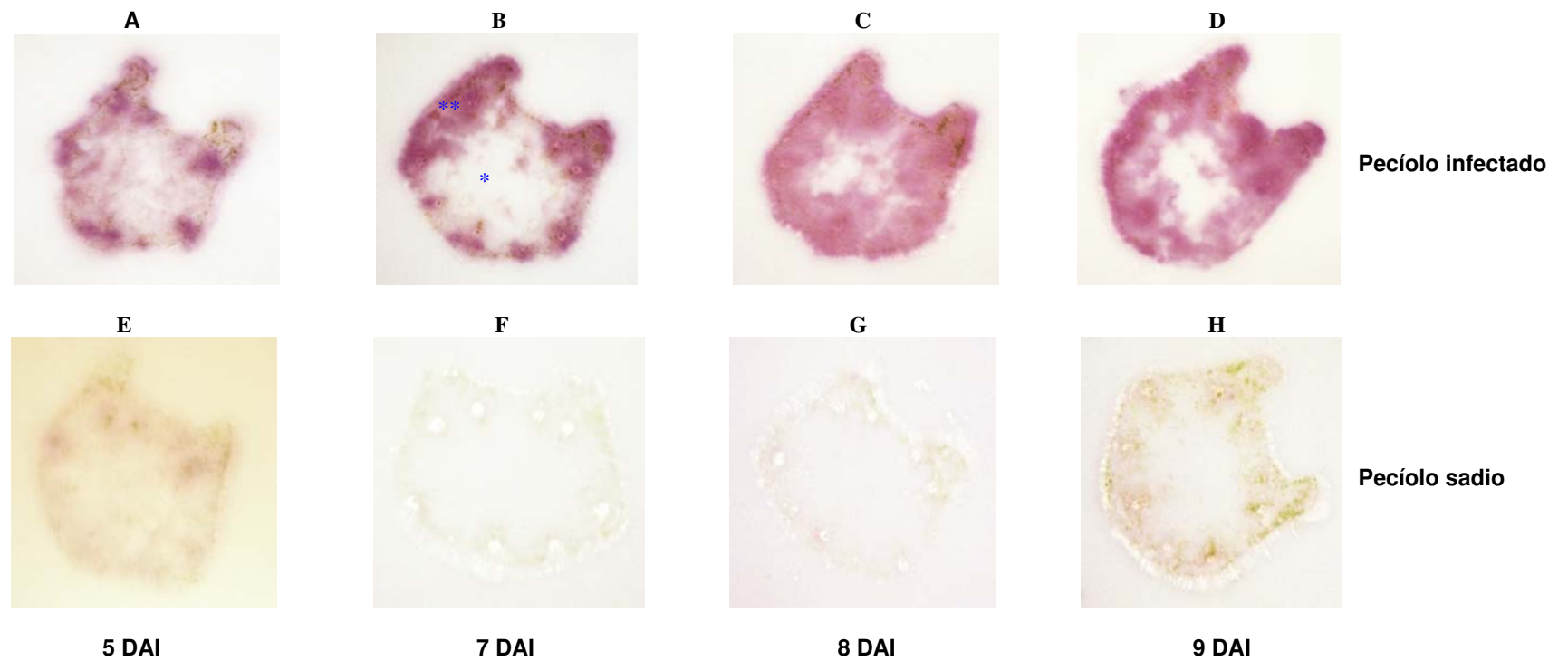


Figura 28. Imuno-localização do CABMV em membranas de nitrocelulose impressas com cortes transversais no pecíolo infectado (A, B, C e D) e pecíolo sadio (E, F, G e H) de feijoeiro cv. BT2. Dias após inoculação (DAI). Símbolos: ** - região periférica (epiderme, córtex e feixes vasculares) e * - região da medula.

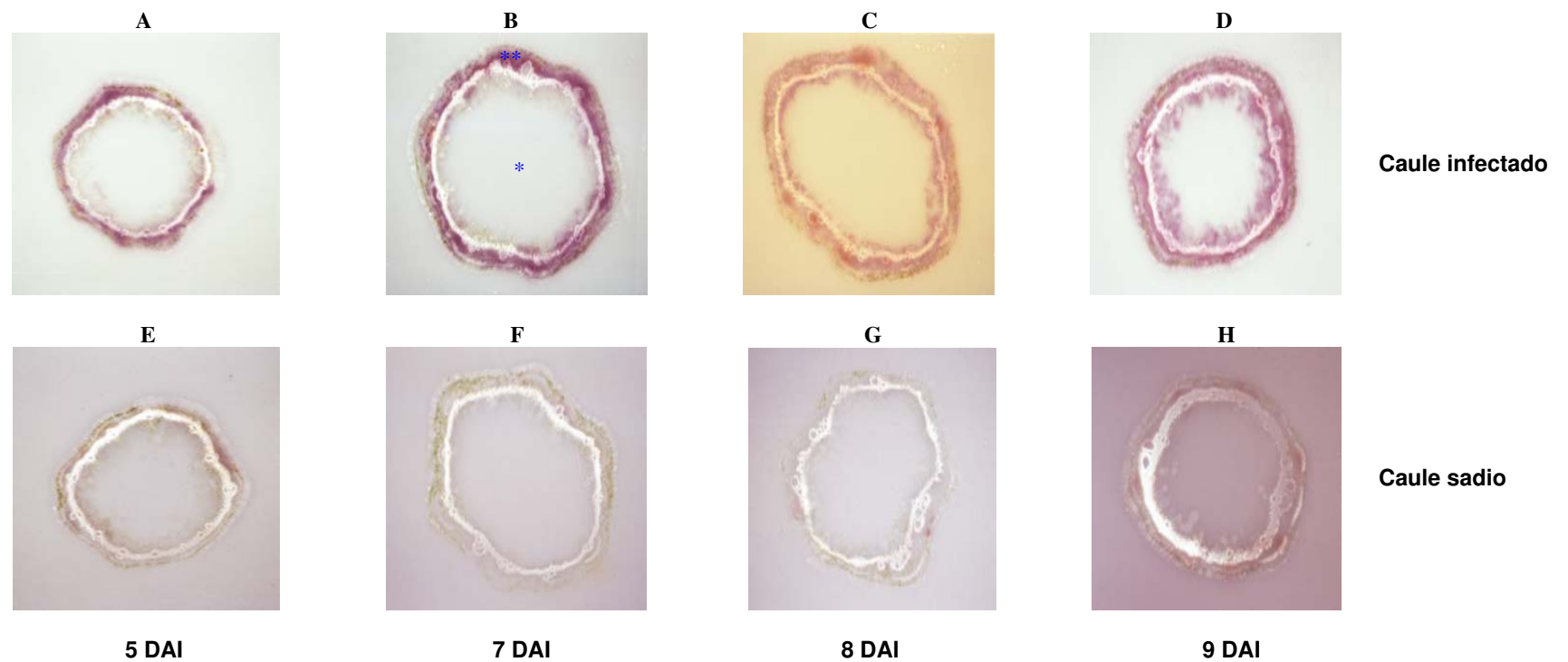


Figura 29. Imuno-localização do CABMV em membranas de nitrocelulose impressas com cortes transversais no caule infectado (A, B, C e D) e caule sadio (E, F, G e H) de feijoeiro cv. BT2. Dias após inoculação (DAI). Símbolos: ** - região periférica (epiderme, córtex e feixes vasculares) e * - região da medula.

6.2.8. Localização das peroxidases

A atividade das peroxidases foi evidenciada pelo aparecimento da coloração escura característica da oxidação do substrato 4-cloronaftol. No pecíolo da primeira folha trifoliolada infectada de feijoeiro 'BT2' foi observada reação muito intensa e distribuída na região periférica e na região da medula, evidenciando a presença expressiva de atividade das peroxidases (Figuras 30A a 30D). Nas plantas sadias, a reação foi observada principalmente na região periférica do pecíolo e com menor intensidade durante o período analisado quando comparadas com as plantas infectadas (Figuras 30E a 30H).

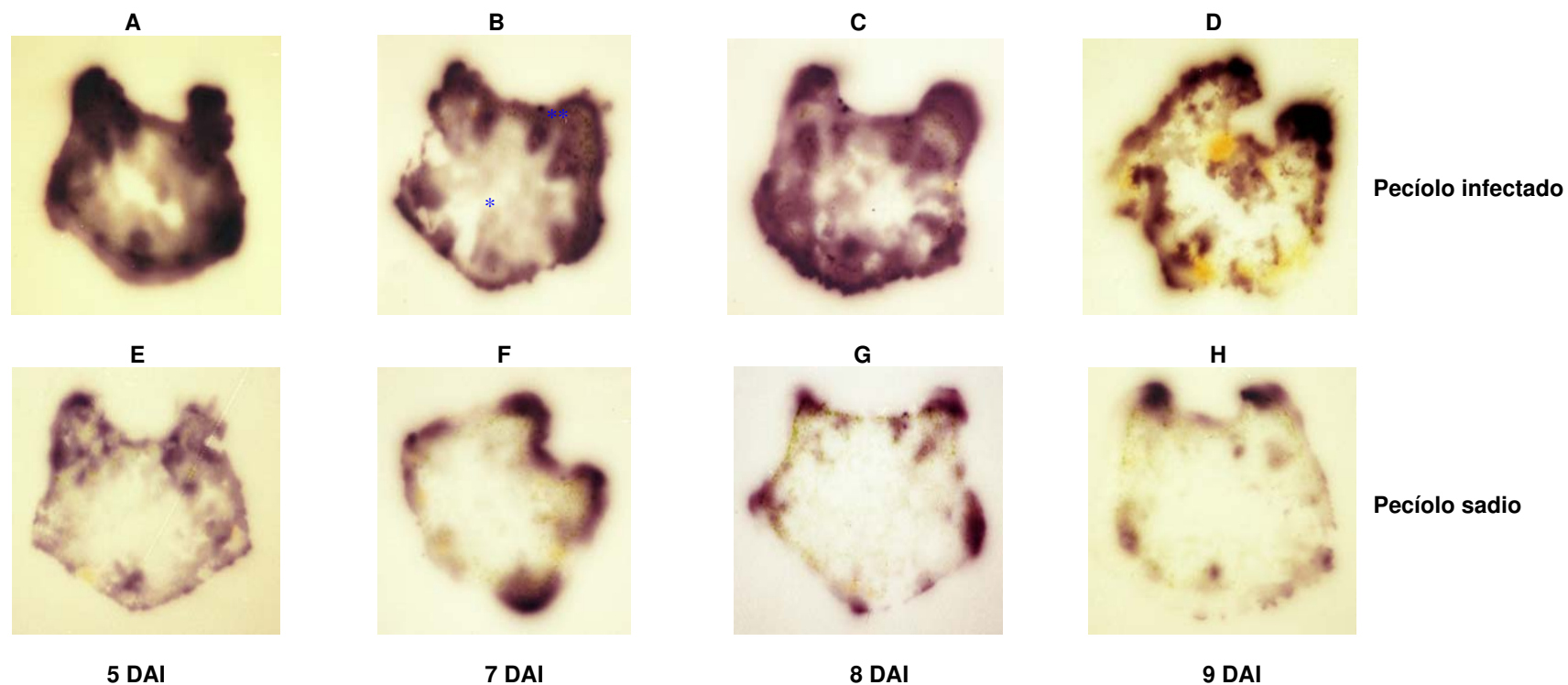


Figura 30. Localização das peroxidases em membranas de nitrocelulose impressas com cortes transversais no pecíolo infectado (A, B, C e D) e pecíolo sadio (E, F, G e H) de feijoeiro cv. BT2. Dias após inoculação (DAI). Símbolos: ** - região periférica (epiderme, córtex e feixes vasculares) e * - região da medula.

6.2.9. Localização da siringaldazina peroxidase

A atividade da SPOX foi evidenciada pelo aparecimento da coloração rosa característica da oxidação do substrato siringaldazina. No pecíolo da primeira folha trifoliolada infectada, o primeiro sinal da presença da siringaldazina peroxidase ocorreu no 5º dia após inoculação, próximo à região periférica (Figura 31A). Nas plantas infectadas a partir do 7º dia após inoculação, a reação foi muito intensa e distribuída na região periférica e na região da medula evidenciando a presença expressiva da atividade de siringaldazina peroxidase (Figuras 31B a 31D). Nas plantas sadias, a reação foi observada principalmente na região periférica do pecíolo e com menor intensidade durante o período analisado quando comparada com a de plantas infectadas (Figuras 31E a 31H).

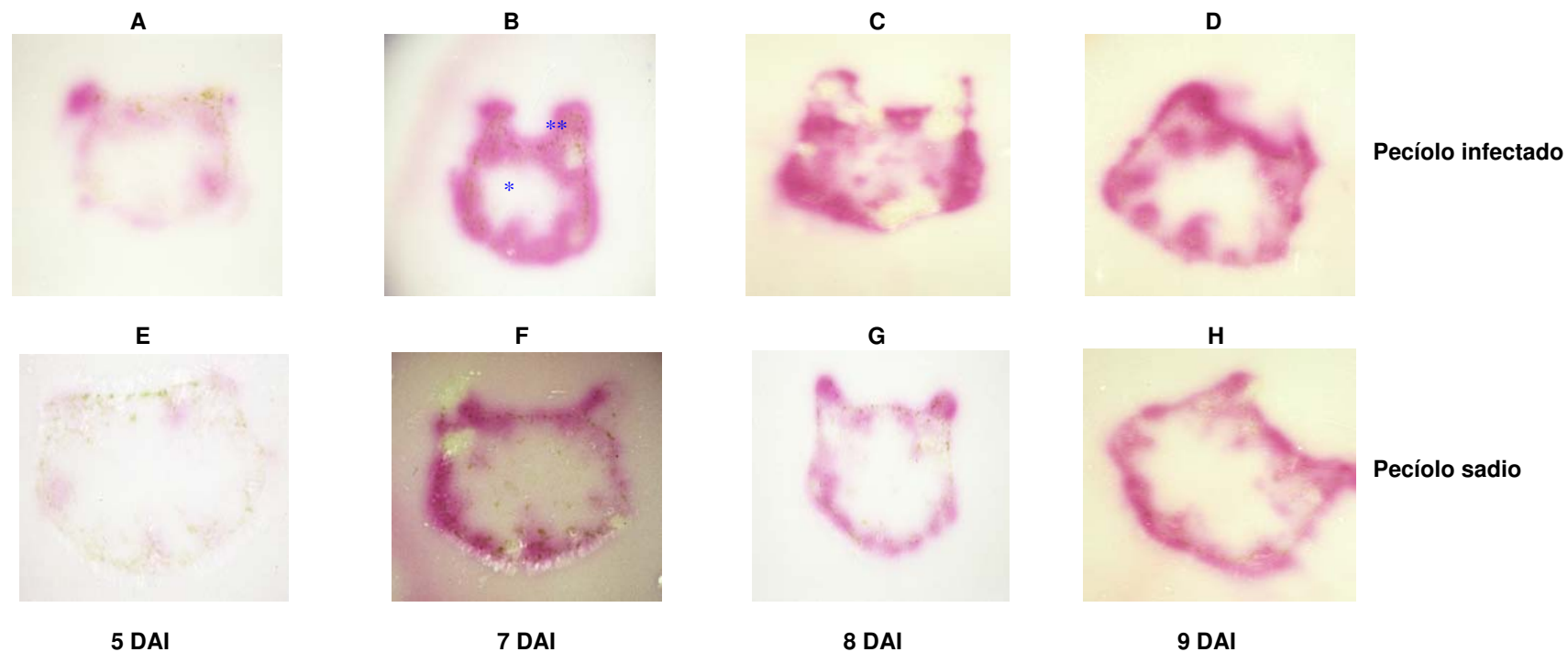


Figura 31. Localização da siringaldazina peroxidase em membranas de nitrocelulose impressas com cortes transversais no pecíolo infectado (A, B, C e D) e pecíolo sadio (E, F, G e H) de feijoeiro cv. BT2. Dias após inoculação (DAI). Símbolos: ** - região periférica (epiderme, córtex e feixes vasculares) e * - região da medula.

5. Discussão

5.1. Interação *Glycine max* e *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV)

As análises bioquímicas, imuno-localização e localização enzimática feitas durante o período de aparecimento dos sintomas nas folhas trifolioladas evidenciaram alterações na fisiologia das plantas de soja 'BRS132' e 'IAC17'. Os dados mostraram que o estresse oxidativo é um importante componente de resposta fisiológica das plantas analisadas.

Nas folhas trifolioladas das plantas de soja cvs. BRS132 e IAC17 infectadas pelo CPMMV ocorreram aumentos de H_2O_2 , de 29% e 35%, respectivamente, em relação às plantas saudáveis. Na soja 'BRS132', este aumento já ocorreu no 5º dia após inoculação, o que corresponde a 2 dias antes do início da fase aguda na primeira folha trifoliolada. Já na soja 'IAC17', o aumento ocorreu no 14º dia após inoculação, coincidindo com o aparecimento de mosaico leve na segunda folha trifoliolada. Apesar de as espécies reativas de oxigênio serem geradas como compostos secundários de diversas vias metabólicas aeróbicas, os aumentos nas concentrações de ROS são tipicamente induzidos por estresses bióticos e abióticos (Torres *et al.* 2006). Estes aumentos, incluindo o de H_2O_2 , ocorrem após a infecção por patógenos e possivelmente são causas do aumento das atividades enzimáticas envolvidas na remoção de ROS (Baker *et al.* 1995).

Várias enzimas antioxidantes têm suas atividades aumentadas nas folhas de plantas em resposta à infecção viral, minimizando os efeitos do estresse oxidativo. A catalase é a enzima envolvida diretamente na remoção do peróxido de hidrogênio. As atividades da CAT nas folhas trifolioladas de plantas de soja infectadas 'BRS132' e 'IAC17' aumentaram aproximadamente 40% e 100%, respectivamente, em relação às plantas de soja saudáveis, possivelmente indicando maior proteção e eficiência na remoção do H_2O_2 nas folhas de soja 'IAC17', pouco

sensível ao CPMMV. Isto sugere que a infecção viral desencadeou aumento na atividade de isoformas de catalase da classe 1, que é altamente expressa em folhas durante a fotorespiração (Dat *et al.* 2000). Outra possível explicação é que segundo Feierabend (2005), a reação catalítica da CAT não segue a cinética de Michaelis-Menten, mas a atividade aumenta linearmente com a concentração do H_2O_2 sem haver saturação. Isto pode explicar os maiores aumentos de atividade da CAT nas folhas trifolioladas de soja infectadas, que apresentando resposta aguda atingiram maiores concentrações de peróxido de hidrogênio.

A ascorbato peroxidase é uma das primeiras enzimas a ter sua atividade aumentada durante a remoção do peróxido de hidrogênio e proteção contra danos oxidativos (Asada, 2006). A atividade da APX aumentou aproximadamente 80% em ambas cultivares de soja, quando infectadas pelo CPMMV. Entretanto, ocorreram decréscimos de aproximadamente 50% na atividade da APX nas folhas de soja cv. BRS132 entre o 5º e o 8º dia após inoculação. Nesta cultivar, ocorreram necrose e amarelecimento na primeira folha trifoliolada a partir do 7º dia após inoculação, início da resposta aguda ao CPMMV, provavelmente danificando de forma expressiva os cloroplastos. Este processo culminou com a abscisão dos folíolos entre o 8º e 10º dia após inoculação. Esta observação é consistente com o fato de não ocorrer queda da atividade da APX na soja 'IAC17', cujas folhas não sofrem amarelecimento nem necrose. Uma possível explicação é a de que devido à produção de peróxido de hidrogênio, em excesso, no fotossistema I do cloroplasto induzido pela infecção do CPMMV, provavelmente a atividade da APX aumentou antes da intensificação dos sintomas nas folhas para a proteção do cloroplasto (Quecini *et al.* 2007).

Os dados sugerem que os aumentos em paralelo da concentração de H_2O_2 e das atividades das enzimas CAT e APX, antes da fase aguda na soja 'BRS132'

e no início do aparecimento de mosaico leve na soja 'IAC17', sejam em resposta de proteção às organelas peroxissoma e cloroplasto. Por isso os aumentos relativos das atividades da CAT e da APX foram bem superiores ao aumento final de concentração de H_2O_2 .

As respostas enzimáticas antioxidantes não ficaram restritas às atividades da CAT e APX. Na soja 'BRS132', ocorreu aumento de aproximadamente 100% da atividade da GPOX, concomitantemente ao aparecimento de sintomas na primeira folha trifliolada. Enquanto que na soja 'IAC17', ocorreu aumento de aproximadamente 60% da atividade da GPOX, e com valores de atividade da GPOX inferiores.

Na planta de soja cv. BRS132 ocorreu paralisação do crescimento antes do início da fase aguda. É possível que a peroxidase esteja envolvida na redução do crescimento das plantas infectadas. Alguns autores enfatizam que através de rota secundária, pode ocorrer biodegradação do ácido-indol-3-acético com participação de peroxidases (Kawano, 2003; Taiz & Zeiger, 2004). Uma outra possibilidade é que as peroxidases estejam envolvidas na geração de H_2O_2 e de formas mais deletérias de espécies reativas de oxigênio, como o radical hidroxil (Passardi *et al.* 2004), induzindo a morte da planta após a resposta aguda. Na soja cv. IAC17, pouco sensível ao CPMMV, o aumento observado na atividade da GPOX provavelmente contribuiu para a manutenção da concentração de peróxido de hidrogênio em valores tolerados pela planta.

A siringaldazina peroxidase associada à parede celular, têm sido descrita como agente catalítico do último passo da biossíntese de ligninas (Goldberg *et al.* 1985). Do ponto de vista fisiopatológico, a lignificação tem sido estudada como parte dos mecanismos de defesa da planta contra diversos patógenos. Na soja 'BRS132' ocorreu aumento de aproximadamente 300% da atividade da SPOX,

concomitantemente ao aparecimento de sintomas de mosaico e necrose na primeira folha trifliolada. Enquanto que na soja 'IAC17' ocorreu aumento médio de aproximadamente 200% da atividade da SPOX, porém com valores de atividade da SPOX maiores, quando comparados aos da soja cv. 'BRS132'. As peroxidases, GPOX e SPOX, aumentaram suas atividades durante o período analisado e em paralelo com a intensificação dos sintomas nas plantas infectadas, possivelmente atuando em resposta defensiva.

A invasão sistêmica foi evidenciada pelo aparecimento de sintomas e pelos testes de localização do CPMMV. Os tecidos da soja 'BRS132' foram invadidos pelo vírus de maneira generalizada, mostrando diferenças quando comparados com a soja 'IAC17', principalmente no caule (Figuras 14 e 16). Nas plantas de soja 'BRS132', o caule foi totalmente invadido pelo vírus, ao passo que na variedade pouco sensível, soja 'IAC17', o vírus ficou restrito à região periférica do caule. Isto sugere que a diferença de severidade durante a infecção sistêmica esteja relacionada com a habilidade de o vírus invadir os tecidos.

Os dados mostraram que apesar do expressivo aumento da SPOX, enzima associada ao processo de lignificação, o CPMMV foi encontrado em diferentes partes da planta indicando que se houve deposição de lignina, esta não foi capaz de restringir o espalhamento do vírus. É importante ressaltar que nas plantas infectadas de soja cv. IAC17 ocorreu atividade da SPOX bem maiores que na soja 'BRS132', e que na variedade pouco sensível o espalhamento do vírus foi bem menor. Portanto, provavelmente a SPOX esteja relacionada de alguma forma, à restrição para o espalhamento do vírus, seja pela síntese de lignina ou por outros mecanismos.

A localização das peroxidases e da siringaldazina peroxidase, na soja 'BRS132' e 'IAC17' ocorreu nas mesmas regiões dos tecidos do pecíolo onde foi

localizado o CPMMV pelo método da imuno-localização. Também a intensidade da coloração foi proporcional às atividades enzimáticas da GPOX e SPOX, determinadas bioquimicamente nas folhas trifolioladas das duas cultivares. A localização da siringaldazina peroxidase foi prejudicada pela solubilidade do produto da reação, que sofre difusão na membrana, mesmo tomando-se cuidado para evitá-la.

5.2. Interação *Phaseolus vulgaris* 'BT2' e *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV)

A infecção sistêmica de feijoeiro 'BT2' induzida pelo CABMV resultou em respostas fisiopatológicas que desencadearam o aparecimento de sintomas já na primeira folha trifoliolada (Figura 21), e nos estágios posteriores observou-se diminuição do crescimento e deformação severa nas novas folhas. Conforme os resultados das análises bioquímicas, imuno-localização e localização enzimática o estresse oxidativo é um importante componente de resposta fisiológica do feijoeiro 'BT2'.

Durante o período analisado observou-se aumento de aproximadamente 20% na concentração de peróxido de hidrogênio na primeira folha trifoliolada de plantas de feijoeiro infectadas pelo CABMV, em relação às plantas sadias. Este aumento ocorreu no 5º dia após inoculação que corresponde a 2 dias antes do início da fase aguda na primeira folha trifoliolada. Aumentos nas concentrações de ROS, incluindo o de H₂O₂, têm ocorrido após a infecção por patógeno e tem sido sugerido que este seria o causador do aumento das atividades enzimáticas envolvidas na remoção de ROS (Baker *et al.* 1995).

Várias enzimas antioxidantes têm suas atividades aumentadas nas folhas de plantas em resposta à infecção viral, minimizando os efeitos do estresse oxidativo. A atividade da superóxido dismutase na primeira folha trifoliolada de feijoeiro foi similar nas plantas sadias e nas infectadas, indicando que esta enzima não estaria envolvida na resposta à infecção viral.

A atividade da catalase geralmente aumenta em resposta à elevada concentração de H₂O₂ durante a infecção viral (Riedle-Bauer, 2000). Esta enzima teve sua atividade aumentada em torno de 25% nas plantas infectadas de feijoeiro, em relação às plantas sadias. Provavelmente, a infecção viral

desencadeou aumento da atividade de isoformas de catalase da classe 1 que é altamente expressa em folhas durante a fotorespiração (Dat *et al.* 2000). Uma possibilidade é que segundo Feierabend (2005), a reação catalítica da CAT não segue a cinética de Michaelis-Menten, mas a atividade aumenta linearmente com a concentração do H_2O_2 sem saturação. Isto pode explicar os aumentos de atividade da CAT nas folhas trifolioladas de feijoeiro 'BT2' infectadas, que mesmo antes da resposta aguda atingiram maiores concentrações de peróxido de hidrogênio.

A atividade da ascorbato peroxidase na primeira folha trifoliolada das plantas infectadas de feijoeiro cv. BT2 aumentou 110%, em relação às plantas sadias. O aumento da APX pode ser devido à resposta do feijoeiro cv. BT2 para o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio, inclusive antes da resposta aguda na primeira folha trifoliolada. Uma possível explicação é que houve produção de peróxido de hidrogênio, em excesso, no fotossistema I do cloroplasto induzido pela infecção do CABMV. Provavelmente a atividade da APX aumenta antes do aparecimento do mosaico na fase aguda para a proteção do cloroplasto.

Outra possibilidade de associação, é que o aumento em paralelo da concentração de H_2O_2 e das atividades das enzimas CAT e APX, que precedem à fase aguda no feijoeiro 'BT2', seja em resposta protetora às organelas peroxissoma e cloroplasto. Por isso os aumentos relativos da atividade da CAT e da APX foram bem superiores ao aumento final de concentração de H_2O_2 .

As respostas enzimáticas antioxidantes não ficaram restritas às atividades da CAT e APX. No feijoeiro, ocorreu aumento de aproximadamente 50% na atividade da GPOX nas folhas infectadas, a partir do 7º dia após inoculação, que coincide com a paralisação do crescimento e o início da resposta aguda na primeira folha trifoliolada. Alguns autores enfatizam que através de rota

secundária pode ocorrer biodegradação do ácido-indol-3-acético com participação de peroxidase (Kawano, 2003; Taiz & Zeiger, 2004). É possível que a peroxidase esteja envolvida na redução do crescimento das plantas infectadas de feijoeiro.

No feijoeiro 'BT2', ocorreu aumento gradual de até 300% na atividade da SPOX, concomitantemente à intensificação dos sintomas nas plantas infectadas.

Os tecidos do pecíolo de feijoeiro foram invadidos pelo CABMV, que apareceu distribuído de maneira generalizada, principalmente entre o 7º e 8º dias após inoculação, quando começou a ocorrer abscisão precoce dos folíolos. No caule o espalhamento do vírus foi menor ficando restrito à região periférica. Provavelmente, o fato de o CABMV não invadir todos os tecidos do caule, como ocorreu em plantas de soja 'BRS132', fez com que no feijoeiro a infecção viral não levasse à morte da gema apical, como observado nessa cultivar de soja.

Nas plantas infectadas ocorreu expressivo aumento de atividade da SPOX, enzima associada ao processo de lignificação. O CABMV foi localizado em diferentes partes da planta indicando que se houve deposição de lignina, esta não foi capaz de restringir o espalhamento do vírus nos tecidos do pecíolo. Por outro lado, provavelmente a atividade da SPOX esteja relacionada de alguma forma, à restrição para o espalhamento do vírus, seja pela síntese de lignina ou por outros mecanismos, principalmente nos tecidos do caule.

A localização das peroxidases e da siringaldazina peroxidase no feijoeiro ocorreu nas mesmas regiões dos tecidos do pecíolo, onde foi localizado o CABMV pelo método da imuno-localização. A distribuição das referidas enzimas foi sempre maior nos tecidos infectados em relação aos tecidos sadios. É possível correlacionar a intensidade da coloração às atividades enzimáticas, de GPOX e SPOX, determinadas bioquimicamente nas folhas trifolioladas.

6. Considerações finais

A cultivar pouco sensível, soja 'IAC17', ao CPMMV teve aumento de H_2O_2 da ordem de 35% e de 100% de atividade da CAT, em relação às plantas sadias. Por sua vez, a soja 'BRS132', mais sensível, teve aumento de 29% de H_2O_2 e de 40% de atividade da CAT, em relação às plantas sadias. Isto sugere que a produção de H_2O_2 na soja 'IAC17' infectada seja maior que na soja 'BRS132', visto que mesmo com aumento maior de atividade da CAT e outras enzimas detoxificantes, a soja 'IAC17' manteve maiores concentrações de H_2O_2 . No 16º dia após inoculação, observou-se diminuição da concentração de H_2O_2 que pode estar relacionada com o aumento expressivo das atividades da GPOX e SPOX na soja 'IAC17'. Provavelmente, estas mudanças têm relação com o estabelecimento da fase crônica da doença, em oposição à fase aguda observada na soja 'BRS132'.

Com relação à resposta aguda ao CPMMV, na soja 'BRS132' o aumento de atividade da SPOX ocorreu tardiamente, no 8º dia após inoculação, quando já havia sintomas de invasão pelo CPMMV. Na soja 'IAC17', a atividade da SPOX aumentou mais de 100% no 14º dia após inoculação, isto no mesmo dia em que se observou sintoma na segunda folha trifoliolada, e no 16º dia após inoculação o aumento foi de cerca de 300%. Nesta cultivar a invasão do vírus foi limitada à parte periférica tanto no pecíolo como no caule. Possivelmente, o aumento de atividade da SPOX esteja relacionado à restrição ao espalhamento do vírus e a diferença de severidade durante a infecção sistêmica esteja relacionada com a habilidade de o vírus invadir os tecidos.

No feijoeiro 'BT2', a infecção pelo CABMV provocou uma resposta semelhante à observada na soja 'BRS132', com algumas diferenças relacionadas ao fato de que neste caso, a infecção sistêmica de feijoeiro induzida pelo CABMV

não resultou na morte da planta. Também se observou aumento expressivo da atividade da SPOX no 7º dia após inoculação, diferente da soja 'BRS132' em que este aumento ocorreu mais tarde. A invasão generalizada dos vírus no pecíolo foi semelhante em feijoeiro 'BT2' e soja 'BRS132', principalmente nos dias em que começou a ocorrer abscisão dos folíolos. Já a invasão do caule foi generalizada em soja 'BRS132' e limitada à região periférica em feijoeiro.

Possivelmente, o aumento precoce de atividade da SPOX, já no 7º dia após inoculação, limitou a invasão do vírus aos tecidos periféricos do caule. Isto explicaria o fato de o feijoeiro 'BT2' não sofrer morte da gema apical e da planta, nas condições experimentadas. Nas plantas de soja '132', o aumento tardio de atividade da SPOX, que ocorreu somente no 8º dia após inoculação não impediu a invasão do CPMMV no caule e morte da planta.

7. Literatura citada

Adams, M. J., Antoniw, J. F. & Fauquet, C. M. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. Arch. Virol. 150: 459-479.

Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. Meth. Enzymol. 105: 121-126.

Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. 5^a Edition, Academic Press, London, 952p

Almeida, A. M. R., Ferreira, L. P., Yorinori, T. J., Silva, J. F. V., Henning, A. A., Godoy, C. V., Costamilan, L. M. & Meyer, M. C. 2005a. Doenças da soja. IN: Manual de fitopatologia (Kimati, H., Amorim, Resende, J. A. M. & Camargo, L. E. A. eds). 4^a Edição, São Paulo, Editora Ceres. pp. 569- 588.

Almeida, A. M. R., Piuga, F. F., Marin, S. R. R., Kitajima, E. W., Gaspar, J. O., Oliveira, T. G. & Moraes, T. G. 2005b. Detection and partial characterization of a Carlavirus causing stem necrosis of soybean in Brazil. Fitopat. Bras. 30(2):191-194.

Amako, K., Chen, G. X. & Asada, K. 1994. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. Plant Cell Physiol. 35(3): 497-504.

Antignus, Y. & Cohen. 1987. Purification and some properties of a new strain of *cowpea mild mottle virus* in Israel. Ann. Appl. Biol. 110: 563-569.

Apel, K. & Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.

Arias, M. C., Luna, C., Rodríguez, M., Lenardon, S. & Taleisnik, E. 2005. *Sunflower chlorotic mottle virus* in compatible interactions with sunflower: ROS generation and antioxidant response. *Europ. J. Plant Pathol.* 113: 223-232.

Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant.* 85: 235-241.

Asada, K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* 141: 391-396.

Avdiushko, S. A., Ye, X. S. & Kuc, J. 1993. Detection of several enzymatic activities in leaf prints of cucumber plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 42: 441- 454.

Baker, C. J. & Orlandi, E. W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.* 33: 299- 321.

Banci, L. 1997. Structural properties of peroxidases. *J. Biotechnol.* 53: 253- 263.

Barceló, A. R., Pomar, F., Serrano, M. L. & Pedreño, M. A. 2003. Peroxidase: a multifunctional enzyme in grapevines. *Funct. Plant Biol.* 30: 577-591.

Boudet, A. M. 2000. Lignins and Lignification: Select issues. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 81-96.

Brunt, A. A. & Kenten, R. H. 1973. Cowpea mild mottle, a newly recognized virus infecting cowpea (*Vigna unguiculata*) in Ghana. Ann. Appl. Biol. 74: 67-74.

Buchanan, B. B., Gruissem, W. & Jones, R. L. 2000. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Rockville, Maryland, 1406p.

Catesson, A. M., Czaninski, Y. & Monties, B. 1978. Caractères histochimiques des peroxydases pariétales dans les cellules en cours de lignification. C. R. Acad. Sc. Paris. 286: 1787-1790.

Cheeseman, J. M. 2006. Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. J. Exp. Bot. 57(10): 2435-2444.

Christensen, J. H., Bauw, G., Welinder, K. G., van Montagu, M. & Boerjan, W. 1998. Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. Plant Physiol. 118: 125-135.

Clarke, S. F., Guy, P. L., Burritt, D. J. & Jameson, P. E. 2002. Changes in the activities of antioxidant enzymes in response to virus infection and hormone treatment. Physiol. Plant. 114: 157-164.

Conab. 2008. Indicadores da agropecuária. Disponível em: http://www.conab.gov.br/conabweb/IA_FEVMAR08.pdf. Acesso em: 29/08/2008.

Coodetec. 2008. Doenças da soja: necrose da soja. Disponível em: <http://www.coodetec.com.br/artigos.asp?id=92>. Acesso em: 29/08/2008.

Costa, A. S., Gaspar, J. O. & Vega, J. 1983. Mosaico angular do feijoeiro Jalo causado por um carlavirus transmitido pela mosca branca *Bemisia tabaci*. Fitopatol. Bras. 8: 325-337.

Costa, J. A. 1996. Cultura da soja. Porto Alegre. Rio Grande do Sul. UFRGS. 232p.

Costa, P. H. A., Neto, A. D. A., Bezerra, M. A., Prisco, J. T. & Gomes-Filho, E. 2005. Antioxidant-enzymatic system of two sorghum genotypes differing in salt tolerance. Braz. J. Plant Physiol. 17(4): 353-361.

Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., van Montagu. M., Inzé, D. & van Breusegem, F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cell. Mol. Life Sci. 57: 779-795.

Davletova, S., Rizhsky, L., Liang, H., Shengqiang, Z., Oliver, D. J., Coutu, J., Shulaev, V., Schlauch, K. & Mittler, R. 2005. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. Plant Cell. 17: 268-281.

Diaz-Vivancos, P., Rubio, M., Mesonero, V., Periago, P. M. Barceló, A. R. Martinez-Gomez & Hernández. J. A. 2006. The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: response to long-term *plum pox virus* infection. J. Exp. Bot. 57(14): 3813-3824.

Embrapa. 2008a. Cultivo do feijoeiro comum. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/index.htm>. Acesso em: 29/08/2008.

Embrapa. 2008b. Tecnologia de produção da soja. Disponível em: http://www.cnpso.embrapa.br/download/tpsoja_2007.pdf. Acesso em: 29/08/2008.

Feierabend, J. 2005. Catalases in plants: molecular and functional properties and role in stress defense. IN: Antioxidants and reactive oxygen species in plant (Smirnoff, N. ed). Editora Blackwell Publishing. pp. 101- 130.

Fischer, I. H., Kimati, H. & Resende, J. A. M. 2005. Doenças do maracujazeiro. IN: Manual de fitopatologia (Kimati, H., Amorim., Resende, J. A. M. & Camargo, L. E. A. eds). 4ª Edição, São Paulo, Editora Ceres. pp. 468- 474.

Foyer, C. H. & Noctor, G. 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant.* 119: 355-364.

Frugoli, J. A., Zhong, H. H., Nuccio, M. L., McCourt, P., McPeck, M. A., Thomas, T. L. & McClung, C. R. 1996. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* 112: 327-336.

Gaspar, J. O., Beriam, L. O. S., Alves, M. N., Oliveira, A. R. & Costa, A. S. 1985. Serological identity of bean angular mosaic and cowpea mild mottle viruses. *Fitopatol. Bras.* 10: 195-199.

Goldberg, R., Catesson, A. M. & Czaninski, Y. 1983. Some properties of syringaldazine oxidase, a peroxidase specifically involved in the lignification processes. *Z. Pflanzenphysiol. Bad.* 110: 267-279.

Goldberg, R., Lê, T. & Catesson, A. M. 1985. Localization and properties of cell wall enzyme activities related to the final stages of lignin biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 36(164): 503-510.

Gupta, A. S., Webb, R. P., Holaday, A. S. & Allen, R. D. 1993. Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. *Plant Physiol.* 103: 1067-1073.

Havir, E. A. & McHale, N. A. 1989. Enhanced-peroxidatic activity in specific catalase isozymes of tobacco, barley, and maize. *Plant Physiol.* 91: 812-815.

Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y. & Matsui, H. 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.* 42(5): 462-468.

Hoagland, D. R. & Arnon, D. I. 1938. The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Stat. Bull.* 347: 36-39.

Hull, R. 2004. *Matthew's Plant Virology*. Academic Press, San Diego. 1001p.

Iwaki, M., Thongmeearkom, p., Prommin, M., Honda, Y. & Hibi, T. 1982. Whitefly transmission and some properties of *cowpea mild mottle virus* on soybean in Thailand. *Plant Disease.* 66: 365-368.

Jackson, A. O. & Taylor, C. B. 1996. Plant-microbe interactions: life and death at the interface. *Plant Cell*. 8:1651-1668.

Kawano, T. 2003. Role of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell. Rep.* 21: 829-837.

Kimmins, W. C. & Wuddah, D. 1977. Hypersensitive resistance: Determination of lignin in leaves with a localized virus infection. *Phytopathology*. 67: 1012-1016.

Kitajima, E. W. 1995. Lista de publicações sobre viroses e enfermidades correlatas de plantas no Brasil (1986-1993). *Fitopatol. Bras., Supl.* 92p.

Li, Z. & Burritt, D. 2003. The influence of *Cocksfoot mottle virus* on antioxidant metabolism in the leaves of *Dactylis glomerata* L. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 62: 285-295.

van Loon, L. C., Rep, M. & Pieterse, C. M. J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopath.* 44: 135-162.

Mehdy, M. C. 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* 105: 467-472.

McDougall, G. J. 1992. Changes in cell wall-associated peroxidases during the lignification of flax fibres. *Phytochemistry*. 31: 3385-3389.

Mika, A. & Luthje, S. 2003. Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiol.* 132: 1489-1498.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7(9): 405-410.

Nakano, Y. & Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22(5): 867-880.

Nascimento, A. V. S., Souza, A. R. R., Alfenas, P. F., Andrade, G. P., Carvalho, M. G., Pio-Ribeiro, G & Zerbini, F. M. 2004. Análise filogenética de *potyvirus* causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no nordeste do Brasil. *Fitopat. Bras.* 29(4): 378- 383.

Nascimento, A. V. S., Santana, E. N., Braz. A. S. K., Alfenas, P. F., Pio-Ribeiro, G., Andrade, G. P., Carvalho, M. G. & Zerbini, F. M. 2006. *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. *Arch. Virol.* 151: 1797-1809.

Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E. & Jacquot., J. P. 2007. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiol. Plant.* 129: 253-266.

Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D. & Hancock, J. T. 2002a. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J. Exp. Bot.* 53: 1237-1247.

Neill, S. J., Desikan, R. & Hancock, J. T. 2002b. Hydrogen peroxide signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 388-395.

Noctor, G. & Foyer, C. H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 249-279.

Olson, P. D. & Varner, J. E. 1993. Hydrogen peroxide and lignification. *Plant J.* 4(5): 887-892.

Panchuk, I. I., Volkov, R. A. & Schoffl, F. 2002. Heat stress and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129: 838-853.

Passardi, F., Penel, C. & Dunad, C. 2004. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trend. Plant Sci.* 9(11): 534- 540.

Peyrano, G., Taleisnik, E., Quiroga, M., Forchetti, S. M. & Tigier, H. 1997. Salinity effects on hydraulic conductance, lignin content and peroxidase activity in tomato roots. *Plant Physiol. Biochem.* 35(5): 387-393.

Polle, A., Otter, T. & Seifert, F. 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiol.* 106: 53-60.

Quan, L. J., Zhang, B., Shi, W. W. & Li, H. Y. 2008. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *J. Integrat. Plant Biol.* 50(1): 2-18.

Quecini, V., Lopes, M. L., Pacheco, F. T. H. & Ongarelli, M. G. 2007. *Tomato spotted wilt virus* triggers specific and shared defense mechanisms in hypersensitive and susceptible solanaceae hosts. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 70: 189-197.

Resende, M. L. V., Salgado, S. M. L. & Chaves, Z. M. 2003. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatol. Bras.* 28(2): 123-130.

Riedle-Bauer, M. 2000. Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in systemic virus infections of plants. *J. Phytopathol.* 148: 297-302.

del Río, L. A., Pastori, G. M., Palma, J. M., Sandalio, L. M., Sevilla, F., Corpas, F. J., Jiménez, A., López-Huertas, E. & Hernández, J. A. 1998. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiol.* 116: 1195-1200.

Soosaar, J. L., Burch-Smith, T. M. & Dinesh-Kumar, S. P. 2005. Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 789-798.

Sticher, L., Mauchi-Mani, B. & Métraux, J. P. 1997. Sistemic acquired resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 35: 235-270.

Strange, R. N. & Scott, P. R. 2005. Plant disease: a threat to global food security. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 83-116.

Suzuki, M., Miyamoto, R., Hattori, T., Nakamura, K. & Asahi, T. 1995. Differential regulation of the expression in transgenic tobacco of the gene for *B*-glucuronidase under the control of the 5'-upstream regions of two catalase genes from castor bean. *Plant Cell Physiol.* 36(2): 273-279.

Taiz, L. & Zeiger, E. 2004. *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre. Editora Artmed. 719p.

Torres, M. A., Jones, J. D. G. & Dangl, J. L. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* 141: 373-378.

Thouvenel, J. C., Monsarrat, A. & Fauquet, C. 1982. Isolation of *Cowpea mild mottle virus* from diseased soybeans in the Ivory Coast. *Plant Disease.* 66: 336-337.

Vance, C. P., Kirk, T. K. & Sherwood, R. T. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18: 259-288.

Vieira, C., Paula junior, T. J. & Borém, A. 2006. *Feijão*. Viçosa, Minas Gerais. Editora UFV. 600p.

van der Want, J. P. H. & Dijkstra, J. 2006. A history of plant virology. *Arch. Virol.* 151: 1467-1498.

Willekens, H., Villarroel, R., Van Montagu, M., Inzé, D. & Van Camp, W. 1994. Molecular identification of catalases from *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). FEBS Lett. 352:79-83.

Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D. & Van Camp, W. 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and indispensable for stress defense in C₃ plants. EMBO J. 16: 4806-4816.

Yang, T. & Poovaiah, B. W. 2002. Hydrogen peroxide homeostasis activation of plant catalase by calcium/calmodulin. Plant Biol. 99: 4097-4102.

Yoshida, K., Kaothien, P., Matsui, T. & Shinmyo, A. 2003. Molecular biology and application of plant peroxidase genes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60: 665-670.

Yoshimura, K., Yabuta, Y., Ishikawa, T. & Shigeoka, S. 2000. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. Plant Physiol. 123: 223-233.