

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

LUCIANA BENJAMIN BENATTI

**VÍRUS DO AMARELECIMENTO FOLIAR DA CANA-
DE-AÇÚCAR: CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA
FISIOPATOLÓGICA DE TRÊS VARIEDADES DE
CANA-DE-AÇÚCAR.**

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

Orientador: Prof. Dr. Jorge Vega.

2004

Data da defesa: 03 de dezembro de 2004

Banca examinadora

Titulares:

Prof. Dr. Jorge Vega

Prof. Dra. Claudia Regina Baptista Haddad

Dr. Hugo Kuniyuki

Suplentes:

Dra. Célia Regina Baptista Grassi

Dedico à minha filha Beatriz Benatti da Rocha e Silva, ao meu marido Thomaz Augusto Alves da Rocha e Silva, a minha mãe Cleonice Benjamin Benatti e ao meu pai Luiz Carlos Benatti (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jorge Vega pela orientação, ensinamentos, paciência e amizade nestes anos.

A Prof. Dra. Claudia R. B. Haddad, a Dra. Célia R. B. Grassi e ao Dr. Hugo Kuniyuki pela grande ajuda na pré-banca.

Aos meus pais, Cleonice Benjamim Benatti e Luiz Carlos Benatti (*in memoriam*) pela vida, pelo amor, pela educação e por sempre me apoiarem e me incentivarem e a minha irmã Jacqueline. Aos meus sogros, Maria Inês Alves da Rocha e Silva e Luiz Augusto da Rocha e Silva, pelo carinho desde os primeiros dias que eu os conheci e as minhas cunhadas, em especial a Tatiana pela tradução do resumo.

Ao Thomaz e a Beatriz, por serem a razão do meu viver.

Aos professores, técnicos e amigos do departamento de Fisiologia Vegetal. Um agradecimento especial à doutora Sandra M. M. Scagliusi pela fundamental ajuda quando entrei no mestrado.

Ao departamento de Botânica, pela doação do microscópio de fluorescência, e em especial o laboratório de biosistemática pela amizade dos alunos e por empréstimo de equipamentos.

À Universidade Federal de São Carlos e a todos os meus amigos de graduação, por terem participado da minha formação profissional e do meu caráter.

Ao Virgu pela impressão das fotos coloridas para a pré-banca e amizade.

As minhas amigas Julias, Julia Klaczko e Júlia Y. Costa, pela grande amizade de todos estes anos.

À UNICAMP e a CAPES pela oportunidade de poder realizar meu trabalho.

RESUMO

Foram estudadas três variedades de cana-de-açúcar com diferentes graus de sensibilidade à infecção pelo vírus do amarelecimento foliar (VAFCA).

As plantas mais sensíveis quando infectadas pelo VAFCA apresentam amarelecimento da nervura principal na parte abaxial, e quando o sintoma está em estágio avançado, também mostram o avermelhamento na parte adaxial da mesma nervura. Quando as variações ambientais são maiores, principalmente quando há queda da temperatura, a intensidade de sintomas é significativamente maior. A infecção viral também causa a diminuição no crescimento da planta.

Análises com microscopia de epifluorescência mostraram que em algumas amostras infectadas havia um acúmulo de material fluorescente no interior do floema, sítio de localização do VAFCA. A análise comparativa entre as variedades mostrou que este material fluorescente aparecia quase que exclusivamente em folhas com sintomas da variedade sensível, SP 71-6163.

Testes histoquímicos usando o reagente de Neu indicaram que o material fluorescente presente no floema é rico em flavonóides, e provavelmente insolúvel.

Sabe-se que um dos mecanismos acionados na defesa de plantas contra patógenos é o aumento da atividade de peroxidases. Em testes quantitativos de três enzimas peroxidásicas diferentes foi verificado aumento significativo na atividade da siringaldazina peroxidase (SPX) apenas em plantas sensíveis, da variedade SP 81-3250, infectadas pelo VAFCA. Quanto às outras enzimas, guaiacol peroxidase (GPX) e ascorbato peroxidase (APX), as atividades sofreram poucas modificações nas variedades estudadas.

Também foram feitos testes de localização da SPX, com siringaldazina como substrato e de peroxidases genéricas, com o 4-cloro-naftol como substrato. Nestes testes foi verificado que há atividade da SPX no interior do floema e nas células epidérmicas e subepidérmicas, em plantas sadias e infectadas da variedade SP 81-3250, e em folhas com e sem sintoma da SP 71-6163. Já na variedade tolerante, SP 70-1143, a atividade desta enzima foi baixa e às vezes nula. Quanto às peroxidases genéricas, houve também atividade no tecido floemático e nas células epidérmicas e subepidérmicas, mas a atividade foi similar em todas as folhas analisadas estando elas sadias ou infectadas com ou sem sintoma.

Foi possível fazer uma correlação nas diferentes variedades entre concentrações de vírus e prováveis mecanismos de defesa estudados. Plantas tolerantes apresentaram muitos feixes infectados, nunca apresentam material fluorescente no floema e possuem baixa atividade SPX. Já a variedade mais sensível possui poucos feixes infectados, acúmulo de material fluorescente em folhas com sintoma, e atividade relativamente alta de SPX. Esta resposta provavelmente representa a ativação de mecanismos de defesa, que embora limitem o espalhamento do vírus na hospedeira, desencadeiam um processo que no final é mais danoso para a planta, induzindo o amarelecimento e reduzindo o crescimento.

SUMMARY

Three varieties of sugarcane with different degrees of sensibility to infection by sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) were studied. ScYLV belongs to the Luteovirus family. By definition they are confined to phloem tissue and one of the symptoms that can appear is the yellowing of the leaves.

The more sensitive plants show the yellowing of the mid-rib on the abaxial face when infected by the ScYLV and red coloring on the same rib on the adaxial face at advanced stages. During larger environmental changes, especially temperature decreases, the symptoms may be considerably intensified. The virus infection also diminished plant growth.

Epifluorescence microscopy analyses demonstrated that in some infected materials the accumulation of fluorescence material occurred inside the phloem, where the ScYLV was located. A comparative study of different varieties revealed that the fluorescent material appeared almost exclusively in leaves of the sensitive variety, SP 71-6163, showing symptoms of infection.

Histochemicals testes using Neu's reagent indicated the fluorescent material present in the phloem to be rich in flavonóide, and probably insoluble.

It is know that one of plant's defense mechanisms against pathogenic agents is the increase of peroxidases activities. Three different peroxidases were assayed: guaiacol peroxidase (GPX), syringaldazine peroxidase (SPX) and ascorbato peroxidase (APX). A significant increase in the SPX activity was found only in sensitive plants of the variety SP 81-3250, infected by ScYLV. The other

peroxidase activities did not show significant variations in the varieties studied, probably because the plant infection was chronic.

Tests to localize the SPX were made with syringaldazine as substrate and for the generic peroxidases with 4-chloro-naftol as substrate. Localization tests showed the existence of activities of SPX in the phloem, epidermis and subepidermis, in healthy and infected plants of the variety SP 81-3250. the same situation was observed in leaves of SP 71-6163 with and without symptoms. On the other hand, in the tolerant variety, SP 70-1143, the activity of SPX was low and sometimes null. The generic peroxidase activity was also localized in phloem tissue as well as in cells of the epidermis and subepidermis, but the activity was similar in all types of leaves analyzed healthy or infected with or without symptoms.

It was possible to relate the quantity of virus to the probable defense mechanisms for the different varieties studied. Tolerant plants showed many infected vascular bundles, never presented fluorescent material in the phloem and possessed low activity of SPX. The most sensitive variety showed few infected vascular bundles, accumulation of fluorescent material ion the phloem of leaves with symptoms and high PX activity. This response probably represents the activation of defense mechanisms that limit the spread of the virus in the host. However, these mechanisms also trigger a process that is more harmful to the plant, inducing yellowing and growth reduction.

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	17
3.2. DAS-ELISA.....	18
3.3. MICROSCOPIA.....	19
3.3.1. AUTOFLUORESCÊNCIA	19
3.3.2. TRATAMENTO COM REAGENTE DE NEU	20
3.3.3. TRATAMENTO COM VANILINA-HCl	21
3.4. DETERMINAÇÕES ENZIMÁTICAS.	21
3.4.1. GUAIACOL PEROXIDASE.....	21
3.4.2. SIRINGALDAZINA PEROXIDASE	22
3.4.3. ASCORBATO PEROXIDASE	22
3.5. LOCALIZAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM MEMBRANAS DE NITROCELULOSE.....	23
3.5.1. ATIVIDADE POR 4-CLORO-NAFTOL.....	23
3.5.2. ATIVIDADE COM SIRINGALDAZINA	24
3.6. IMUNOLOCALIZAÇÃO DO VAFCA.....	24
4. RESULTADOS	26
4.1. MICROSCOPIA.....	26
4.1.1. AUTOFLUORESCÊNCIA	26
4.1.2. TESTE DO REAGENTE DE NEU	28
4.1.3. TESTE DA VANILINA-HCl.....	28
4.2. IMUNOLOCALIZAÇÃO DO VAFCA.....	30
4.3. LOCALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	32
4.4. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	36
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÕES	45
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	46

1. INTRODUÇÃO

A importância da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) pode ser atribuída à sua múltipla utilização, podendo ser empregada in natura, sob a forma de forragem, para alimentação animal, ou como matéria prima para a fabricação de rapadura, melado, aguardente, açúcar e álcool. É plantada no Sudeste do Brasil, de outubro a março e colhida de maio a outubro, e, no Nordeste, de julho a novembro e colhida de dezembro a maio. De acordo com as condições de produção, o rendimento anual é de 50 a 100 toneladas por hectare.

A cana-de-açúcar é o principal produto agrícola do Estado de São Paulo, respondendo em 2002 por 28,26% do valor da produção agropecuária paulista, de R\$ 20,9 bilhões. No ano de 2001, as exportações paulistas de cana e álcool atingiram US\$ 1,57 bilhão, o que significou uma participação de 68,7% dos embarques brasileiros. Já a produção paulista representou 68% de toda a cana moída no Brasil; 75% do açúcar produzido e 61% da produção de álcool do país.

O Brasil, embora grande produtor de açúcar desde a época da colonização, expandiu muito a cultura de cana-de-açúcar a partir da década de 1970, com o advento do Programa Nacional do Álcool (Pro-Álcool) - programa do governo que substituiu parte do consumo de gasolina por etanol, álcool obtido a partir da cana-de-açúcar - sendo pioneiro no uso, em larga escala, deste álcool como combustível automotivo. O Pro-Álcool, lançado em 14 de novembro de 1975, deveria suprir o país de um combustível alternativo e menos poluente que os derivados do petróleo, mas acabou sendo desativado.

A cana-de-açúcar é originária do sudeste da Ásia, onde é cultivada desde épocas remotas. A exploração canavieira assentou-se, no início, sobre a espécie *S. officinarum* L. O surgimento de várias doenças e de uma tecnologia de cultivo mais avançada exigiram a criação de novas variedades, as quais foram obtidas pelo cruzamento da *S. officinarum* com outras espécies e posterior retrocruzamentos com os progenitores.

Em 1890, em Java, foram desenvolvidos programas de melhoramento visando a obtenção de variedades de cana-de-açúcar resistentes ao vírus do mosaico da cana-de-açúcar (Abbot, *et al.*1961). Na década de vinte, no Brasil, foi necessária a substituição das variedades susceptíveis (Arruda, 1946), que eram amplamente cultivadas.

Na década de oitenta a variedade susceptível NA 56-79, que cobria mais de 50% da área plantada com cana-de-açúcar teve que ser substituída devido à incidência do carvão, doença causada pelo fungo *Ustilago scitaminea* Sydow (Sordi, 1996).

Em 1989 foi observada a síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar (SAFCA) na variedade mais cultivada da época no Estado de São Paulo, SP 71-6163 (Sordi, 1996). Esta variedade, apesar de ter seu crescimento vegetativo inicial lento, tem elevado teor de sacarose, motivo pelo qual chegou a ser cultivada em até 22% da área do Estado de São Paulo. Posteriormente, quando o quadro já era de epidemia da SAFCA, outras variedades como SP 71-1406, SP 71-1632, RB 72-454 e RB 76-5418 também começaram a apresentar os sintomas, porém mais brandos (Sordi, 1996). O Brasil não foi o único país a

apresentar cana-de-açúcar com esta síndrome. Também houve relatos da síndrome do amarelecimento foliar na Austrália (Smith, 1995), Ilhas Maurício, África do Sul (Bailey *et al.*, 1996) e Estados Unidos (Comstock *et al.*, 1994).

Devido ao sintoma característico da doença, a SAFCA ficou popularmente conhecida como “amarelinho” da cana-de-açúcar. Os sintomas em SP 71-6163 não são visíveis nas folhas mais jovens, tornando-se evidentes em folhas maduras. O sintoma mais característico é o intenso amarelecimento da nervura principal, visível na superfície abaxial. Folhas mais velhas mostram uma coloração avermelhada na superfície adaxial da nervura principal. Descoloração subsequente espalha-se pela lâmina foliar, do topo para a base da folha, que eventualmente é seguida por necrose dos tecidos. Raízes e colmos mostram crescimento prejudicado, e a produção é significativamente reduzida (Vega *et al.*, 1997). Os sintomas podem variar de acordo com a variedade de cana-de-açúcar, com condições climáticas e época do ano, apresentando geralmente sintomas mais evidentes nos períodos de temperaturas mais baixas (Vega *et al.*, 1997). Os sintomas de infecção por luteovírus assemelham-se muito àqueles de deficiência nutricional e danos por alimentação de insetos.

Folhas de plantas sintomáticas apresentam um acúmulo de açúcar e aumento no grau Brix nas folhas com amarelecimento, em relação a folhas de plantas sem sintomas (Irvine, 1993).

A extensão das áreas canavieiras afetadas e a intensidade dos sintomas levaram a diversas especulações sobre a natureza do agente causal desta

moléstia, se nematóides, fungos, fitoplasmas ou vírus, ou ainda se os sintomas eram meramente causado por fatores edafo-climáticos (Scagliusi, 2003).

Estudos com plantas sintomáticas da variedade SP 71-6163 feitos no Brasil levaram a crer que o agente causador da doença era um luteovírus. Testes serológicos que utilizaram antisoro de *Barley yellow dwarf virus* PAV (BYDV-PAV), um luteovírus, apresentaram resultado positivo, e observações de microscopia eletrônica (Vega *et al.* 1997) mostraram partículas isométricas, coerentemente com a idéia de que o causador da síndrome do amarelecimento foliar é um luteovírus. A partícula do Vírus do Amarelecimento Foliar da Cana-de-Açúcar (VAFCA) é isométrica de aproximadamente 25 nm de diâmetro e contém RNA linear de fita simples e sentido + (Scagliusi, 2003). No trabalho de Scagliusi (2003) o vírus foi identificado como *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV), pertencente a família *Luteoviridae*.

O VAFCA foi transmitido pelos afídeos *Melanaphis sacchari* e *Rhopalosiphum maidis* (Scagliusi & Lockhart, 2000), e a transmissão mecânica foi negativa (Scagliusi, 2003). Os luteovírus são transmitidos por afídeos de maneira persistente, circulativa e não propagativa, ou seja, com circulação do vírus pelo corpo do vetor, porém sem haver replicação do vírus no afídeo (Smith & Barker, 1999).

Dois fatores importantes diferenciam os luteovírus dos outros fitovírus. Um é a capacidade de interação com outros agentes infecciosos como umbravirus, RNA satélite e viróides, de maneira que afeta profundamente a invasão dos tecidos da planta de um ou ambos os parceiros. Isto ocorre devido à capacidade

das proteínas capsidiais dos luteovírus de encapsularem RNA não luteoviral. Outro fator é a capacidade da proteína capsidial dos luteovírus de interagir com o produto sintetizado por uma bactéria (*Buchnera* sp) endosimbionte do afídeo vetor, a simbionina, que aparentemente estabiliza as partículas virais quando os vírus estão na hemolinfa do inseto (Smith & Barker, 1999).

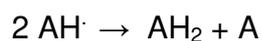
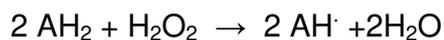
Para a invasão sistêmica na planta, os vírus utilizam dois processos: um é o movimento de célula-à-célula pelos plasmodesmos e outro é o transporte à longa distância, pelos tecidos vasculares floemáticos. O movimento célula-à-célula envolve proteínas de movimento (MP) codificadas pelos vírus e componentes codificados pelo hospedeiro (Atabekov & Taliansky, 1990). Estudos citopatológicos de vários luteovírus, como *Potato leafroll virus* (PLRV), mostraram partículas virais em elementos de tubo crivado maduros, células companheiras e parênquima celular do floema, mas não em outros tipos celulares (Jensen, 1969, Esau & Hoefert, 1972). Mas a sua limitação ao floema não é devida à inabilidade de replicação em outras células que não a do floema, já que luteovírus podem invadir as células do mesófilo, quando co-infectados com outros tipos virais, como no caso de PLRV co-infectado com *Potato Y virus* (PVY) (Baker, 1987), *Potato virus X* (PVX), e Tobacco mosaic virus (TMV) (Atabekov *et al.*, 1984) entre outros. Estes resultados sugerem que a restrição do luteovírus aos tecidos floemáticos é devida a uma falha no movimento do vírus (Smith & Barker, 1999).

Devido à dependência de um vetor afídeo que introduza o luteovírus no floema para que haja infecção, é pouco provável que ocorram mecanismos de defesa como a resposta de hipersensibilidade (HR). Este processo, que acontece

em combinações vírus/planta hipersensíveis algumas horas após a infecção, consiste de um surto oxidativo, com aumento de espécies reativas de oxigênio, e conseqüente necrose de células próximas aos locais de entrada do vírus, na tentativa de isolar o vírus num pequeno local, evitando assim a infecção sistêmica. As principais espécies reativas de oxigênio são peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical hidroxila (OH⁻) e radical superóxido (O₂⁻) (Mehdy *et al.*, 1996).

Mas estas espécies ativadas de oxigênio não estão apenas relacionadas com a morte celular característica da HR. Elas podem agir diretamente sobre o patógeno; como sinalizador, juntamente com o ácido salicílico para a produção de proteínas de resistência (PR); na ativação de genes de defesa no hospedeiro; na ligação oxidativa de proteínas reforçando a parede celular (Mehdy, *et al.*, 1996) e como sinalizadores na síntese de fitoalexinas (Lamb & Dixon, 1997).

O peróxido de hidrogênio é produzido pela dismutação de radicais superóxido em reações catalisadas principalmente pela superóxido dismutase-CuZn (SOD-CuZn), localizada no estroma do plastídeo (Asada *et al.*, 1974). Muitas peroxidases heme catalisam a oxidação univalente de doadores de elétrons (AH₂) por peróxido de hidrogênio, formando um produto de radical primário (AH[·]) duas vezes, resultando num produto (A) estável:



Peroxidases são glicoproteínas contendo grupo heme, relativamente estáveis em altas temperaturas e sua atividade é facilmente medida por reações cromogênicas. As peroxidases de plantas são classificadas em três classes: Classe I, em que se encontra o citocromo c e a ascorbato peroxidase; a classe II inclui a peroxidase dependente de manganês e lignase, que são enzimas extracelulares fúngicas e a classe III que inclui as enzimas genericamente denominadas peroxidases (POX).

A classe I de peroxidases inclui enzimas intracelulares. A ascorbato peroxidase (EC 1.11.1.11) é uma enzima que captura peróxido de hidrogênio, específica para plantas e algas, e é indispensável para proteger cloroplastos e outros constituintes celulares do dano que o peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilas produzem neles (Asada, 1992).

Duas isoenzimas para ascorbato peroxidase foram encontradas em folhas de chá, e suas propriedades foram comparadas (Chen & Asada, 1989). Uma delas está localizada no cloroplasto e captura peróxido de hidrogênio nesta organela, e a outra é a principal isoenzima em tecidos não fotossintéticos, que parece estar localizada em outros componentes celulares que não os cloroplastos (Asada, 1992). Quando comparada com a isoenzima citosólica, a cloroplástica tem um tempo de vida muito curto em meio não contendo ascorbato. A sensibilidade da isoenzima cloroplástica a reagentes tiol e inibidores suicidas é maior do que aquela da isoenzima citosólica. A isoenzima cloroplástica é mais específica a ascorbato como doador de elétrons do que a citosólica, podendo esta oxidar pirogalol numa razão apreciável (Chen & Asada, 1989, 1990). Em outro trabalho

mais recente, ascorbato peroxidase, assim como as outras enzimas do ciclo ascorbato-glutationa, também foram encontradas em peroxissomos e mitocôndrias de folhas de *Pisum sativum* L. (Jiménez *et al.* 1997).

A classe III inclui as enzimas genericamente denominadas peroxidases (POX, EC 1.11.17), que são secretadas para o exterior da célula ou transportadas para dentro de vacúolos, com o peso molecular variando de 28 a 60 kDa. Estão envolvidas em processo como a lignificação, suberização, catabolismo de auxinas e defesa contra infecção de fitopatógenos. Existem como isoenzimas em espécies individuais de plantas, e cada isoenzima tem seqüências variáveis de aminoácidos (Hiraga *et al.*, 2001).

Peroxidases geralmente reagem com compostos contendo grupo(s) hidroxila ligado(s) a um anel aromático. Guaiacol (*o*-metoxi fenol) é comumente usado como substrato para medir a atividade das peroxidase (Hiraga *et al.*, 2001). Muitas isoenzimas de guaiacol peroxidase ocorrem em tecidos de plantas. Elas estão localizadas no vacúolo, parede celular e citosol, mas não em organelas celulares, inclusive estão ausentes em cloroplastos (Nakano & Asada, 1981).

Desde 1957, com o trabalho de Higuchi (citado por Goldeberg *et al.*, 1983), foi sugerido que peroxidases ligadas à parede celular estão envolvidas no passo final do processo de lignificação. E em 1978 Catesson *et al.* (citado por Goldeberg *et al.*, 1983) demonstraram uma especial afinidade desta peroxidases por siringaldazina, um substrato usado até então para testes histoquímicos. A afinidade desta enzima pela siringaldazina é de 100 a 1000 vezes maior do que a afinidade pelo guaiacol.

A síntese de lignina em plantas superiores resulta de uma longa cadeia de reações representando um dos mais caros processos biossintéticos em termos de demanda energética (Boudet, 2000).

São três os álcoois cinâmicos, ou monolignóis, formados nesta via. O álcool *p*-cumarílico (unidade H), o álcool coniferílico (unidade G) e o álcool sinapílico (unidade S), provenientes respectivamente do ácido cumárico, do ácido ferúlico e do ácido sinápico. A diferença de um monolignol para outro é o grau de metilação no anel fenólico.

Estas unidades C₆C₃ são interconectadas por diversos tipos de ligações eterificadas e carbono-carbono (Higuchi, 1990). As mais freqüentes ligações interunidades são do tipo β-O-4, que são alvos de processos de despolimerização de lignina. Em contraste, as outras ligações interunidades do tipo β-5, β-β, 5-5 e 4-O-5, são mais resistentes à degradação (Boudet *et al.*, 1995).

Produtos da condensação do álcool coniferílico podem ser ligados covalentemente às proteínas ricas em hidroxiprolina em reações também catalisadas pela peroxidase (Whitmore, 1970, 1978 citado por Vance *et al.*, 1980). Outra hipótese é que esta proteína poderia estar envolvida em interações elicitor-receptor, que resultaram na indução de biossíntese de lignina durante interações microorganismo e hospedeiro. Ligninas por estarem freqüentemente associadas com proteínas e polissacarídeos possuem vários tipos de grupos funcionais (Vance *et al.*, 1980). A matriz de ligação proteína-carboidrato pode servir como uma trama para a deposição de lignina.

Um estudo com gramíneas, feito por Jung & Deetz (1993, citado em Boudet *et al.*, 1995), observou a presença de ácido *p*-cumárico e ferúlico ligados à lignina e polímeros polissacarídicos marcados em pontes de éter e/ou éster.

Membros da família Poaceae, monocotiledôneas, apresentam parede celular com emissão fluorescente azul esverdeada quando excitada com luz ultravioleta (UV), muito maior do que em dicotiledôneas. Por hidrólise alcalina das paredes celulares foi mostrado que isso se deve a quantidades muito maiores de ácido ferúlico. Outros ácidos cinâmicos ligados à parede celular, como ácido cafeico e *p*-cumárico, estão presentes em algumas plantas em baixas

quantidades, contribuindo muito pouco para a emissão desta fluorescência azul esverdeada nas folhas. Isto também pode ser aplicado para flavonóides extraíveis e ácidos cinâmicos presentes no vacúolo (Lichtenthaler & Schwieger, 1998).

A deposição de lignina nas paredes celulares de plantas foi um dos mecanismos que as plantas desenvolveram para se adaptarem ao ambiente terrestre. Ligninas intrinsecamente exibem várias especificidades que fazem este polímero único na natureza. Este complexo amorfo de moléculas fenólicas só não é mais abundante do que a celulose e corresponde a cerca de 30% do carbono orgânico na biomassa das plantas. O significado funcional das ligninas tem sido ainda principalmente associado com suporte mecânico de órgãos de plantas, melhoramento na condução da seiva por elementos de vaso lignificados e como mecanismos de defesa (Boudet, 2000). Sobre o curso da evolução, é interessante observar que a complexidade química da lignina aumenta a partir de pteridófitas e gimnospermas para gramíneas, plantas mais desenvolvidas, nas quais a lignina aparece com a composição mais complexa (Boudet, *et al.*, 1995).

Em dicotiledôneas as ligninas consistem principalmente de unidades G e S e traços de unidades H. Já ligninas de gramíneas, incorporam unidades G e S a níveis equivalentes, mas há mais unidades H do que em dicotiledôneas (Baucher *et al.*, 1998).

Em 2000 um estudo com raízes de cultivares de *Phoenix dactilifera* com diferentes suscetibilidades ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis*, mostrou que o cultivar resistente, em relação ao susceptível, possuía uma quantidade muito maior dos três precursores de monolignóis: ácido p-cumárico, ácido ferúlico

e ácido sinápico, mostrando que a quantidade de lignina presente na planta foi um dos fatores que influenciaram na resistência da planta (El Modafar *et al.*, 2000).

Reimers *et al.* (1991), mostraram a resistência raça-específica em arroz. Lignina foi identificada com uma variedade de corantes histológicos nos sítios de infecção com interações compatíveis e incompatíveis do arroz com a bactéria *Xanthomonas oryzae*. Entretanto, a deposição de lignina em interações incompatíveis ocorreu dentro de 18 a 24 hs após a inoculação, enquanto que nenhum acúmulo de lignina foi visto em interações compatíveis dentro de 96 hs após a inoculação. Monitoramento das populações de bactérias no tecido hospedeiro demonstrou correlação entre a iniciação do processo de lignificação e a deposição de lignina com o término da multiplicação bacteriana em reações incompatíveis. Estes resultados indicaram que a lignina e/ou precursores de lignina possuem um papel na defesa ativa de arroz à *Xanthomonas*.

Kimmins *et al.* (1976, citado por Vance *et al.*, 1980), examinaram a resposta de folhas de feijão à infecção viral e concluíram que a lignificação ao redor de lesões locais foi uma barreira eficiente para evitar o espalhamento do vírus. Conti *et al.*, (1974) (citado por Vance *et al.*, 1980), que trabalharam com feijão cv. Pinto infectado com o vírus do mosaico da alfafa (*Alfalfa mosaic virus*) e *Brassica pekinensis* infectada com o vírus do mosaico da couve-flor (*Cauliflower mosaic virus*), mostraram formação de lignina localizada em volta das lesões necróticas, ocorrendo aumento das atividades da fenilalanina amônia-liase (PAL) e POX.

Mudanças no metabolismo de plantas em interações compatíveis planta/vírus têm sido reportadas. Num trabalho de 2001, Hernández *et al.*, por

exemplo, estudaram cultivares resistentes e suscetíveis de *Prunus armeniaca* inoculadas com *Plum pox virus*, demonstrando diferenças significativas nas atividades de enzimas antioxidantes entre os dois cultivares. Eles sugeriram que as espécies ativas de oxigênio poderiam funcionar como sinais que ativam genes de resistência e que regulam as enzimas antioxidantes, que por sua vez poderiam ser importantes na determinação de suscetibilidade ou resistência.

Uma classe de compostos fenólicos amplamente distribuída em plantas são os flavonóides, que podem ser encontrados em diversas formas estruturais. A maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas. São conhecidos mais de 4.200 flavonóides, sendo que o número praticamente dobrou nos últimos 20 anos. Os flavonóides de origem natural apresentam-se freqüentemente oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares (heterosídeos) (Simões *et al.*, 1999).

Diversas funções são atribuídas aos flavonóides como: proteção dos vegetais contra incidência de raios ultravioleta (UV); proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais com finalidade de polinização; controle na ação de hormônios vegetais; agentes alelopáticos e inibição de enzimas (Simões *et al.*, 1999). Os compostos polifenólicos são também potentes antioxidantes, interceptores de radicais livres, agentes quelantes de metais e inibidores da peroxidação lipídica (Escarpa & Gonzales, 2001).

Muitos flavonóides funcionam como fitoalexinas, que são substâncias de baixo peso molecular com atividade antimicrobiana, que normalmente estão ausentes ou em baixas concentrações em tecidos sadios.

Geralmente os diferentes membros de uma família particular não produzem fitoalexinas de classes químicas muito diferentes, sendo mais comum que espécies de uma mesma família produzam não mais do que duas ou três classes estruturais características. Entre os membros de Leguminosae, por exemplo, predominam derivados de isoflavonóides, como a medicarpina e sativana. Já entre membros de Umbeliferae a tendência é a produção de furanocumarinas, isocumarinas e cromonas.

2. OBJETIVOS

- Comparar a atividade de peroxidases em variedades de cana-de-açúcar com diferentes respostas à infecção pelo VAFCA.
- Estabelecer a localização da peroxidase nos diferentes tecidos foliares.
- Relacionar a localização de peroxidases com a localização do vírus nas variedades examinadas.
- Verificar em quais circunstâncias e em quais variedades de cana-de-açúcar aparece material fluorescente no interior do floema.
- Determinar qual classe de compostos fenólicos predomina no material fluorescente acumulado/encontrado no interior do floema.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Foram usadas as variedades SP 70-1143 (tolerante ao VAFCA), SP 71-6163 (muito sensível) e SP 81-3250 (pouco sensível), que foram gentilmente cedidas pelo Centro de Tecnologia Copersucar. A variedade tolerante (SP 70-1143) não apresenta o sintoma do amarelecimento foliar quando infectada pelo VAFCA. A variedade muito sensível apresenta o sintoma do amarelecimento foliar freqüentemente, principalmente no campo. Mas também é comum encontrar plantas desta variedade que contenham o sintoma em situações menos adversas, como em casa de vegetação e telado. Já a variedade pouco sensível (SP 81-3250) apresenta o sintoma do amarelecimento foliar em situações adversas, como no campo, mas em ambientes menos inóspitos, como casa de vegetação e telado é raro encontrar folhas amarelecidas devido à infecção.

Parte do material livre do vírus e outra parte sistemicamente infectada pelo vírus do amarelecimento foliar (VAFCA), que foi testado quanto à sanidade pelo teste serológico de DAS- ELISA.

Os testes foram feitos com folhas +1, ou seja, a primeira folha totalmente expandida, e a mesma folha foi utilizada para a realização de todos os testes: enzimáticos, de microscopia e imunolocalização.

Com base em ensaios preliminares, foi padronizado o uso da parte mediana da folha, já que as partes mais próximas ao colmo e ao topo da folha possuíam menores atividades enzimáticas.

Foram examinadas plantas com a mesma idade, mantidas em casa de vegetação. Apenas nos ensaios de fluorescência foram também utilizadas plantas mantidas em telado, onde as condições ambientais eram diferentes: a oscilação térmica diária é maior que nas casas de vegetação.

3.2. DAS-ELISA

Placas de ELISA foram cobertas com 100 μ L do anti-soro produzido para o VAFCA (AS-ScYLV), nas diluição de 1:1.000, em tampão carbonato, pH 9,6.

As amostras foram preparadas triturando 1,0 g de tecido foliar com N_2 líquido e homogeneizadas em 5 mL de tampão 100 mM $NaKPO_4$, pH 6,0, acrescido de 1% (p/v) de Na_2SO_3 e 0,05% (v/v) de Tween-20. Os extratos foram centrifugados a 12.000xg por 15 minutos e 100 μ L do sobrenadante foram usados para incubar a placa.

O conjugado de imunoglobulina G com fosfatase alcalina (IgG-AP) foi diluído a 1:1.000 em tampão Tris/HCl 20 mM, pH 7,4, contendo 150 mM de NaCl, 0,05% (v/v) de Tween-20 (TTBS) e 0,2% de BSA (albumina de soro bovino). Entre as primeiras etapas, as lavagens das placas foram feitas com tampão fosfato salino com 0,05% de Tween (PBST), sendo as últimas feitas com TTBS. Todas as etapas foram incubadas por 4 horas à temperatura ambiente, 2 horas em estufa a

30° C ou “overnight” a 4° C. Após a incubação das placas com o conjugado, foi adicionado o substrato p-nitrofenil fosfato, na concentração de 0,5 mg/mL em tampão dietanolamina pH 9,8. A absorbância foi lida em 405 nm, num leitor de ELISA (BioRad), começando após 1 hora da adição do substrato. As amostras com absorbância maior que duas vezes a média dos controles negativos foram consideradas positivas. Os controles negativos são plantas provenientes de sementes (“seedlings”).

3.3.MICROSCOPIA.

3.3.1. AUTOFLUORESCÊNCIA.

Cortes manuais foram colocados em uma lâmina contendo tampão KPB (fosfato potássico) e observados em microscópio de fluorescência (Zeiss Jenalumar) com luz de excitação de ultravioleta (370 nm) e azul (430 nm), espelho divisor dicróico de 410 e 510 nm respectivamente, e filtro de barreira G244 e G247.

O material foi fotografado com filme colorido negativo (Kodak ISO 100) e após revelação, os negativos foram digitalizados em Scanner Nikon Coolscan 5000.

3.3.2. TRATAMENTO COM REAGENTE DE NEU.

O reagente de Neu é um corante que induz fluorescência secundária de flavonóides (Vogt *et al.*, 1994). Pode também ser encontrado com os nomes Naturstoffreagenz A (NA) e como DPBA (DiPhenil-Boric 2-Aminoetil ester) Quanto à nomenclatura química pode ser encontrado com os nomes 2-amino etildifenil borinato e como ácido difenil bórico 2-aminoetil éster.

Preparou-se uma solução estoque de reagente de Neu 2,5% (p/v) em etanol, que foi diluída em tampão KPB para 0,1% imediatamente antes de usar. Uma pequena quantidade de reagente foi posto em um tubo de ensaio pequeno, e os cortes foram deixados nele durante 5 min. Posteriormente os cortes foram retirados do reagente e postos em 3 banhos consecutivos com água destilada. Os cortes foram montados numa lâmina de vidro em água.

A lâmina depois de pronta foi observada em microscópio de epifluorescência (Zeiss, Jenalumar), com luz de excitação em 370 nm (Hutzler *et al.*, 1998).

O material fotografado foi processado como descrito para autofluorescência.

3.3.3. TRATAMENTO COM VANILINA-HCl.

Monômeros de catequinas e taninos condensados são detectados com vanilina-HCl após cortes manuais serem imersos numa solução de vanilina HCl 10% (p/v) por 5 minutos, em 1 volume de álcool absoluto misturado com 1 volume de HCl concentrado (Valete *et al.*, 1998). Os cortes foram observados em microscópio óptico comum (Olympus) de campo claro, fotografados e processados como descrito para autofluorescência.

3.4. DETERMINAÇÕES ENZIMÁTICAS.

3.4.1. GUAIACOL PEROXIDASE.

A extração foi feita com pistilo e almofariz gelados, com 1 g de folha fresca e 5 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM (pH 6,0). Em seguida foi feita uma centrifugação durante 10 minutos em uma rotação de 12.000xg.

O meio de reação para a determinação da atividade guaiacol oxidase utilizou 1,2 mM de guaiacol; 0,1 M de peróxido de hidrogênio e 50 mM de tampão fosfato de sódio (pH 5,7). Para cada mL de meio de reação usou-se 60 µL do sobrenadante do extrato. As absorbâncias foram obtidas em comprimento de onda de 470 nm em intervalos de 10 segundos durante 2 minutos e 30 segundos. As análises de variância foram feitas pelo teste de Tukey (0,05).

3.4.2. SIRINGALDAZINA PEROXIDASE.

A extração foi feita com pistilo e almofariz gelados, com 1 g de folha fresca e 5 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM (pH 6,0). Em seguida foi feita uma centrifugação durante 10 minutos em uma rotação de 12.000xg.

O meio de reação que determinou a atividade de siringaldazina oxidase, que foi mantido a 35°C, continha 19 µM de siringaldazina, 54 µM de peróxido de hidrogênio e 50 mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,4). Foram adicionados 40 µL do sobrenadante do extrato a cada 1 mL de meio de reação (Peyrano *et al.*, 1997). As absorbâncias foram obtidas em comprimento de onda de 530 nm, em intervalos de 10 segundos durante 2 minutos e trinta segundos.

3.4.3. ASCORBATO PEROXIDASE.

A planta (2g de massa fresca) foi macerada em almofariz e pistilos gelados com 5 mL de meio homogenizador contendo 1 mM de ácido ascórbico, 1 mM EDTA e 50 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,0. O homogenizado foi centrifugado a 10.000xg durante 10 minutos.

A razão de oxidação do peróxido de hidrogênio para ascorbato como doador de elétrons foi determinada com meio de reação contendo: 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0); 0,1 mM de peróxido de hidrogênio (peridrol, Merck); 0,2 mM de ácido ascórbico (Amako *et al.* 1994, com algumas modificações) e 30 µL de sobrenadante do extrato para cada mL de meio de

reação. As absorbâncias foram obtidas em comprimento de onda de 265 nm, em intervalos de 10 em 10 segundos durante 2 minutos e 30 segundos.

3.5.LOCALIZAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM MEMBRANAS DE NITROCELULOSE.

3.5.1. ATIVIDADE POR 4-CLORO-NAFTOL.

Foram feitas duas impressões, com o mesmo corte, das nervuras das folhas de cana-de-açúcar em uma membrana de nitrocelulose, que foi posta em uma placa de petri. Nesta placa, colocou-se um meio que continha 0,5 mL de solução estoque de 4- cloro-naftol (6 mg de 4-cloro-naftol/mL de metanol); 4,5 mL de tampão fosfato salino (PBS) e 1 μ L de peróxido de hidrogênio 30%.

Esta placa foi posta num agitador de placas até que a reação, que aparece em anil, estivesse suficientemente corada. Lavou-se a membrana durante 15 minutos em água destilada que após este período, foi retirada da placa e deixada secar em local escuro em papel filtro. Depois de seca, a membrana foi observada em microscópio óptico de campo claro e fotografada (Young, 1989, com modificações).

3.5.2. ATIVIDADE COM SIRINGALDAZINA.

Como para a membrana de 4-cloro-naftol, foram feitas duas impressões do mesmo corte de cada planta nas membranas de nitrocelulose. Foi posto um pedaço de papel filtro sobre a membrana e gotejou-se uma solução contendo 0,3 mL de siringaldazina em 0,1% em etanol; 1,2 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM e 0,8 mL de peróxido de hidrogênio 0,1%. Logo após o aparecimento da coloração, que aparece em rosa, o papel filtro foi retirado, e a membrana foi posta em um outro pedaço de papel filtro para secar em local escuro. Depois de seca, a membrana foi observada em microscópio óptico de campo claro e fotografada.

3.6. IMUNOLOCALIZAÇÃO DO VAFCA.

Impressões da nervura central da folha de cana-de-açúcar foram feitas em uma membrana de nitrocelulose, que foi posta dentro de uma placa de petri. A membrana foi incubada durante 60 minutos em tampão fosfato pH 7,0, contendo 0,5% de BSA. Em seguida foram feitas 3 lavagens com tampão TTBS. Depois de lavada a membrana, colocou-se o anti-soro específico para o VAFCA diluído 1:1000 em tampão TBS pH 7,4 e deixado durante mais 60 minutos, seguindo mais 6 lavagens com o TTBS.

Posteriormente, colocou-se o conjugado anti-rabbit IgG-fosfatase alcalina (Sigma 9199), diluído 1:33.000 em tampão TBS (pH 7,4) e novamente depois de 60 minutos lavou-se a membrana 6 vezes. Colocou-se o substrato para revelação,

que deve ser mantido sob abrigo da luz, contendo 22 μL de Nitro Blue Tetrazolium (NBT) e 17 μL de 5- bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP), diluídos em 10 mL de tampão fosfatase alcalina (pH 9,5). A membrana foi então lavada com água destilada quando a coloração desejada foi obtida, secada no escuro e à temperatura ambiente e posteriormente observada em microscópio óptico de campo claro e fotografada.

4. RESULTADOS

4.1. MICROSCOPIA.

4.1.1. AUTOFLUORESCÊNCIA.

Em cortes histológicos de folhas com sintomas da variedade SP 71-6163, observou-se no interior do floema um material fluorescente que não ocorre em folhas não sintomáticas, no caso de plantas mantidas em casa de vegetação. Contudo, observou-se, algumas vezes, esta mesma fluorescência em folhas sem sintomas de plantas infectadas, da mesma variedade mantidas em telado.

Na variedade tolerante (SP 70-1143), na pouco sensível (SP 81-3250) e na maioria das folhas sem sintoma da muito sensível (SP 71-6163), não houve manifestação de sintomas e não foi observada a presença de material fluorescente no floema (Fig. 1), tanto no telado quanto na casa de vegetação.

Quando observado com iluminação UV (370 nm) o material no floema apresentou fluorescência azul clara (Fig. 2), e quando o corte foi observado com luz azul (430 nm), a fluorescência apareceu amarela esverdeada (dados não apresentados).

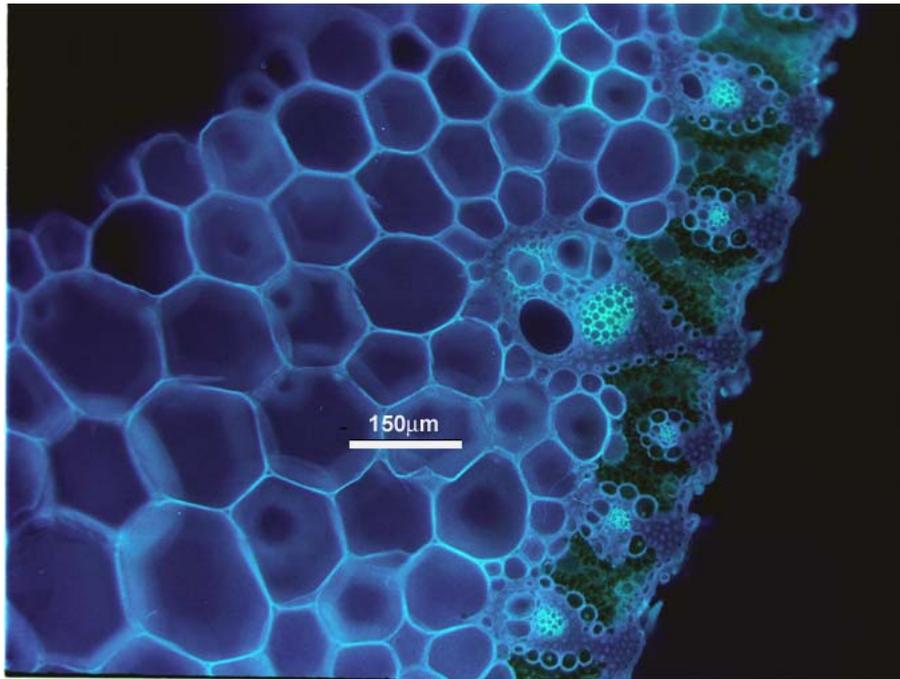


Figura 1. Corte transversal de folha sem sintomas do amarelecimento foliar na variedade SP 71-6163 mostrando o floema (seta) livre de material fluorescente. Autofluorescência em microscopia de epifluorescência UV (370 nm).

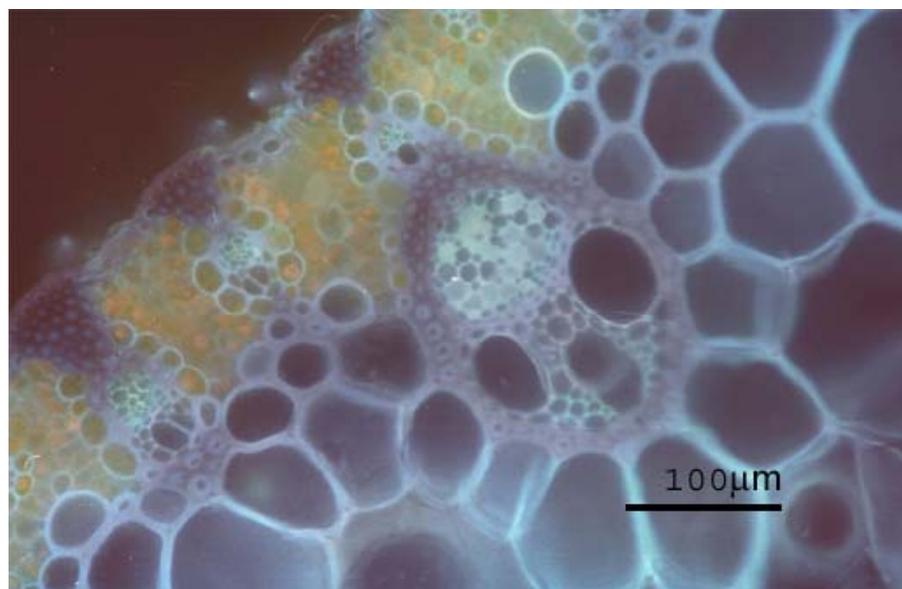


Figura 2. Corte transversal de folha com sintomas do amarelecimento foliar na variedade SP 71-6163 mostrando material fluorescente no interior do floema (seta). Autofluorescência em microscopia de epifluorescência UV (370 nm).

4.1.2. TESTE DO REAGENTE DE NEU.

Este reagente é usado para a detecção de flavonóides. O resultado positivo, como já foi mencionado, ocorre quando o composto ou o tecido em questão, após o tratamento se torna amarelo ou laranja, quando examinado com luz UV, em 365 nm, e amarelo brilhante quando excitado com luz azul (420 nm).

Todas as plantas que apresentaram sintomas foram testadas. O material fluorescente no floema apresentou, antes do tratamento, fluorescência azul quando excitado com luz UV (comprimento de onda 370 nm) e depois do tratamento a fluorescência tornou-se amarela. Este resultado positivo indica a presença de flavonóides no material em exame (Fig. 3).

4.1.3. TESTE DA VANILINA-HCl.

Este reagente cora especificamente taninos condensados e catequinas de marrom avermelhado.

O floema não apresentou nenhuma coloração em cortes tratados com esta solução, quando observadas em microscopia de campo claro, caracterizando, portanto, o composto como não sendo um tanino condensado nem uma catequina (Fig. 4).

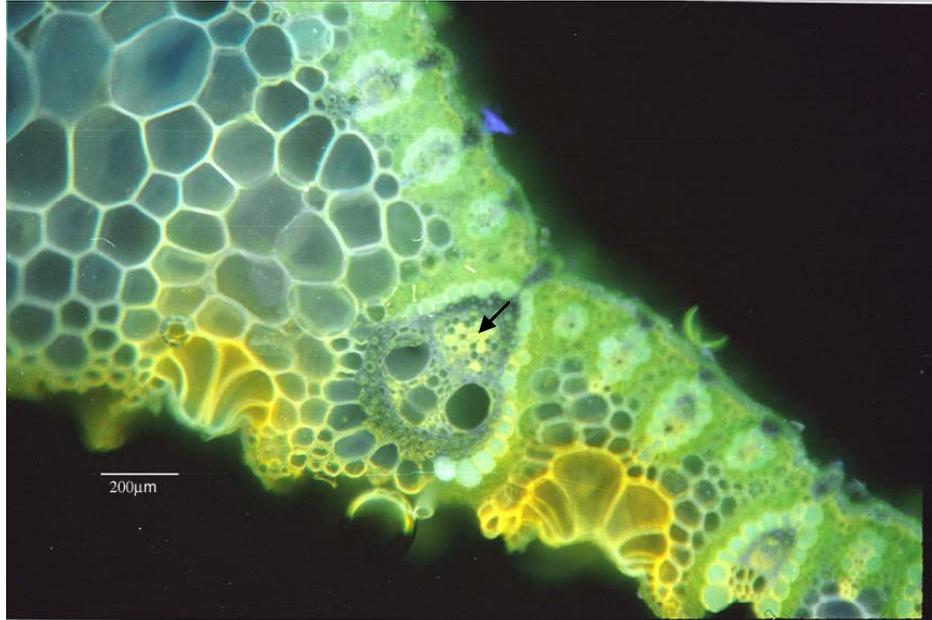


Figura 3. Corte transversal de folha com sintomas do amarelecimento foliar na variedade SP 71-6163 mostrando material fluorescente no interior do floema (seta) após tratamento com reagente de Neu. Microscopia de epifluorescência UV (370 nm).

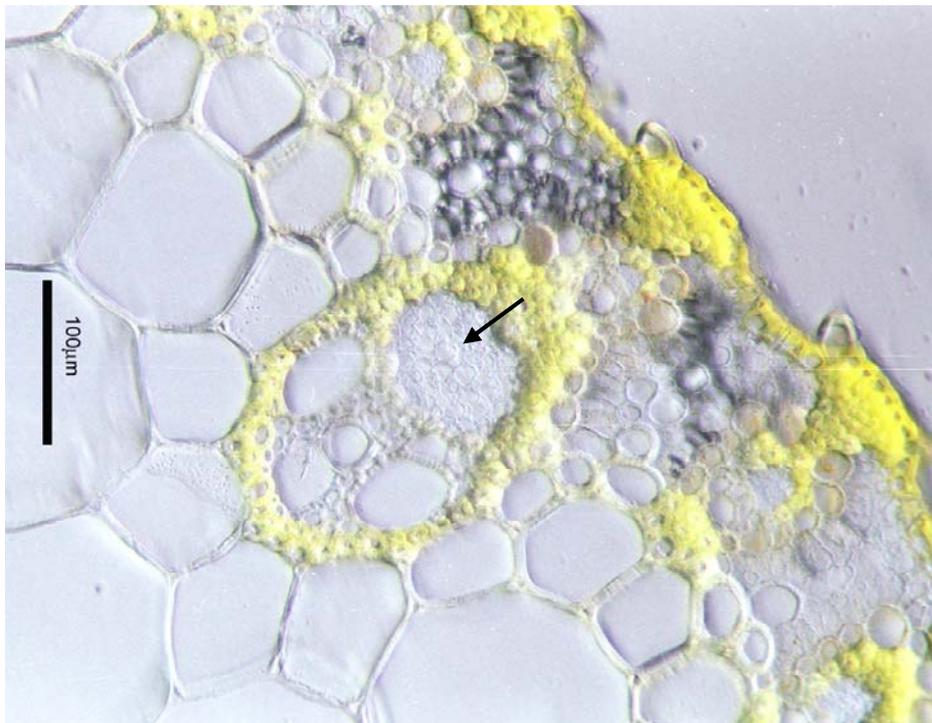


Figura 4. Corte transversal de folha com sintomas do amarelecimento foliar na variedade SP 71-6163 mostrando ausência de coloração do floema (seta) por vanilina-HCl. Microscopia de campo claro.

4.2. IMUNOLOCALIZAÇÃO DO VAFCA.

Os testes de “immuno printing” confirmam que o VAFCA é um vírus restrito ao floema, mas mostraram diferenças quanto ao número de feixes floemáticos infectados em cada uma das variedades examinadas.

Comparando plantas infectadas das três variedades, a que apresentou maior número de feixes mostrando presença do vírus no floema foi a variedade tolerante SP 70-1143. Nesta variedade praticamente todos os feixes vasculares apresentaram reação com os anticorpos específicos (Fig. 5).

Já a variedade mais sensível, que é a SP 71-6163, apresentou apenas alguns feixes contendo vírus, indicando menor concentração do patógeno nesta variedade. A presença ou não de sintomas não parece influenciar a quantidade de feixes infectados.

A variedade SP 81-3250 apresentou também poucos feixes com reação positiva, mas o seu número foi superior ao observado na variedade SP 71-6163 e menor do que o observado na SP 70-1143.

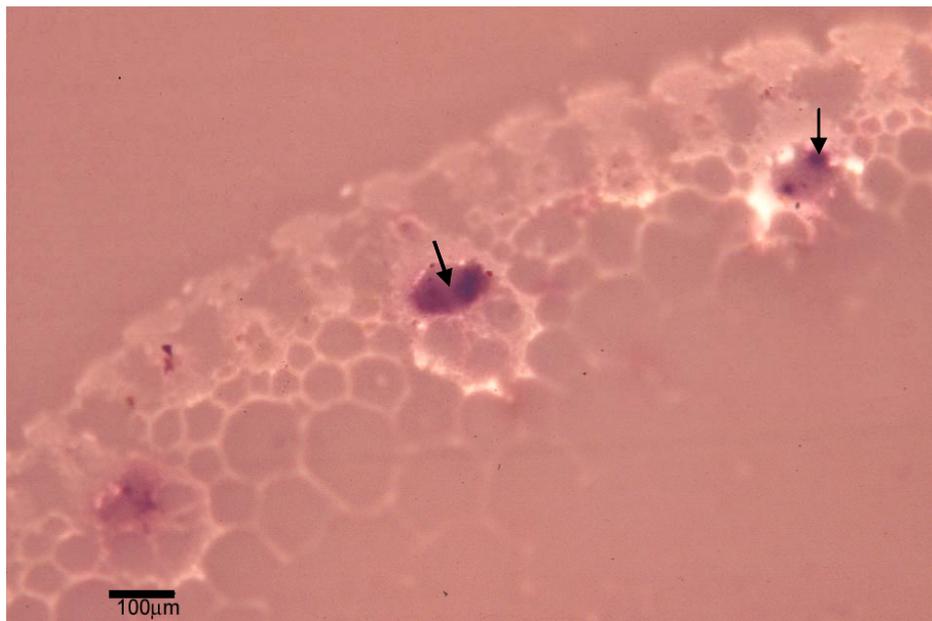


Figura 5. Imuno-localização do VAFCA em membrana de nitrocelulose (“Immuno-printing”) em folha da variedade SP 70-1143, mostrando todos os feixes com precipitado característico da localização do vírus (seta) restrito ao tecido floemático. Microscopia de campo claro.

4.3. LOCALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.

Nos testes de localização da peroxidase relacionada com a lignificação, siringaldazina peroxidase (SPX), verificou-se que a atividade enzimática se localiza principalmente no floema, e em menor proporção em células próximas à epiderme e subepiderme (Fig. 6 e 7).

Embora não se trate de um teste quantitativo, foram observadas grandes diferenças na intensidade de coloração, indicativas de diferenças nos níveis de atividade enzimática adsorvida na membrana.

Foram observadas reações em plantas da variedade SP 81-3250 e da variedade SP 71-6163, em todas as situações, sejam sadias, ou infectadas com e sem sintoma do amarelecimento foliar. Quando o sintoma do amarelecimento foliar na variedade SP 71-6163 é muito intenso, com nervura avermelhada, a coloração é muito mais forte do que nas outras situações vistas anteriormente. Já em testes com plantas infectadas e sadias da variedade SP 70-1143 a coloração foi fraca e muitas vezes ausente (Fig.8).

Utilizando o substrato 4-cloro-naftol, que detecta um número maior de peroxidases observa-se atividade claramente localizada no floema (Fig. 9) e na parte subepidérmica e epidérmica das folhas (Fig. 10). Quanto à intensidade da coloração observada não houve diferença entre plantas das três variedades examinadas. Diferentemente da siringaldazina peroxidase, as plantas SP 70-1143 sadias e infectadas apresentaram coloração claramente visível, semelhante à das outras variedades.

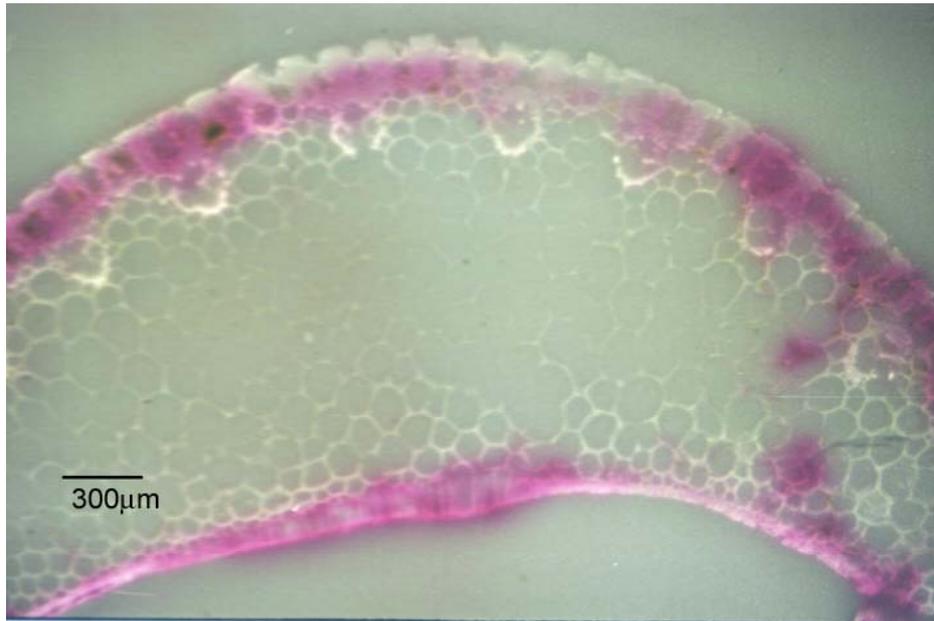


Figura 6. Corte transversal de folha da variedade SP 71-6163, impresso em membrana de nitrocelulose, mostrando a localização da atividade da siringaldazina peroxidase em células epidérmicas e células vizinhas.

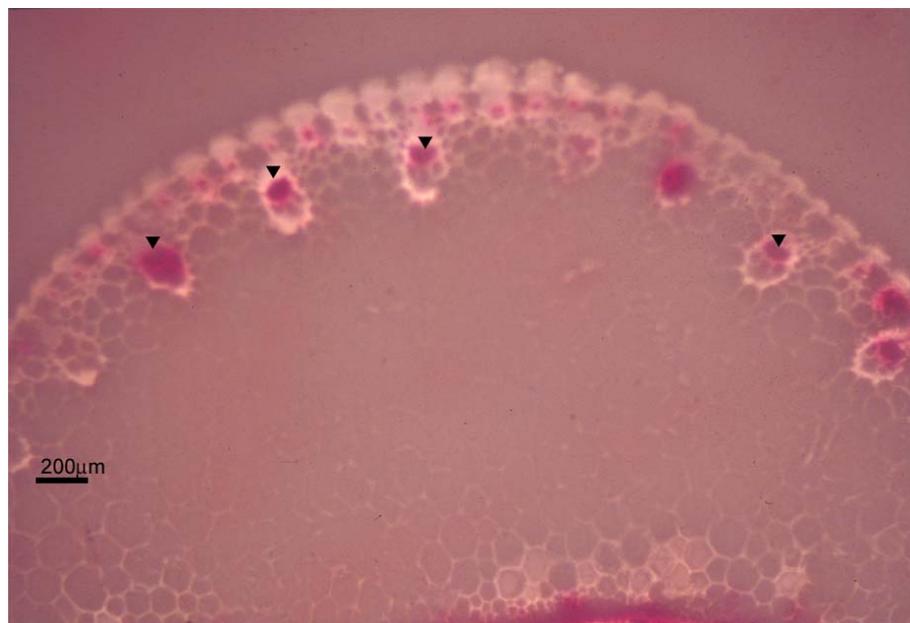


Figura 7. Corte transversal de folha da variedade SP 71-6163 sem sintoma, impresso em membrana de nitrocelulose, mostrando atividade da siringaldazina peroxidase (SPX) no interior do floema.



Figura 8. Corte transversal de folha da variedade SP 70-1143 sadia impresso em membrana de nitrocelulose, mostrando poucos tecidos com coloração característica da atividade da siringaldazina peroxidase (SPX)



Figura 9. Localização da atividade de peroxidases pelo substrato 4-cloro-naftol no interior do tecido floemático em membrana de nitrocelulose que recebeu impressão de corte transversal de folha da variedade SP 70-1143 infectada.

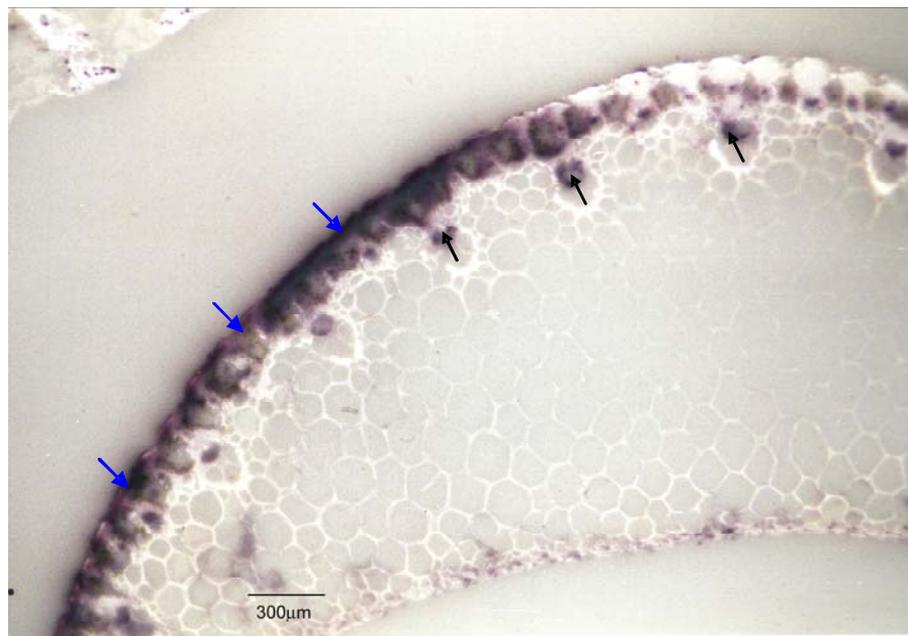


Figura 10. Localização da atividade de peroxidases pelo substrato 4-cloro-naftol no interior do floema (setas pretas) e na epiderme e tecidos próximos (setas azuis). Membrana de nitrocelulose que foi impressa com seção transversal de folha da variedade SP 70-1143 infectada.

4.4. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.

A atividade da guaiacol peroxidase (GPX) em plantas mantidas em casa de vegetação (Fig. 11) apresentou valores similares nas três variedades, quando infectadas. Observou-se uma tendência à maior atividade nas plantas infectadas das variedades SP 81- 3250 e SP 70-1143.

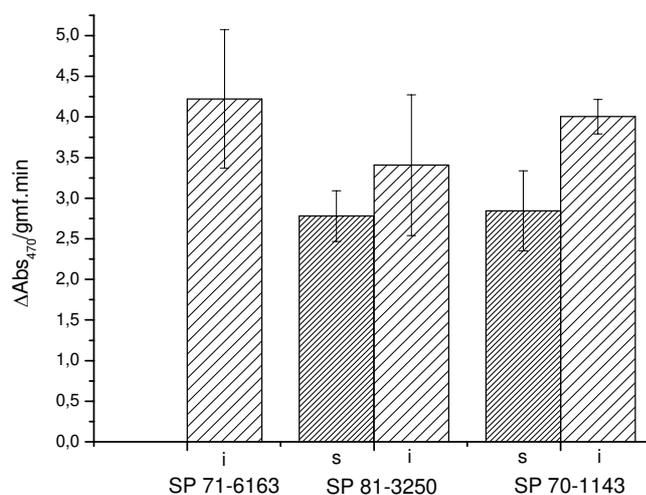


Figura 11. Atividades da guaiacol peroxidase (GPX) nas três variedades de cana-de-açúcar, sadias (s) e infectadas (i). Média de três plantas \pm erro padrão.

Quanto à atividade da siringaldazina peroxidase (SPX) houve diferenças, expressivas entre as variedades (Fig. 12). Assim, a média na variedade SP 71-6163 foi o dobro da observada na SP 70-1143, ambas infectadas pelo VAFCA. O efeito da infecção pelo VAFCA foi especialmente claro na SP 81-3250, na qual induziu um aumento significativo da SPX.

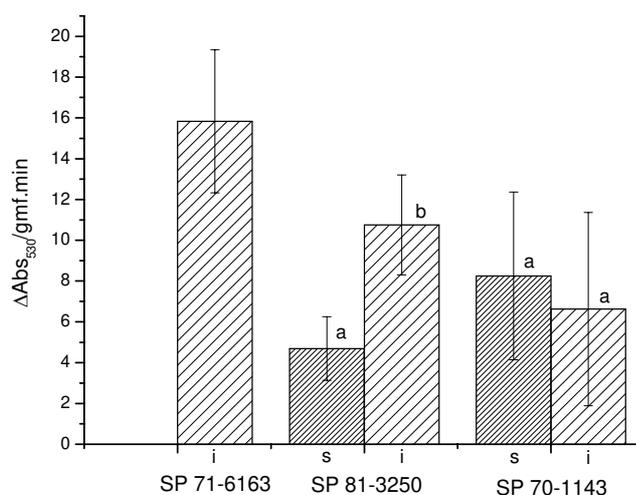


Figura 12. Atividades da siringaldazina peroxidase (SPX) nas três variedades de cana-de-açúcar, sadias (s) e infectadas (i). Média de três plantas \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre i e s ($P=0.05$) segundo o teste de Tukey

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) (Fig. 13) apresentou também diferenças entre as variedades quando infectadas pelo VAFCA: a SP 71-6163 apresentou 3 vezes a atividade medida na SP 70-1143. No caso desta última variedade, observou-se uma diminuição da atividade APX nas plantas infectadas, que foi equivalente a 43% da observada nas plantas sadias.

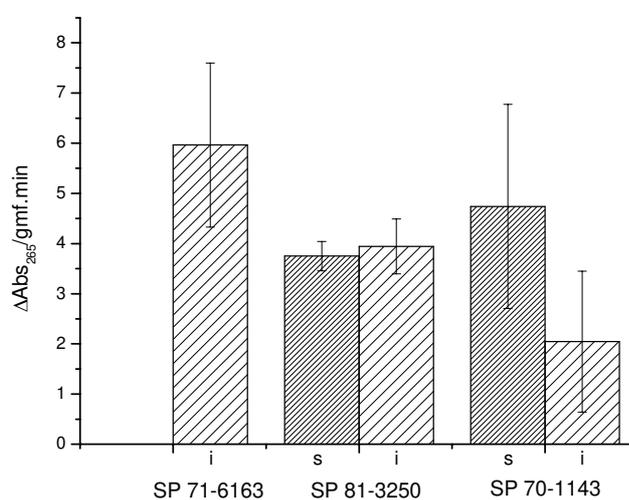


Figura 13. Atividades da ascorbato peroxidase (APX) nas três variedades de cana-de-açúcar, sadias (s) e infectadas (i). Média de três plantas \pm erro padrão.

5. DISCUSSÃO

O acúmulo de material fluorescente no interior do floema se observa consistentemente em folhas com sintomas de amarelecimento, de plantas infectadas pelo VAFCA, da variedade sensível SP 71-6163. Este material aparece também em algumas folhas de plantas infectadas desta variedade, mas sem sintomas, submetidas a condições ambientais que estimulam a manifestação de sintomas (condições de telado). Provavelmente estas folhas estavam na iminência de manifestar os sintomas da doença.

As variedades SP 81-3250 e SP 70-1143 não apresentaram material fluorescente no floema, e paralelamente não manifestaram sintomas de amarelecimento. Estes dados indicam uma relação direta entre o aparecimento de material fluorescente no floema e a manifestação dos sintomas. Provavelmente o aparecimento do material fluorescente é indicativo de disfunção do floema, que posteriormente levará ao aparecimento do sintoma de amarelecimento.

A observação em microscopia de fluorescência fornece informação sobre os compostos presentes no tecido examinado. Neste sentido nota-se uma grande diversidade de interpretações das cores observadas, estas *per se* sujeitas à avaliação subjetiva. Por outro lado, a cor da fluorescência pode ser alterada por pequenas modificações nas condições de observação, que nem sempre podem ser reproduzidas exatamente. Desta forma a interpretação das observações com base na informação da literatura deve ser avaliada sempre considerando as eventuais diferenças de material e métodos.

Uma das enzimas que, neste trabalho, tem sua atividade aumentada na planta doente é a siringaldazina peroxidase (SPX), envolvida na fase final da lignificação. Por outro lado esta peroxidase localiza-se principalmente no floema, como mostrado no presente trabalho, indicando a possibilidade de que o material depositado no floema fosse constituído por lignina. O material observado no floema apresenta fluorescência azul-esverdeada nas observações feitas no ultravioleta. A fluorescência azul-esverdeada da maioria dos tecidos foliares tem sido interpretada como indicativa da presença de ácido ferúlico ligado à parede celular (Lichtenthaler & Schwieger, 1998). Lignina também apresenta fluorescência azul-esverdeada, que pode ser diferenciada do ácido ferúlico por tratamento com álcali (amônia). A lignina não muda a cor de fluorescência após o tratamento, ao passo que as paredes celulares contendo ácido ferúlico passam a fluorescer na cor verde (Harris & Hartley, 1976). No presente trabalho a aplicação desse método não permitiu chegar a nenhuma conclusão, em razão da inconsistência dos resultados.

Os testes com vanilina-HCl indicam que catequinas ou taninos condensados estão ausentes ou em quantidades não detectáveis no material encontrado no floema.

Os resultados mais consistentes foram obtidos com o reagente de Neu, que tornou amarela a fluorescência do material acumulado no floema, indicando que o mesmo é composto predominantemente por flavonóides (Mondolot-Cosson & Andary, 1994). A permanência do material observado no floema durante longo tempo de observação indica baixa solubilidade do mesmo. Provavelmente a baixa

solubilidade esteja relacionada com o grau de glicosilação do flavonóide. A glicosilação reduz a reatividade química e aumenta a solubilidade em água de diversos compostos secundários, entre eles os fenilpropanóides (Chong *et al.*, 2002). Provavelmente o depósito de flavonóides no floema ocorre na forma não glicosilada, o que aumentaria sua atividade, tornando-o mais eficiente numa possível atividade antiviral.

Chong *et al.* (2002) mostraram que a escopoletina, um fenilpropanóide derivado do ácido ferúlico, tem atividade antiviral, em testes realizados em protoplastos de fumo com o vírus do mosaico do tabaco. Flavonóides também são moléculas derivadas da via dos fenilpropanóides, possuindo estruturas químicas muito próximas.

Uma possibilidade é que este composto tipo-flavonóide seja uma fitoalexina, já que são conhecidos flavonóides que se comportam como tal. Uma das linhas de evidência que permite caracterizar um composto como fitoalexina é a localização desse composto no mesmo tecido em que ocorre o patógeno (Hammerschmidt, 1999). Assim, Keen (1981) descreve como uma das linhas de evidência que sustentam o papel das fitoalexinas, em resistência a doenças, a “localização e tempo de acúmulo de fitoalexinas em tecidos infectados em relação ao desenvolvimento do patógeno”. O tecido em que se encontra o composto analisado neste trabalho é o mesmo em que se localiza o vírus, atendendo nesse aspecto um dos caracteres básicos das fitoalexinas. Quanto ao “desenvolvimento do patógeno” deve ser levado em consideração que as plantas de cana estudadas apresentavam infecção sistêmica, pois eram originadas por multiplicação

vegetativa de material infectado e, portanto, o tempo de acúmulo do material no floema não está relacionado com o desenvolvimento do patógeno. Mesmo assim os dados de quantificação do vírus em diferentes variedades (Scagliusi, 2003), mostram que o VAFCA alcança concentrações de 78 ng vírus/g massa fresca na variedade tolerante SP70-1143, que não apresenta material fluorescente no floema. Já a variedade mais sensível, que mostra abundante material no floema (SP 71-6163), contém 45 ng vírus/g massa fresca. Outra constatação relacionada com a concentração viral é a observação de que na variedade SP 70-1143 (tolerante) ocorre um número muito maior de feixes contendo vírus do que nas variedades mais sensíveis, nos exames de “immuno-printing”. Esses dados indicam uma possível ação antiviral relacionada com a atividade da SPX e com o material fluorescente presente no floema.

A atividade da peroxidase genérica, avaliada pelo substrato 4-cloro-naftol, é encontrada em células no interior do tecido floemático de todas as variedades estudadas neste trabalho, infectadas ou não. A localização da atividade da siringaldazina peroxidase (SPX) é também verificada no interior do floema, sítio de infecção do VAFCA. Mas no caso da SPX observa-se grande diferença entre as variedades. A variedade tolerante (SP 70-1143) apresenta pouca ou nula atividade no floema, ao passo que as variedades sensíveis, SP 71-6163 e SP 81-3250, mostram intenso acúmulo do produto da reação no floema.

É possível que a atividade da SPX esteja ligada ao aparecimento do material fluorescente no tecido floemático. Sabe-se que a SPX catalisa a fase final da formação da lignina, promovendo oxidação dos monolignóis, também com

estrutura de fenilpropanóides, que a seguir formariam polímeros (Buchanan *et al.*, 2002).

A avaliação da atividade da guaiacol peroxidase (GPX) em extratos, mostra uma tendência de aumento da atividade em plantas infectadas, embora as diferenças não atinjam o nível de significância estatística provavelmente em função da alta variabilidade observada. Estes dados mostram que a atividade GPX é relativamente pouco afetada pela infecção viral nas condições do experimento, realizado em plantas mantidas em casa de vegetação. Em plantas cultivadas em campo, Scagliusi (2003) observou aumento significativo da GPX nas plantas infectadas, em relação às sadias.

Quanto à atividade da SPX avaliada em extratos, observa-se um significativo aumento associado à infecção na variedade sensível (SP 81-3250), ao passo que na variedade tolerante (SP 70-1143) não há alteração significativa. Na variedade mais sensível (SP-71-6163) não foi possível comparar material infectado com folhas sadias ou sem sintomas da mesma idade. Resultado similar foi descrito para planta em condições de campo, mas unicamente para variedades sensíveis ao VAFCA (Scagliusi, 2003).

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) não apresentou diferenças entre plantas sadias e infectadas da variedade sensível SP 81-3250. Esta enzima está relacionada com o metabolismo antioxidativo, que por sua vez, está associado com outras enzimas deste ciclo, como a superóxido dismutase e a catalase, que controlam a quantidade de espécies reativas de oxigênio. Sabe-se que em plantas que desenvolvem a reação de hipersensibilidade (HR), a quantidade de espécies

reativas de oxigênio aumenta bruscamente (“oxidative burst”) durante a formação da lesão e o isolamento do patógeno (Venisse *et al.*, 2001). Mas como as plantas estudadas neste trabalho estão com infecção crônica, estes mecanismos não devem estar sendo utilizados, não havendo, portanto, alteração na atividade da APX.

É interessante observar que a variedade tolerante ao VAFCA, SP 70-1143, é a que possui baixa atividade da enzima SPX no floema e também a que apresenta maior número de feixes infectados pelos vírus. Além deste fato, esta variedade também não apresenta acúmulo de flavonóide no floema, já que não desenvolve o sintoma de amarelecimento foliar. Em contrapartida, a variedade mais sensível, SP 71-6163, apresenta poucos feixes infectados, em comparação à variedade tolerante, atividade da SPX relativamente alta e acúmulo de material rico em flavonóides no tecido floemático. Apesar da variedade mais sensível apresentar maiores danos devido à infecção pelo VAFCA, parece ser ela a que apresenta resposta defensiva mesmo em material invadido sistemicamente. Nesta variedade o vírus parece alcançar uma concentração menor que na variedade tolerante, mas a planta acaba sofrendo danos em tecidos vitais, como floema, o que leva à manifestação de sintomas mais severos.

6. CONCLUSÕES

1. O material fluorescente visualizado no interior do floema de cana-de-açúcar, que está vinculado com o aparecimento de sintoma do amarelecimento foliar, é uma resposta à infecção pelo VAFCA na variedade mais sensível.
2. O material fluorescente encontrado no tecido floemático possui propriedades citoquímicas características dos flavonóides.
3. A variedade de cana-de-açúcar mais sensível ao VAFCA apresenta poucos feixes vasculares contendo vírus e alta atividade da siringaldazina peroxidase, localizada principalmente no floema.
4. A variedade de cana-de-açúcar tolerante ao VAFCA não apresenta material fluorescente no floema, tem um grande número de feixes que contêm vírus e tem baixa atividade da siringaldazina peroxidase, em condições de casa de vegetação.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abbot, E.V., Martin, J.P., Abbot, E.B., Hughes, G.G. 1961. Mosaic: Sugarcane diseases of the world. Elsevier Publishing, 542 p.
- Amako, K., Chen, G.X., Asada, K. 1994. Assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isoenzymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant Cell Physiol.* 35(3):497-504.
- Arruda, S.C. 1946. As doenças de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo. Mosaico. *O Biológico*, 13:21-27.
- Asada, K., Kiso, K., Yoshikawa, K. 1974. Univalent Reduction of Molecular Oxygen by Spinach Chloroplasts on Illumination. *J. Biol. Chem.*, 249:2175 - 2181.
- Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85:235-241.
- Atabekov, J.G. & Taliansky, M.E. 1990. Expression of plant virus-coded transport function by different viral genomes. *Advances in virus research*, 38:201-248.
- Atabekov, J.G., Taliansky, M.E., Drampyan, A.H., Kaplan, I.B., Turka, I.E. 1984. Systemic infection by a phloem-restricted virus in parenchyma cells in mixed infection. *Biol. Nauki*, 10:28-31.
- Bailey, R. A., Brechet, G.R. & Cronjé, C.P.R. 1996. notes on the occurrence of yellow leaf syndrome of sugarcane in southern Africa. *Proceedings of the South Africa Technologists Association*, 70:3-6.

- Baker, H. 1987. Invasion of non-phloem tissue in *Nicotiana clevelandii* by potato leafroll luteovirus in enhanced in plants also infected with potato Y potyvirus. *J. Gen. Vir*, 68:1223-1227
- Baucher M., Monties B., Van Montagu M., Boerjan W. 1998. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17:125–97.
- Boudet, A-M., Lapierre, C., Grima-Pettenati. 1995. Biochemistry and molecular biology of lignification. *New Phytol.* 129:203-236.
- Boudet, A-M. 2000. Lignins and lignification: Select issues. *Plant Physiol. Biochem.* 38:81-96.
- Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, L. R. 2002. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Publisher: John Wiley and Sons.
- Chen, G-X. & Asada, K. 1989. Ascorbate peroxidase in tea leaves: Occurrence of two isozymes and their differences in enzymatic and molecular properties. *Plant cell Physiol.* 30:987-998.
- Chen, G-X. & Asada, K. 1990. Hydroxyurea and *p*-aminophenol are the suicide inhibitors of ascorbate peroxidase. *J. Biol. Chem.* 265:2775-2781.
- Chong, J., Baltz, R., Schmitt, C., Beffa, R., Fritig, B., Saindrenan, P. 2002. Downregulation of a Pathogen-Responsive Tobacco UDP-Glc:Phenylpropanoid Glucosyltransferase Reduces Scopoletin Glucoside Accumulation, Enhances Oxidative Stress, and Weakens Virus Resistance. *Downregulation of a Pathogen-Responsive Tobacco UDP-Glc:Phenylpropanoid Glucosyltransferase Reduces Scopoletin Glucoside*

- Accumulation, Enhances Oxidative Stress, and Weakens Virus Resistance. *Plant cell*, 14: 1093-1107.
- Comstock, J.C., Irey, M.S., Lockhart, B.E.L. & Wang, Z.K. 1994. Incidence of yellow leaf syndrome in CP cultivars based on polymerase chain reaction and serological techniques. *Sugar cane*, 4:21-28.
- El Modafar, C., Tantaoui, A., El Boustani, E. 2000. Changes in cell wall-bound phenolic compounds and lignin in roots of date palm cultivars differing in susceptibility to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedicanis*. *J. Phytopathol.* 148:405-411.
- Esau, K. & Hoefert, L.L. 1972. Ultrastructure of sugar beet leaves infected with *Beet western yellows virus*. *J. Struct. Research*, 40:245-251.
- Escarpa, A. & Gonzalez, M. C. 2001. An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic Compounds in Foods. *Critical Rev. Analytical Chem.* 31(2):57–139 .
- Fontaniella, B., Vicente, C., Legaz, M.E., Armas, R., Rodríguez, C.W., Martínez, M., Piñón, D., Acevedo, R., Solas, M.T. 2003. Yellow leaf syndrome modifies the composition of sugarcane juices in polysaccharides, phenols and polyamines. *Plant Physiol. Bioch.* 41: 1027-1036.
- Goldeberg, R., Catesson, A-M, Czaninski, Y. 1983. Some properties of syringaldazine oxidase, a peroxidase specifically involved in the lignification processes. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 110:267-279.
- Hammerschmidt, R. 1999. PHYTOALEXINS: What Have We Learned After 60 Years? *Annual Rev. Phytopathol.* 37: 285-306.

- Harris, P.J. & Hartley, R.D. 1976. Detection of bound ferulic acid in cell walls of Gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy. *Nature*. 259:508-510.
- Hernández, J.A., Talavera, J.M., Martínez-Gómez, P., Dicenta, F., Sevilla, F. 2001. Response of antioxidative enzymes to plum pox virus in two apricot cultivars. *Physiol. Plant.* 111:313-321.
- Higuchi, T. 1990. Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood Science and Technology*. 24:23-63.
- 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.
- Hutzler, P., Fischbach, R., Heller, W., Jungblut, T.P., Reuber, S., Schmitz, R., Veit, M., Weissenböck, Schnitzler, J-P. 1998. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *J. Exp. Bot.* 49(323):953-965.
- Irey, M.S., Baucum, L.E., Derrick, K.S., Manjunath, K.L., Lockhart, B.E. 1997. Detection of the luteovirus associated with yellow leaf syndrome of sugarcane (YLS) by a reverse transcriptase polymerase chain reaction and incidence of YLS in commercial varieties in Florida. Proceedings of the ISSCT 5th Pathology and 2nd Molecular biology workshop.
- Irvine, J.E. 1993. A síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar no Brasil. Texas Agricultural Experiment Station Report, Weslaco, 22p.
- Jensen, S.G. 1969. Occurrence of virus particles in the phloem tissue of BYDV infected barley. *Virology*, 38:83-91.

- Jímenez, A., Hernández, J.A., del Río, L.A., Sevilla, F. 1997. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol.* 114:275-284.
- Keen, N.T. 1981. Evaluation of the role of phytoalexins. *Plant Disease Control*, ed. RC Staples, GH Toenniessen, pp. 155-177, New York; Wiley.
- Lamb, C. & Dixon, R.A. 1997. the oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:251-275.
- Lichtenthaler, H.K. & Schweiger, J. 1998. Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants. *J. Plant Physiol.* 152:272-282.
- Mehdy, M.C., Sharma, Y.K., Sathasivan, K., Bays, N.W. 1996. The role of activated oxygen species in plant disease resistance. *Physiol. Plant.* 98:365-374.
- Mondolot-Cosson, L. & Andary, C. 1994. Resistance factors of a wild species of sunflower, *Helianthus resinosus*, to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Acta horticult.* 381:642-645.
- Nakano, Y. & Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant Cell Physiol.* 22:867-880.
- Peyrano G, Taleisnik E, Quiroga M, Forchetti SM, Tigier H. 1997. Salinity effects on hydraulic conductance, lignin content and peroxidase activity in tomato roots. *Plant Physiol. Bioch.* 35: 387-393.
- Reimers, P.J. & Leach, J.E. 1991. Race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* conferred by bacterial blight resistance gene XA-10 in

- rice *Oryza sativa* involves accumulation of a lignin-like substance in host tissues. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 38: 39-55.
- Scagliusi, S.M.M. & Lockhart, B.E. 2000. Transmission, characterization and serology of a luteovirus associated with yellow leaf syndrome of sugarcane. *Phytopathol.* 90:120-124.
- Scagliusi, S.M.M. 2003. Vírus do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar: caracterização e estudo comparativo entre variedades com diferentes respostas à infecção viral. Universidade estadual de Campinas, Campinas, tese de doutorado.
- Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. 1999. Farmacognosia da planta ao medicamento. 4 edição, Editora UFSC e Editora da Universidade, Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Universidade Federal de Santa Catarina, p.501, 502.
- Smith, C.J. 1995. Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. *New Phytol.* 132:1-45.
- Smith, H.G. & Barker, H. 1999. The luteoviridae. 1rd Edition, CAB I Publishing, New York.
- Sordi, R. 1996. Relatório Anual Copersucar.
- Young, P.R. 1989. An improved method for the detection of peroxidase-conjugated antibodies on immunoblots. *J. Virology Methods.* 24:227-236.
- Valete, C., Andary, C., Geiger, J.P., Sarah, J.L., Nicole, M. 1998. Histochemical and cytochemical investigations of phenols in roots of banana infected by burrowing nematode *Radopholus similis*. *Phytopath.*, 88: 1441-1148.

- Vance , C.P., Kirk, T.K., Sherwood, R.T.1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18:259-288.
- Vega, J., Scagliusi, S.M.M., & Ulian, E.C. 1997. Sugarcane yellow leaf disease in Brazil: Evidence of association with a luteovirus. *Plant disease*, 81:21-26.
- Venisse, J-S., Gullner, G., Brisset, M-N. 2001. Evidence for the Involvement of an Oxidative Stress in the Initiation of Infection of Pear by *Erwinia amylovora*. *Plant Physiol.* 125: 2164-2172.
- Vogt, T., Pollak, P., Tarlyn, N., Taylor, L.P. 1994. Pollination- or wound-induced kaempferol accumulation in petunia stigmas enhances seed production. *Plant Cell.* 6:11-23.

