

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL

"ESTUDO COMPARATIVO DA CITOPATOLOGIA DE INFECÇÕES SIMPLES E MISTAS POR ALGUNS VÍRUS DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)"

JULIO OSCAR MUÑOZ

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Fitopatologia.

BRASÍLIA

1983

Trabalho realizado junto aos Departamentos de Biologia Vegetal e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Professor Elliot Watanabe Kitajima, com apoio institucional da Universidade Nacional de Córdoba - Argentina.

Aprovado por:

Professor Elliot Watanabe Kitajima
Orientador

Professor Cláudio Lúcio Costa

Professor Ming-Tien Lin

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Elliot Watanabe Kitajima, por toda a sua ajuda e ensinamentos.

Aos professores Cláudio Lúcio Costa e Ming-Tien Lin, pelas sugestões e correção do manuscrito.

A todos os demais professores do Curso de Mestrado em Fitopatologia, pela ajuda e amizade.

Aos Professores Sergio Fernando Nome e Delia Docompo por seu estímulo, ao igual que aos colegas de Fitopatologia da Universidade Nacional de Córdoba.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, e à Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP, pelo suporte financeiro para pesquisas.

À Universidade Nacional de Córdoba, pela permissão para realização do curso.

Ao colega Antonio Felix da Costa, pelo fornecimento, manutenção e inoculação dos vírus empregados neste estudo.

A todos os colegas do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília, por sua colaboração e amizade, especialmente a Antonietta Rubini Carfero, pelo seu apoio técnico e compreensão.

A todos os funcionários do Laboratório de Fitopatologia da Universidade de Brasília.

Aos meus colegas de curso, especialmente pela amizade que me brindaram.

A Juvenil E. Cares, Osmar Crestani, Terezinha Crestani e Gilmar P. Henz, pela colaboração na montagem.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1 Fonte dos vírus	11
2.2 Manutenção dos vírus	12
2.3 Plantas hospedeiras para estudos citopatológicos	12
2.4 Inoculação de plantas com vírus	12
2.5 Testes sorológicos	14
2.6 Microscopia eletrônica	14
2.7 Imuno Microscopia eletrônica com anticorpo marca do com ouro coloidal	15
2.8 Microscopia de luz	16
3. RESULTADOS	18
3.1 Inoculações e sintomas	18
3.2 Identificação dos vírus nas plantas inoculadas	18
3.2.1 Testes sorológicos	18
3.2.2 Morfologia das partículas	18
3.3 Exames histológicos	20
3.3.1 Testemunha	20
3.3.2 Inoculações simples	20
3.3.2.1 Vírus do mosaico comum do feijoeiro	20
3.3.2.2 Vírus do mosaico-em-desenho do fei- joeiro	23
3.3.2.3 Vírus do mosaico do sul do feijoeiro	26
3.3.2.4 Vírus do mosaico severo do caupi-iso lado do feijoeiro	31
3.3.3 Inoculações mistas	35
3.3.3.1 Vírus do mosaico comum do feijoeiro e vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro	35

3.3.3.2	Vírus do mosaico comum do feijoeiro e vírus do mosaico do sul do feijoeiro	37
3.3.3.3	Vírus do mosaico comum do feijoeiro e vírus do mosaico severo do caupi-isolado do feijoeiro	42
3.3.3.4	Vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro e vírus do mosaico do sul do feijoeiro	45
3.3.3.5	Vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro e vírus do mosaico severo do caupi-isolado do feijoeiro	51
3.3.3.6	Vírus do mosaico do sul do feijoeiro e vírus do mosaico severo do caupi-isolado do feijoeiro	53
3.3.4	Estudo com vírus do mosaico amarelo do feijoeiro	55
3.4	Detecção do vírus do mosaico severo do caupi-isolado do feijoeiro e do vírus do mosaico do sul do feijoeiro 'in situ' pela técnica da imunomicroscopia eletrônica	60
3.5	Tipos e localização das inclusões induzidas pelos vírus estudados (Tabela 1)	62
3.6	Localização das partículas em células e tecidos (Tabela 2)	63
4.	DISCUSSÃO	64
4.1	Infecções simples	64
4.1.1	Vírus do mosaico comum do feijoeiro	64
4.1.2	Vírus do mosaico amarelo do feijoeiro	66
4.1.3	Vírus isométricos	67
4.1.3.1	Vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro	68

	Página
4.1.3.2 Vírus do mosaico do sul do feijoeiro	69
4.1.3.3 Vírus do mosaico severo do caupi-iso lado do feijoeiro	71
4.2 Infecções mistas	73
4.2.1 Vírus do mosaico comum do feijoeiro e vírus isométricos	73
4.2.2 Infecções mistas por vírus isométricos	75
5. RESUMO	78
6. SUMMARY	81
7. LITERATURA CITADA	84

1. INTRODUÇÃO

O feijão é uma fonte tradicional de proteínas na alimentação humana em vários países, especialmente os subdesenvolvidos. A estes correspondeu 84,6% do total da produção mundial de feijão seco de 1980, que foi de 14.660.000 ton. (FAO, 1980). Analisando-se a produção por continente ou regiões nota-se que a Ásia participou com 49,8% nesse total, sendo a América Latina a segunda maior produtora com 4.056.000 ton., representando 27,6% do total desse ano. Fazendo-se uma retrospectiva da produção do subcontinente observa-se que a de 1980 é apenas 4,4% maior do que a média anual no período 1969/71. Contudo esse aumento é devido a um incremento na superfície cultivada já que nesses dez anos ocorreu uma queda paulatina no rendimento, chegando-se em 1980 a um valor de 542 kg/ha, que é 10,4% menor do que em 1969/71, quando foi de 605 kg/ha (FAO, 1976).

O quadro que apresenta a produção de feijão no subcontinente reflete diretamente o que acontece no Brasil, que em 1980 teve uma safra de 1.975.000 ton., e um rendimento de 459 kg/ha. Dez anos atrás a produção do Brasil era de 2.366.000 ton., com um rendimento de 642 kg/ha (FAO, 1976), o que significa uma diminuição de 16,5% e 28,5%, respectivamente.

As causas desta queda nos rendimentos na América Latina e no Brasil são numerosas e têm sido detalhadas em trabalhos recentemente publicados (Jayasinghe, 1982; Costa, 1983). Neles reconhece-se que as doenças ocupam um lugar de relevância entre as causas da baixa produtividade do feijão no subcontinente. As moléstias ocasionadas por fungos são as mais numerosas e entre elas encontram-se a maioria das mais importantes para o cultivo. As de etiologia viral vêm a seguir, algumas delas tendo adquirido expressiva importância e-

conômica recentemente (Gámez, 1977). O número exato das doenças produzidas por vírus na América Latina ainda não é conhecido devido principalmente à incompleta caracterização dos causadores e suas estirpes e às variações na sintomatologia induzidas em diferentes regiões por um mesmo agente, o que ocasiona confusões (Jayasinghe, 1982).

Alguns dos principais vírus do feijoeiro no subcontinente, como os vírus do mosaico amarelo (VMAF) e os do mosaico comum do feijoeiro (VMCF), são de distribuição mundial (Bos, 1970; 1971). O vírus do mosaico do sul do feijoeiro (VMSF) ocorre em regiões temperadas e tropicais da América e África, tendo sido relatado também na França (Shepherd, 1971). Outros parecem estar restritos à América, como o vírus do mosaico dourado do feijoeiro (VMDF), se bem que moléstias similares têm sido constatadas na Ásia e na África (Muniyappa, 1980). O vírus do mosaico severo do caupi (VMSC) encontra-se na mesma situação de distribuição que o VMDF (de Jager, 1979), tendo sido recentemente encontrado um isolado (VMSC-F) que parece ter-se adaptado ao feijoeiro, no Centro Oeste do Brasil (Cupertino *et al*, 1982b). Já o vírus do mosaico rugoso do feijoeiro (VMRF) tem sido relatado apenas para América Central e Estados Unidos (Gámez, 1982), embora recentemente demonstrou-se que o vírus do mosaico-em-desenho (VMDeF), presente no Brasil, é uma estirpe daquele (Lin *et al*, 1981b).

Todavia há vários vírus que só ocorrem na América Latina. Este é o caso dos vírus da clorose infecciosa das Malváceas (VCIM), que produz o mosaico anão do feijoeiro e o do mosaico das euforbiáceas (VME), que causa encarquilhamento das folhas (Costa *et al*, 1972; Gámez, 1977). O vírus do mosaico suave do feijoeiro ("bean mild mosaic virus" - BMMV) tem sido relatado em El Salvador e Colômbia (Waterworth, 1981), enquanto que o "bean curly dwarf mosaic virus"-BCDMV parece ocorrer apenas em El Salvador (Meiners *et al*, 1977).

No Brasil têm sido assinaladas mais de dez moléstias causadas por vírus (Costa *et al*, 1972; Costa, 1975). Algumas delas encontram-se amplamente disseminadas no país e

são de ocorrência generalizada enquanto outras aparentemente estão mais limitadas a determinadas áreas (Camargo *et al*, 1968; 1969; Costa *et al*, 1972; Trindade, 1979; Kitajima *et al*, 1980).

No que tange à região Centro Oeste, podem ser mencionadas quatro viroses como de ocorrência mais comum, causas em geral, de sintomas de mosaico, nanismo e necrose, com variações segundo a linhagem de feijoeiro, condições ambientais e, em alguns casos, segundo a estirpe do patógeno. Os quatro agentes são os VMCF (Trindade, 1979), VMDeF (Kitajima *et al*, 1980), VMSF (Cupertino *et al*, 1982c) e VMSC-F (Cupertino *et al*, 1982b).

Considerando a importância já estabelecida do VMCF, principalmente decorrente da sua transmissibilidade pela semente, e dos outros três vírus disseminados por besouros, Costa (1983) fez um extensivo trabalho analisando a susceptibilidade de cultivares de feijoeiro e algumas outras leguminosas cultivadas a esses vírus. Das 169 cultivares de feijão estudadas, 59 foram infectadas sistemicamente com o VMCF, 158 com o VMDeF, 156 com o VMSF e 46 com o VMSC-F. Também inclui o trabalho de Costa, uma avaliação do efeito da infecção de pares desses vírus na sintomatologia e em vários parâmetros do feijoeiro tendo em vista a grande possibilidade disto ocorrer natureza. Verificou-se nesses ensaios que as infecções duplas resultaram sempre em sintomas mais severos do que as simples especialmente naquelas combinações incluindo o VMSF. Em vários dos parâmetros analisados houve efeito sinérgico.

Todos estes quatro vírus têm sido bem caracterizados, com as propriedades necessárias para a sua identificação correta, adequadamente determinadas (Bos, 1971; Shepherd, 1971, de Jager, 1979; Sperandio, 1982).

O VMCF é um típico representante do grupo dos potyvirus, tendo sido colocado no subgrupo I, segundo o tipo de inclusões citoplasmáticas que produz (Edwardson, 1974). Encontra-se disseminado em quase todo o Brasil, havendo-se identificado isolados pertencentes aos grupos de estirpes I, II e IV de Drijfhout (1978), sendo os do Distrito Federal os únicos que responderam ao grupo IV (Trindade, 1979). Perpetua-

se pela semente em percentagens variáveis e é transmitido por espécies de afídeos tais como *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis fabae* e *Myzus persicae*. Os sintomas que produz variam segundo as estirpes do vírus e cultivares infectadas. Estas se classificam em tolerantes, sensíveis e hipersensíveis segundo o grau de susceptibilidade. Em cultivares sensíveis observa-se o sintoma mais conspícuo, constituído por um mosaico com áreas de cor verde intensa ao longo das nervuras principais das folhas superiores (Bos, 1971).

É difícil de se obter suspensões puras e com alta concentração de partículas para empregar em serodiagnóstico, ao que se agrega o problema da sua baixa concentração em plantas infectadas no cultivo (Bos, 1971). Contudo, tem-se podido comprovar que o VMCF está relacionado sorologicamente aos vírus do mosaico da soja (VMS), "pea leaf roll" e VMAF, entre outros (Edwardson, 1974).

O VMCF possui partículas alongadas de 750 nm de comprimento médio. Nas células dos tecidos infectados aparecem isoladas ou, mais comumente, dispostas paralelamente ao lado da parede celular ou das inclusões. Estas apresentam-se amorfas ou incluindo cataventos, lamelas e túbulos (Camargo *et al*, 1968; Edwardson, 1966; 1974).

O VMDeF foi isolado pela primeira vez em 1969, de plantas de feijão cultivadas na região de Campinas (Camargo *et al*, 1969). Inicialmente tido como uma estirpe do vírus do mosaico do sul do feijoeiro (Camargo, 1973), é considerado na atualidade uma estirpe do VMRF, pertencendo portanto ao grupo dos comovírus (Lin *et al*, 1981 b). No Distrito Federal o VMDeF foi constatado em meados de 1979 afetando um cultivo de feijoeiro no Núcleo Rural da Vargem Bonita (Kitajima *et al*, 1980). Posteriormente comprovou-se a sua aparição frequente em cultivos de feijão de diferentes áreas rurais (Sperandio, 1982). Ocorre também no Estado do Paraná (Bianchini & Lin, comunicação pessoal).

O sintoma típico do VMDeF é um mosaico em padrões simétricos na maioria das cultivares susceptíveis, cau-

sando em algumas, necrose do topo e morte das plantas (Costa, 1983). O vírus não se perpetua pela semente e na natureza é transmitido pelas espécies de coleópteros Crisomelídeos ("vaquinhas") *Cerotoma arcuata* Oliv. e *Diabrotica speciosa* Germ. (Sperandio & Costa, 1982) que são também vectores do VMSF (Silveira *et al*, 1983) e do VMSC-F (Costa *et al*, 1981).

O diâmetro médio das partículas do VMDeF é de 25-30 nm e nas células dos tecidos infectados elas podem ser observadas formando pequenos agregados ou arranjos cristalinos situados em zonas ricamente vesiculadas do citoplasma. Junto a estes aparece freqüentemente outra estrutura cristalina menos densa aos elétrons, possivelmente de natureza proteica (Camargo *et al*, 1976).

O VMSF integra o grupo dos sobemovírus, junto a um membro estabelecido e outros quatro possíveis, segundo a proposta de Hull (1977), aceita pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (Matthews, 1982). Relatado recentemente no Brasil, até o momento parece estar restrito ao Distrito Federal onde foi encontrado em 1979 produzindo infecção em vários cultivos de feijão dos núcleos rurais que formam o cinturão verde de Brasília (Cupertino *et al*, 1982 c).

Os sintomas típicos causados pelo VMSF em feijoeiro são mosaico e mosqueado clorótico em variedades suscetíveis, podendo ocasionalmente produzir faixas nas nervuras (Shepherd, 1971). Este vírus perpetua-se pela semente, tendo a particularidade de que as plantas originadas de sementes contaminadas podem não manifestar sintomas externos (Jayashinge, 1982).

Sorologicamente, os sobemovírus não são relacionados entre eles nem com outros vírus (Hull, 1977; Sehgal, 1981). Apenas existe relação entre os isolados de caupi e feijão do VMSF (Sehgal, 1981).

As partículas do VMSF têm 25-30 nm de diâmetro e nas células de tecidos infectados aparecem livres no citoplasma, vacúolo e núcleo. A estirpe que ataca caupi induz também a formação de agregados de partículas de vírus dispostas

em arranjos cristalinos no citoplasma e no núcleo especialmente em células do parênquima vascular (Weintraub & Raquetli, 1970).

O VMSC é um comovírus durante muito tempo considerado uma estirpe do vírus do mosaico do caupi (VMCP), de ampla distribuição em regiões tropicais da América (de Jager, 1979). No Brasil, foi mencionado pela primeira vez em 1969 causando mosaico em feijão macassar no Estado de São Paulo (Canner *et al*, 1969; Costa *et al*, 1969). Posteriormente comprovou-se a sua disseminação em diferentes regiões do país (Lima & Nelson, 1973; Costa *et al*, 1978; Paguio, 1979; Lin *et al*, 1981d). Estreitamente relacionado ao vírus do mosaico do caupi (VMCP), apresenta menor grau de proximidade sorológica com os VMRF, do "pod mottle" do feijoeiro (BPMV) e do mosaico da abóbora (VMA), entre outros comovírus (Stace-Smith, 1981).

Um isolado desse vírus, com características ligeiramente diferentes dos outros, foi recuperado de feijoeiro no Distrito Federal (Cupertino *et al*, 1982b), tendo sido distinguido sorologicamente como pertencente ao serotipo IV (Lin *et al*, 1981 c). Os sintomas produzidos em cultivares susceptíveis de feijoeiro consistem basicamente num mosaico forte com deformação de folíolos (Costa, 1983). Numerosas variedades de feijoeiro reagem apenas com sintomas locais. Embora outros isolados de caupi possam perpetuar-se pelas sementes de caupi, nos feijoeiros infectados por VMSC-F não tem sido verificado tal comportamento (Costa, 1983).

O VMSC-F alcança altas concentrações de partículas nos tecidos infectados e é um vírus fortemente imunogênico (Lin *et al*, 1981 a). Tal como outros isolados do VMSC, o de feijoeiro possui partículas de 25-30 nm de diâmetro e nas células infectadas ocorrem em forma abundante no citoplasma e vacúolos (Kitajima, comunicação pessoal). Induz também o aparecimento de inclusões vesiculadas e/ou fibrilares contendo glóbulos osmiofílicos, grânulos lipídicos e partículas de vírus. É comum observar-se túbulos próximos à parede celular e protuberâncias desta contendo plasmodesmata modificados, com partículas de vírus no seu interior (Camargo, 1973).

Até o momento, os estudos relacionados com estes quatro vírus em feijoeiro, forneceram dados sobre infecções simples. Porém, a possibilidade de ocorrerem infecções mistas é alta, já que as variedades tradicionalmente cultivadas no Centro Oeste, (Guazzelli, 1980), são em sua maioria susceptíveis a eles (Costa, 1983). Todavia o fato de que os três vírus isométricos tenham as mesmas espécies de coleópteros como vetores, de comum ocorrência em feijoais, aumenta a probabilidade de tais infecções se apresentarem. Em lavouras de feijão-vaagem do Distrito Federal, já têm sido constatadas infecções mistas causadas por VMDeF e VMSF (Cupertino *et al*, 1982a) e desses vírus com o VMCF (Kitajima, dados não publicados).

Na literatura não há outras menções de infecções de combinações destes vírus, mas há numerosos relatos envolvendo outros, sendo vários os aspectos que podem ser considerados em tais casos.

Em relação a vetores, a infecção prévia por um vírus pode ser necessária para capacitar o vetor a transmitir outro (Rochow, 1975; 1982), havendo casos de rompimento da especificidade da relação vírus-vetor em infecções mistas (Rochow, 1972).

Plantas resistentes a invasão sistêmica por um vírus, podem perder essa resistência quando o mesmo é inoculado em combinação com outro vírus ao qual são susceptíveis. É o que acontece na cevada, que só desenvolve lesões locais quando inoculada com o vírus do mosaico do fumo (TMV), mas quando é inoculado em combinação com o vírus do mosaico do *Bromus* ("brome grass mosaic virus"-BMV), aquele pode invadir sistemicamente as plantas, atingindo altas concentrações (Hamilton & Nichols, 1977).

Em infecções mistas podem aparecer sintomas não produzidos por nenhum dos componente isoladamente, como as erações filiformes mencionadas em soja quando afetada pelos vírus do mosaico da soja (VMS) e do "pod mottle" do feijoeiro (BPMV) (Quiniones & Dunleavy, 1971). Por outro lado, pode haver um efeito sinérgico dos sintomas e danos produzidos pelos membros de uma combinação, como foi relatado em fumo "burley"

infectado por TMV e Y da batata (PVY), (Sievert, 1978).

Recentemente têm sido descritas novas doenças causadas por infecções mistas de vírus. Em caupi, a ação sinérgica do vírus do mosaico do pepino (VMP) e do mosaico do caupi 'Blackeye' ("blackeye cowpea mosaic virus - BLCMV) produz uma severa doença denominada "cowpea stunt" (Pio-Ribeiro *et al*, 1978). A ação combinada do TMV e PVY, causa o "tomato scorch" em tomateiro (Clark *et al*, 1980). Os vírus do mosqueado clorótico do milho ("maize chlorotic mottle virus" - MCLMV) e do mosaico anão do milho ("maize dwarf mosaic virus" - MDMV), foram encontrados causando severas perdas em híbridos de milho (Uyemoto *et al*, 1981), o mesmo acontecendo com os vírus do mosaico da couve flor (VMC) e do mosaico do nabo (VMN), em couve-manteiga (Khan & Demski, 1982). O mosqueado clorótico do feijoeiro ("bean chlorotic mottle") é uma doença que ataca feijoads na América Central e Colombia, anteriormente tida como causada por um vírus só; recentemente comprovou-se que é ocasionada por um complexo que inclui BMMV, VMSF e o VMP, (Jaya-singhe, 1982).

Um complemento muito importante na caracterização de um dado vírus é o estudo da citopatologia da infecção. Em virologia vegetal isto têm fornecido dados interessantes sobre as alterações causadas a nível celular e ultraestrutural. Assim, é possível detectar partículas de vírus *in situ* e identificar as modificações, indicando as interações do vírus com a célula infectada, e cujo conjunto reflete-se no sintoma externo da planta. Do ponto de vista prático, a consequência imediata é que em alguns casos as alterações celulares, notadamente o surgimento de certas inclusões, são específicas para determinadas combinações planta hospedeira e vírus, ou grupo de vírus, tendo assim valor diagnóstico. Algumas dessas alterações são também detectáveis ao microscópio de luz, de modo que sua observação representa uma maneira simples de completar uma diagnose feita por outros métodos.

A nível ultraestrutural, cada vírus componente de uma combinação pode manter as modificações que induz em

infecções simples. Em soja infectada por VMS e BPMV, foram encontradas inclusões e partículas de ambos os vírus na mesma célula, não havendo diferenças notáveis com as de infecções simples (Lee & Ross, 1972). O mesmo foi assinalado para a infecção de "ryegrass" italiano com os vírus do nanismo estéril da cevada ("oat sterile dwarf virus" - OSDV) e "ryegrass cryptic" (RGCV) da mesma espécie (Milne, 1980).

Porém, novas modificações podem aparecer como consequência de infecções mistas por vírus em plantas. Em clooplastos de células foliares de fumo infectado por TMV e VMP, apareceram cristais deste último vírus que não apareceram em infecções simples (Honda & Matsui, 1971).

O VMCP e o VMSC respectivamente em combinação com o vírus do mosaico amarelo do feijoeiro (VMAF), produziram em feijoeiro uma estreita associação de partículas formando agregados nos quais as partículas dos vírus isométricos alinhavam-se seguindo o eixo longitudinal das partículas alongadas. Todavia, a combinação VMSC x VMAF, induziu a aparição de inclusões intranucleares esféricas e fibrilares (Carr & Kim, 1983).

No caso dos vírus em feijoeiro objeto deste estudo, a citopatologia dos tecidos infectados têm sido estudada em relação à infecções simples em locais diferentes o que dificulta as comparações. Pouco é o que se sabe acerca de infecções mistas incluindo estes vírus.

Dada a grande importância que o estudo da ultraestrutura da infecção tem como auxílio na diagnose e classificação dos vírus, considerou-se de interesse realizar-se um estudo comparativo desses quatro vírus em infecções simples em feijoeiro. Com a finalidade de complementar o trabalho de Costa (1983) e estabelecer possíveis correlações entre os sintomas externos por ele estudados e as modificações citológicas se fez também o estudo de infecções duplas pelos mesmos vírus. Para se ter um panorama mais completo, na comparação e fetuada foi incluído o vírus do mosaico amarelo do feijoeiro' (VMAF) em infecção simples, outro potyvírus que ataca feijoeiro nos Estados de São Paulo e Paraná. Este vírus têm o mes-

mo tipo de vectores que o VMCF, mas não é transmitido pela semente, apresentando também algumas diferenças a nível de sintomas externos e internos. Os resultados obtidos são descritos no presente trabalho.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Fonte de vírus

2.1.1. Vírus do mosaico comum do feijoeiro (VMCF)

O isolado utilizado nestes estudos foi obtido de plantas provenientes de sementes contaminadas da cultivar 'Gordo', coletadas no Estado de Pernambuco. A identificação foi feita usando-se hospedeiras diferenciais, transmissão por vetor (*Myzus persicae* Schulz) e microscopia eletrônica, sendo catalogado como pertencendo ao Grupo II de estirpes, segundo Drijfhout (Costa, 1983).

2.1.2. Vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro (VMDeF)

Foi obtido dos materiais que serviram para a realização do trabalho de caracterização do vírus por César A. Sperandio (1982).

2.1.3. Vírus do mosaico do sul do feijoeiro (VMSF)

Isolado de plantas de feijão cultivadas na Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília - (EEB - UnB) e identificado por meio de hospedeiras diferenciais, sorologia e microscopia eletrônica (Costa, 1983).

2.1.4. Vírus do mosaico severo do caupi-isolado de feijoeiro (VMSC-F)

Obtido de feijoeiros cultivados no CPAC - Embrapa, Planaltina, DF, e identificado sorologicamente como pertencente ao sorotipo IV (Costa, 1983).

2.1.5. Vírus do mosaico amarelo do feijoeiro (VMAF)

O isolado utilizado foi obtido por Anesio Bian

chini de feijoeiros cultivados no norte do Estado do Paraná e tentativamente identificado como VMAF.

2.2. Manutenção dos vírus

Os isolados dos VMCF, VMDeF, VMSF e VMSC-F foram mantidos em plantas de feijão das cultivares Jalo, Manteiga e Rico 23 indistintamente, em casa de vegetação, na EEB-UnB. O isolado do VMAF foi mantido em plantas da cultivar Carioca, no Instituto Agrônomo de Paraná, e gentilmente cedido por A. Bianchini.

2.3. Plantas hospedeiras para estudos citopatológicos

A maior parte das observações foram feitas sobre plantas da cultivar Rosinha G2. Esta cultivar foi escolhida por ser de ampla difusão no Brasil e por apresentar suscetibilidade aos VMCF, VMDeF, VMSF e VMSC-F. A citopatologia do VMAF foi estudada em plantas da cultivar Carioca.

2.4. Inoculação de plantas com vírus

As plantas foram inoculadas mecanicamente, obtendo-se o inóculo por maceração dos tecidos infectados em almofariz, com tampão fosfato 0,02M pH 7,2 e sulfito de sódio 0,01%. Como abrasivo usou-se carborundum de 400 mesh. Em todos os testes, as plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação sem controle de temperatura nem umidade. Basicamente foram elaborados dois tipos de testes nas inoculações com mais de um vírus.

2.4.1. Inoculações simultâneas:

O inóculo para as inoculações simultâneas foi preparado macerando dois pedaços de aproximadamente igual ta-

manho de folhas de plantas individualmente infectadas com vírus diferentes. Com o suco obtido inocularam-se as folhas primárias de plântulas com oito dias de idade. As primeiras amostras foram coletadas duas semanas após a inoculação, e como controle utilizaram-se plântulas inoculadas com um único vírus e plântulas não inoculadas. Assim, as combinações obtidas foram:

- | | |
|-------------------|--------------------|
| 1) VMCF + VMDeF | 7) VMCF |
| 2) VMCF + VMDF | 8) VMDeF |
| 3) VMCF + VMSC-F | 9) VMSF |
| 4) VMDeF + VMSF | 10) VMSC-F |
| 5) VMDeF + VMSC-F | 11) Não inoculadas |
| 6) VMSF + VMSC-F | |

2.4.2. Inoculações não simultâneas

Neste caso, as plântulas foram inoculadas com um primeiro vírus quatro dias após o surgimento e oito dias depois fez-se uma segunda inoculação, com outro vírus, na primeira folha trifoliada. As amostras para observação começaram a ser coletadas duas semanas após a segunda inoculação. Os controis foram plântulas com a primeira inoculação só, e plântulas não inoculadas. As combinações assim obtidas foram:

- | | |
|-------------------|--------------------|
| 1) VMCF + VMDeF | 10) VMSC-F + VMDeF |
| 2) VMDeF + VMCF | 11) VMSF + VMSC-F |
| 3) VMCF + VMSF | 12) VMSC-F + VMSF |
| 4) VMSF + VMCF | 13) VMCF |
| 5) VMCF + VMSC-F | 14) VMDeF |
| 6) VMSC-F + VMCF | 15) VMSF |
| 7) VMDeF + VMSF | 16) VMSC-F |
| 8) VMSF + VMDeF | 17) Não inoculadas |
| 9) VMDeF + VMSC-F | |

2.4.3. Frequência de amostragem

Em todos os casos as amostras foram coletadas semanalmente. No caso do VMAF analisaram-se amostras de plan-

tas da cultivar Carioca uma semana após a inoculação.

2.5. Testes Sorológicos

Para comprovar a infecção mista dos materiais a serem estudados por meio do microscópio eletrônico, amostras de plantas enfermas foram testadas sorologicamente, utilizando-se o método de difusão dupla em gel de agar, com antissoros para VMDeF, VMSF e VMSC-F. No caso dos potyvirus a sua presença era confirmada em preparações de tipo "leaf dip".

2.6. Microscopia Eletrônica

2.6.1. Observação de partículas (morfologia)

Nos casos em que foi necessário comprovar a presença e forma de partículas nos tecidos de plantas inoculadas, fizeram-se preparações tipo "leaf dip". Fragmentos de folhas eram colocados em uma gota de silicotungstato de sodio a 1% por alguns minutos. A seguir, uma telinha com película de formvar coberta com carbono era posta a flutuar por cerca de um minuto, após o qual era removida eliminando-se o excesso de líquido com papel de filtro e examinada ao microscópio eletrônico depois de seca ao ar.

2.6.2. Secções ultrafinas

Para preparar o material para o estudo de secções ultrafinas cortaram-se pequenos pedaços de 4mm aproximadamente da primeira ou segunda folha trifoliada no caso de plantas com duas ou três semanas de inoculadas. Quando se tratava de plantas com mais tempo de inoculação, as amostras foram tomadas da quinta ou sexta folha trifoliada.

A fixação se fez em glutaraldeido 3% diluído em tampão fosfato 0,05 M pH 7,2 durante duas horas. Logo após umalavada no mesmo tampão por 3 vezes, durante 15 minutos, realizou-se uma pós-fixação em tetróxido de osmio 1% durante uma hora, sendo lavadas posteriormente no tampão fosfato. A desi-

dratação foi feita em uma série de acetona 50, 70, 90 e 100% (esta por três vezes) durante 15 minutos cada. A inclusão se fez em Epon, em uma série de Acetona/Epon 3:1, 1:1 e 1:3 durante duas horas cada, e logo após, em Epon puro por 12 horas. A emblocagem se fez com resina recém preparada e a polimerização em estufa a 70° C durante 72 horas.

Outro esquema alternativo adotado na parte final dos trabalhos foi a fixação com glutaraldeído/paraformaldeído 2% cada, em solução tampão de cacodilato de sódio 0,05M Ph 7,2 (Karnovsky modificado), durante duas horas. A seguir, uma lavagem por três vezes durante quinze minutos no mesmo tampão e logo após, pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato 0,05M durante uma hora. Depois de uma rápida lavagem com água bidestilada, as amostras eram pré-contrastadas em uma solução aquosa de acetato de uranila 0,5% durante 12 horas aproximadamente. A desidratação foi feita em uma série de acetona de 30, 50, 75 e 90% durante quinze minutos e em acetona 100%, três vezes durante o mesmo tempo. Para incluir utilizou-se o meio de Spurr, passando-se pela resina diluída em acetona 1:1 durante uma hora, e logo transferidos os materiais para o meio de Spurr puro, substituído por outro 12 horas após. A polimerização realizou-se em moldes de silicone em estufa a 70° C durante 24 horas.

As secções ultrafinas foram obtidas em ultrami_{cr}ótomo LKB Ultratome III, com navalha de diamante Dupont e montadas em telinhas de cobre. O contraste das secções de material não pré-contrastado com acetato de uranila, fez-se flutuando as telinhas em gotas de acetato de uranila a 4% em água, por 30 minutos e, logo após, em citrato de chumbo por 3 a 5 minutos. As secções de material pré-contrastado foram flutuadas em gotas de acetato de uranila 2% em solução aquosa, durante 5 a 10 minutos e posteriormente em citrato de chumbo durante o mesmo tempo.

2.7. Imuno Microscopia eletrônica com anticorpo marcado com ouro coloidal

Tentativas de se identificarem presumíveis par

tículas virais *in situ* foram feitas utilizando-se a técnica do anticorpo conjugado ao ouro coloidal (Craig & Millerd, 1981). Esta técnica leva a vantagem sobre as anteriores em que se utilizavam anticorpos marcados com ferritina ou peroxidase, quando então a marcação era feita "en bloc", pois a detecção do antígeno é feita na secção, contornando-se o problema da penetração do complexo anticorpo-marcador na célula. Utilizou-se neste caso o método da marcação indireta, na qual o marcador, ouro coloidal, achava-se conjugado a anticorpo anti-imunoglobulina de coelho. Este complexo foi gentilmente fornecido pelo Dr. W. Langenberg da Universidade de Nebraska, tendo sido obtido pelo método do ácido cítrico. Tetracloreto de ouro (HAuCl_4) era dissolvido em água triplamente destilada, diluída em tampão citrato a quente, e conjugado com imunoglobulina produzida em cabra (anti-imunoglobulina de coelho), posteriormente concentrado por ultracentrifugação. Para proceder-se à marcação, secções de tecidos fixados normalmente em glutaraldeído/paraformaldeído, pós-fixados em tetróxido de ósmio e em blocados em meio de Spurr, sofriam os seguintes tratamentos: a) postasa flutuar em uma solução de água oxigenada 10% por 10 minutos; b) lavadas com água destilada duas vezes e a seguir tratadas com soro normal de cabra a 3.3%, o mesmo tempo; c) seguia-se um tratamento com antissoro específico contra o vírus em estudo, diluído a 1/100 por 10 minutos; d) logo a secção era lavada com soro normal de cabra a 1% repetidas vezes e postas a flutuar na solução de anticorpo anti-imunoglobulina de coelho, produzido em cabra, conjugado ao ouro coloidal, durante 10 minutos; e) as secções eram lavadas repetidamente com soro normal de cabra e finalmente com água. Posteriormente eram contrastadas como de rotina e examinadas ao microscópio eletrônico (Langenberg, comunicação pessoal). As tentativas de se localizarem antígenos *in situ* foram feitas com VMSE e VMSC-F.

2.8. Microscopia de luz

Para observações ao microscópio ótico foram utilizados cortes semi-finos dos tecidos emblocados em resina,

com espessura variando entre um e três μ m. Estas secções foram obtidas com um ultramicrótomo Porter Blum MT-1 equipado com navalha de vidro e transferidas do barquinho para uma lâmina com uma gota de água. Uma vez evaporada a água, os cortes foram corados com uma mistura proporcional de Azur II e azul de metileno. No processo de coloração as lâminas foram mantidas a 70°C aproximadamente, sobre uma superfície quente durante dois a três minutos, sendo posteriormente retirado o excesso de corante, lavando abundantemente com jato de água. A observação se realizou em um microscópio Wild-Heerbrugg.

3. RESULTADOS

3.1. Inoculações e Sintomas

Aproximadamente uma semana após a inoculação, a maioria das plantas estava já manifestando os primeiros sintomas de infecção sistêmica; mosaico com variações leves de intensidade segundo os vírus ou as combinações usadas.

3.2. Identificação dos vírus nas plantas inoculadas

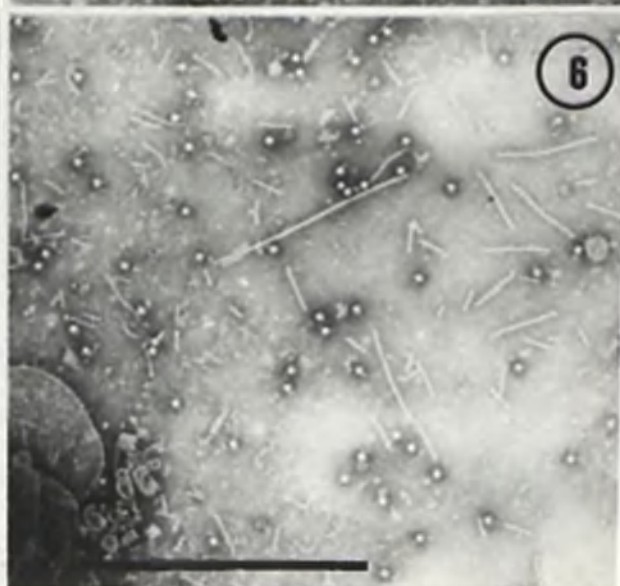
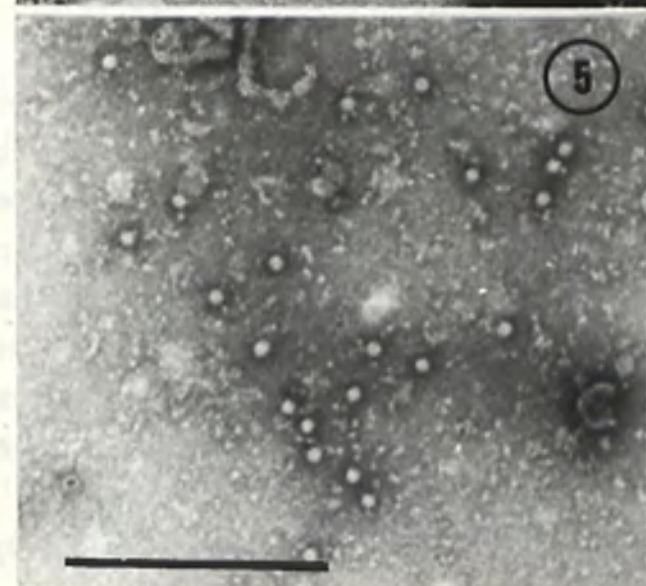
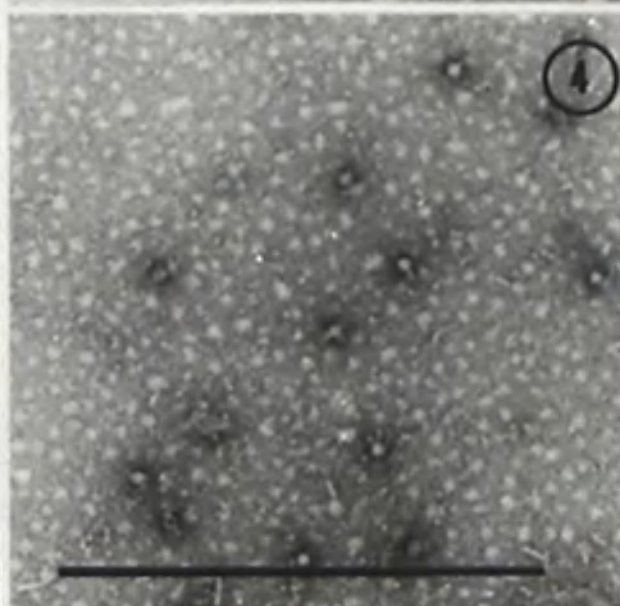
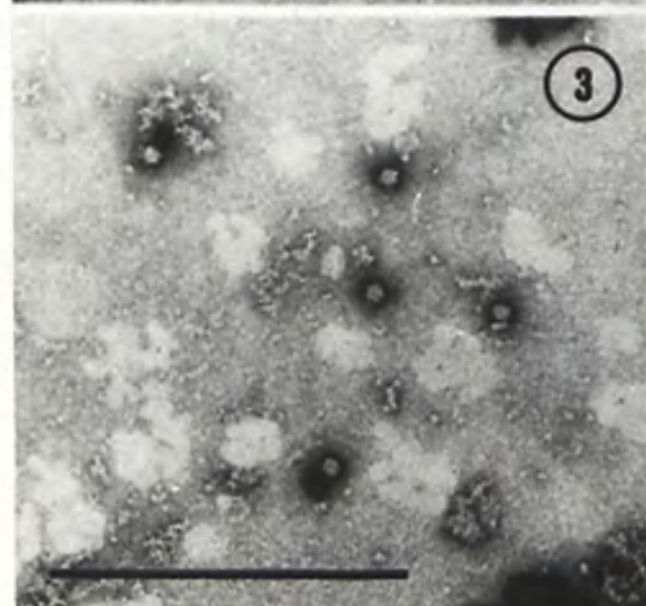
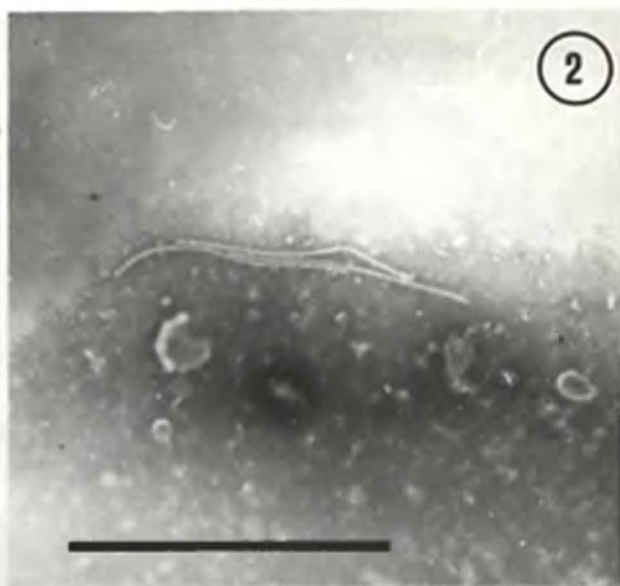
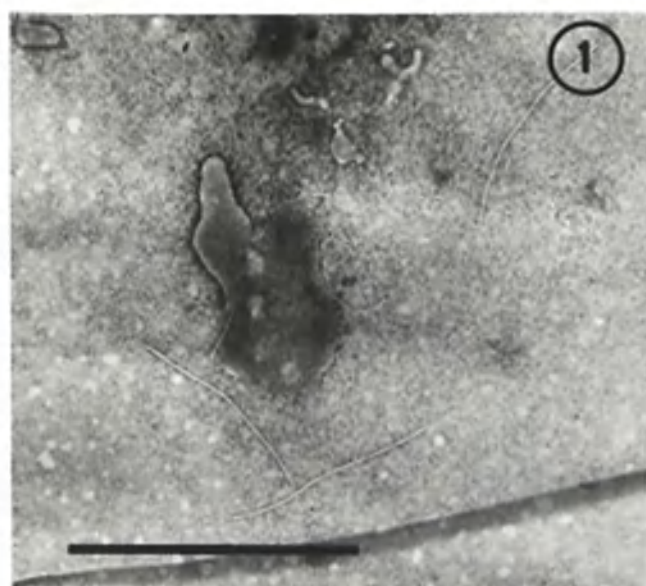
3.2.1. Testes serológicos

A identidade de cada vírus, ou dos vírus componentes das infecções mistas presentes nas amostras tomadas para os estudos citológicos, foi confirmada pelas reações serológicas, usando-se os antígenos homólogos em testes de difusão dupla em gel de agar.

3.2.2. Morfologia das partículas

Nas preparações tipo "leaf dip" feitas a partir das folhas de plantas inoculadas com VMCF e VMAF observa-se partículas alongadas e flexíveis com comprimento médio de aproximadamente 750 nm (Figs. 1, 2 e 6). Em todas as preparações feitas em tecidos inoculados com o VMDeF, VMSF e VMSCF detectaram-se partículas isométricas com diâmetro de 25-30 nm (Figs. 3, 4, 5 e 6). Nas numerosas preparações que

Figs. 1-6. Partículas dos vírus incluídos neste estudo, observadas em preparações "leaf dip". Fig. 1-VMCF; Fig.2-VMAF; Fig. 3-VMDeF; Fig.4-VMSF; Fig.5-VMSC-F e um caso de infecção mista: Fig. 6-VMCF+VMSC-F. A barra representa 1 μ m, exceto nas figuras 3 e 4, onde representa 0,5 μ m.



se fizeram de amostras de plantas com inoculações duplas foi uma constante observar maior quantidade de partículas isométricas, mesmo naquelas combinações incluindo o VMCF (Fig.6).

3.3. Exames Histológicos

3.3.1. Testemunha

As células da epiderme, mesófilo e parênquima vascular, quando observadas ao microscópio eletrônico apresentavam-se bem túrgidas com vacúolo proeminente, e as estruturas usuais (núcleo, cloroplastos, mitocôndias, complexo de Golgi, peroxissoma e retículo endoplasmático), distribuídas na fina camada protoplasmática entre o tonoplasto e a parede celular (Figs. 7 e 8). Ocasionalmente ocorriam grânulos osmíofílicos no citoplasma. Não foram observadas estruturas peculiares como inclusões, alterações na parede celular, arranjos especiais de organelas, etc, nas células destas plantas não inoculadas. Os vasos, tanto os crivados como os lenhosos, também não exibiam nenhuma particularidade (Fig. 9). Ocasionalmente nos vasos crivados ocorriam formações cristalinas densas provavelmente de natureza proteica.

3.3.2. Inoculações simples.

3.3.2.1. Vírus do mosaico comum do feijoeiro (VMCF)

Duas semanas após a inoculação, a análise dos cortes semifinos observados ao microscópio de luz revelou a presença de inclusões fortemente coradas de azul no citoplasma de células da epiderme e do parênquima do mesófilo e vascular. Seu tamanho era variável, às vezes consideravelmente maiores que o núcleo, sendo formadas de um agregado de estruturas densas, de contorno circular a elíptico e algumas poliédricas (Fig. 10, inserção). Não foram encontradas outras modificações notáveis em comparação com tecidos sadios.

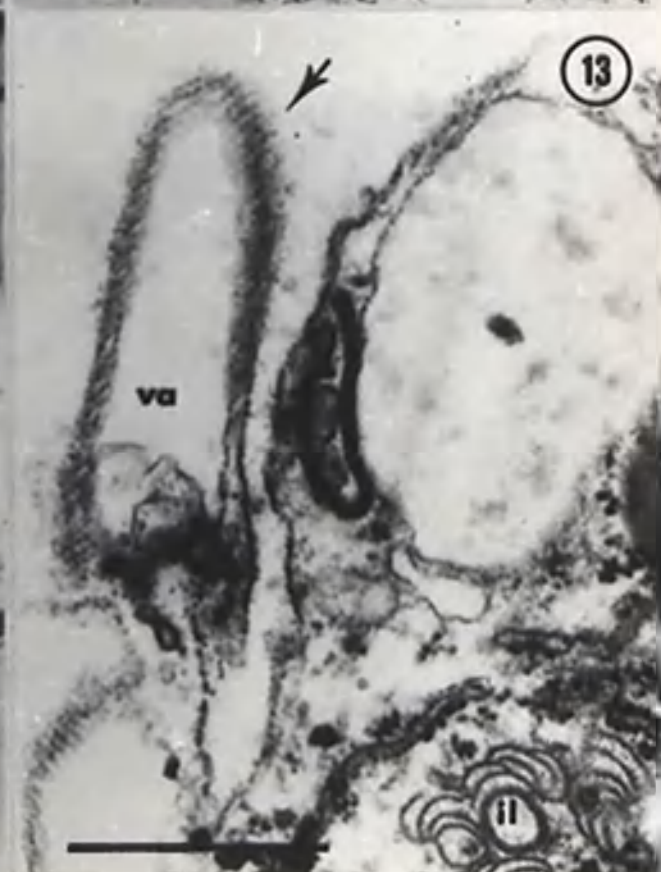
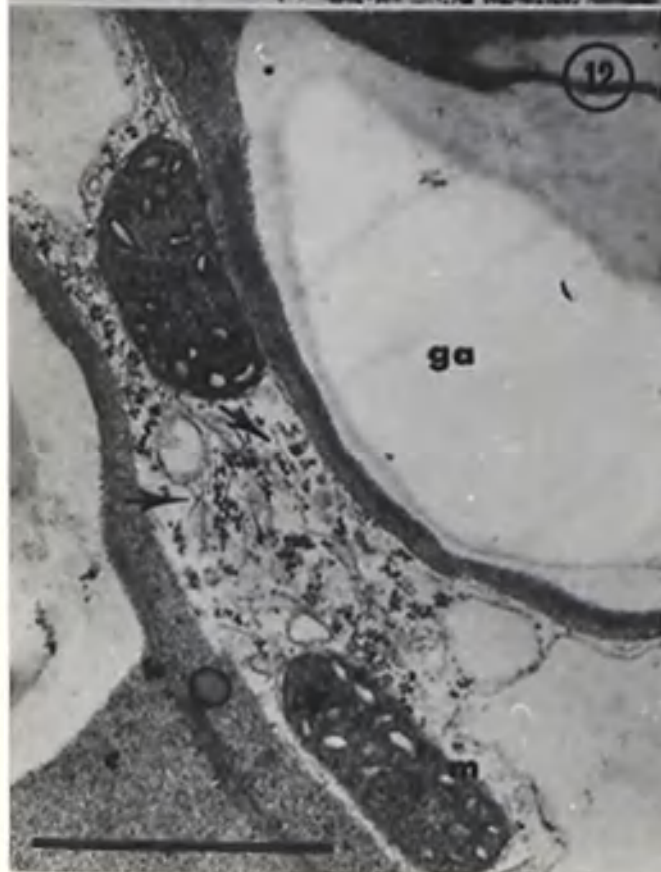
A observação ao microscópio eletrônico de seções ultrafinas permitiu constatar que as inclusões observadas

Figs. 7-95. Micrografias eletrônicas ou fotônicas de secções ultrafinas e semifinas, respectivamente, de tecidos de feijoeiro "Rosinha G-2 infectado com diferentes vírus, individualmente ou em arranjos 2 a 2. As barras das micrografias eletrônicas, exceto quando indicado outro valor, equivalem a 1 um. As das inserções representam 500 nm, exceto quando indicado outro valor. As barras de todas as micrografias de luz equivalem a 5 um.

Figs. 7-9. Aspectos dos tecidos foliares saudios da cv. Rosinha G-2 de feijoeiro. Fig. 7 -Célula do parênquima paliçádico na qual o núcleo (n) e cloroplastos (c) com pequenos grãos de amido (ga), aparecem dispostos entre o vacúolo (va) e a parede celular. Fig. 8- Detalhe do cloroplasto (c) contendo presumíveis glóbulos lipídicos (gl), aparecendo também no citoplasma uma mitocôndria (m) e um peroxissoma (px). Fig. 9-Secção transversal de um pequeno feixe vascular, VC-vasos crivados, n -núcleo.



Figs.10-13- Aspectos citopáticos da infecção pelo VMCF. Fig. 10- Célula parenquimática exibindo inclusões lamelares (il) seccionadas transversalmente e longitudinalmente (seta), situadas entre as organelas e o vacúolo, duas semanas após a infecção. Na inserção observa-se o aspecto destas inclusões (*), geralmente situadas ao lado do núcleo (n), em uma secção semifina de célula epidérmica. Fig.11 -Célula epidérmica, duas semanas após a infecção, mostrando extensas proliferações do retículo endoplasmático (setas), junto a inclusões lamelares (il), mitocôndrias (m), vesículas e poliribossomos. Fig. 12-Presumíveis partículas virais (setas) no citoplasma de uma célula parenquimática, duas semanas após a infecção, localizadas entre mitocôndrias (m) e cloroplastos (c) providos de proeminentes grãos de amido (ga). Fig. 13-Projeção unisseriada de partículas (seta) dentro do vacúolo (va) e próxima de inclusões lamelares (il), em uma célula parenquimática na 6a semana da infecção. A barra equivale a 500 nm.



ao microscópio de luz eram constituídas por agrupamentos de inclusões lamelares em configuração de cataventos e túbulos, geralmente localizadas nas proximidades da parede celular (Fig.10). Eventualmente podia-se notar a ligação de um dos extremos das inclusões lamelares com a membrana do retículo endoplasmático. Estas comumente proliferavam-se e ramificavam-se nas áreas das inclusões. Nas suas proximidades usualmente notavam-se grandes quantidades de polirribossomos e vesículas de forma e tamanho variáveis (Fig.11).

Partículas alongadas, presumivelmente do VMCF, também foram observadas no citoplasma dessas áreas diferenciadas, ao lado das inclusões lamelares, em tecidos com duas e três semanas de inoculação (Fig. 12). Em tecidos com mais tempo de inoculação esporadicamente encontravam-se grupos de partículas isoladas; eventualmente elas também apareciam dispostas paralelamente, entre dois tonoplastos, em delgadas projeções citoplasmáticas no vacúolo (Fig. 13).

Nos núcleos não foram observadas modificações em comparação com tecidos sadios. Os cloroplastos apresentavam grânulos proeminentes de amido e o sistema lamelar bastante reduzido, embora sua morfologia geral não estivesse sensivelmente afetada (Fig. 12). As mitocôndrias apresentavam-se normais, embora algumas delas exibissem cristas mais desenvolvidas que as demais (Fig. 11).

3.3.2.2. Vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro (VMDeF)

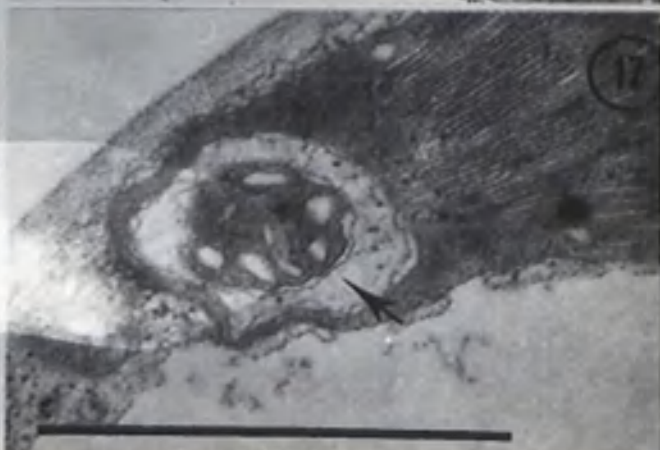
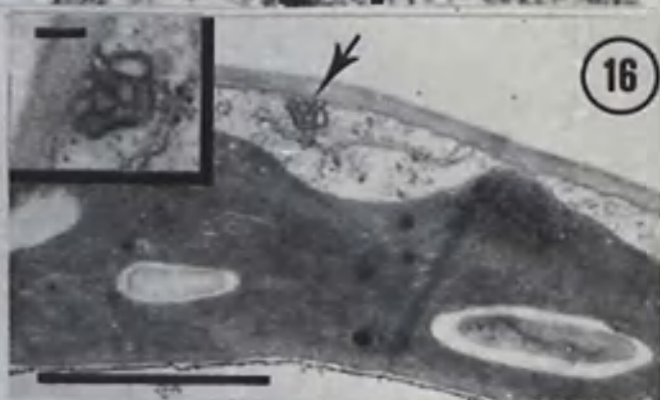
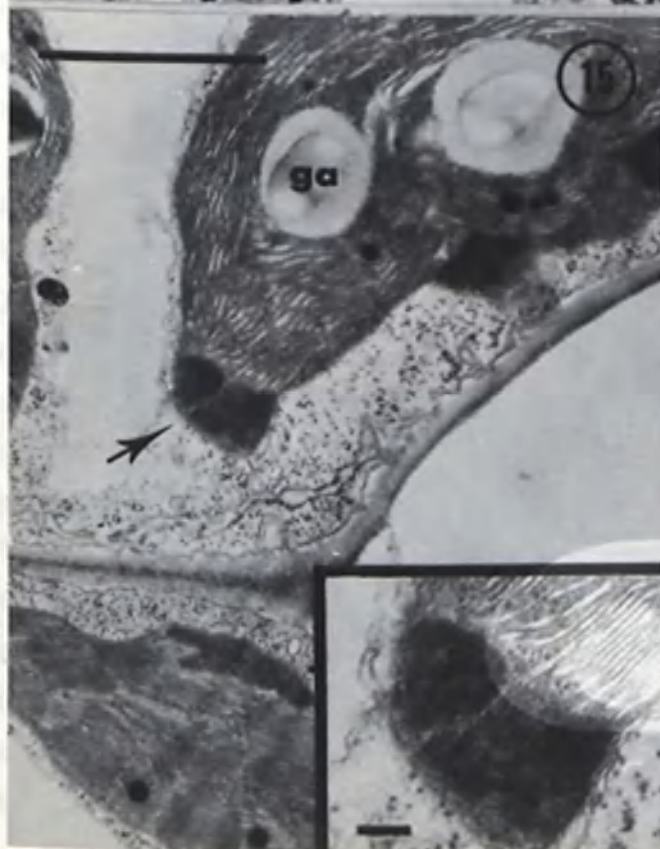
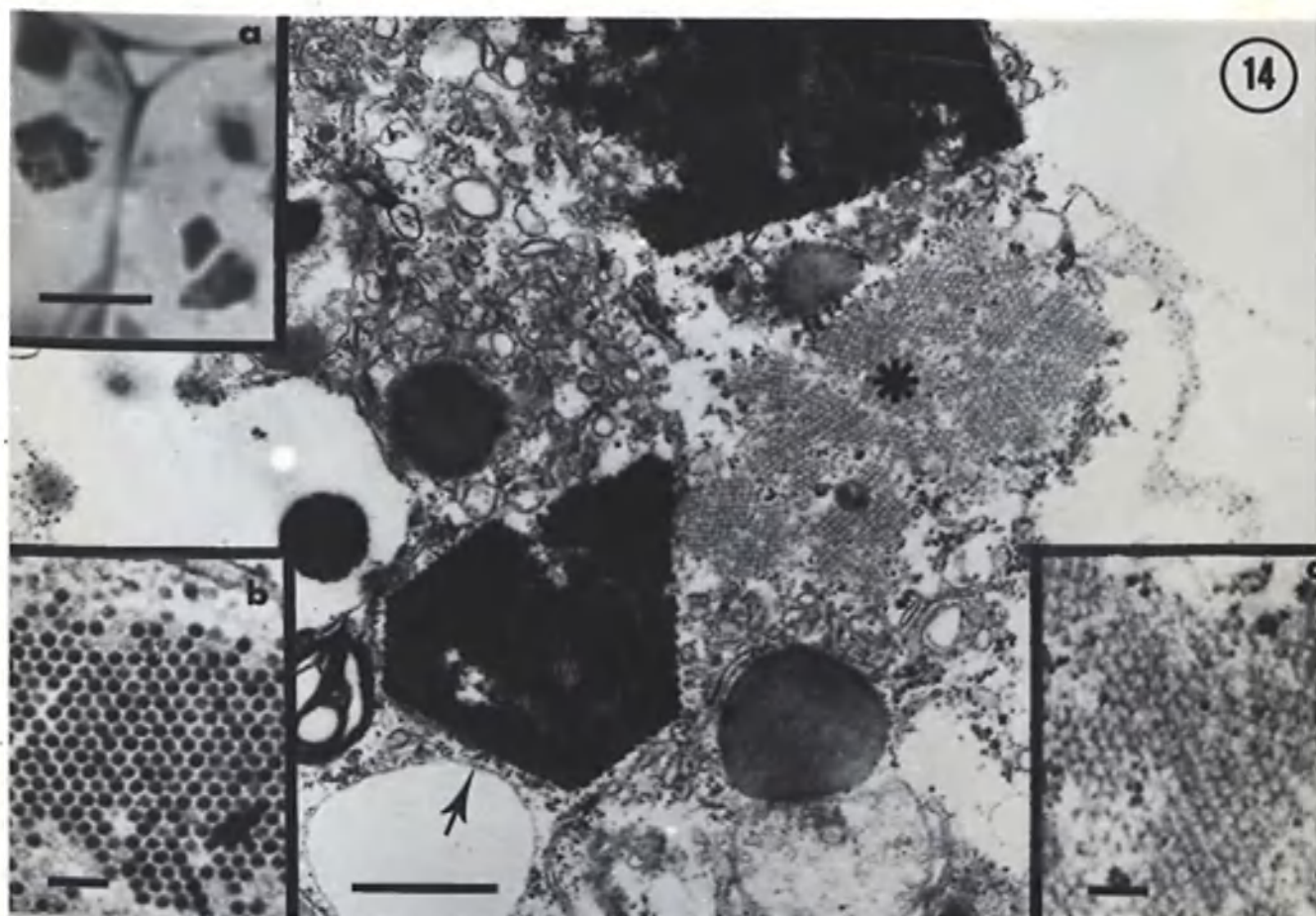
O aspecto geral dos tecidos de folhas de plantas infectadas sistemicamente com este vírus não diferia daquele de plantas sadias, mantendo as células a sua conformação normal quando observadas ao microscópio de luz. Sem embargo, no citoplasma das células epidérmicas, dos estômatos e do parênquima, inclusive o vascular, observaram-se cristais angulares intensamente corados de azul, às vezes apresentando rachaduras. O seu tamanho variava entre 1 e 4 μ m, e em geral apresentavam forma aproximadamente quadrangular ou hexagonal. Comumente rodeando os cristais apareciam massas citoplasmáticas de cor azul

mais claro (Fig. 14a).

O estudo ao microscópio eletrônico dos tecidos infectados revelou que os cristais eram constituídos por partículas isométricas presumivelmente virais, dispostas em arranjos hexagonais (Fig. 14b) ou reticulares, segundo o plano de secção. O diâmetro das partículas era de 22-25 nm e o espaço entre elas dentro dos cristais, de aproximadamente 3-5 nm (Fig. 14c). Ocasionalmente observavam-se partículas em pequenos agrupamentos nas inclusões, mas não era possível distinguir partículas isoladas. Geralmente nas mesmas células em que se apresentavam os cristais de vírus, havia outro tipo de inclusão cristalina de menor tamanho e também menos densa ao elétrons, de contorno irregular, geralmente arredondada e cujo esqueleto formava arranjos hexagonais ou reticulares (Figs. 14 e 14c). Ambos tipos de cristais apareciam geralmente rodeados por uma massa citoplasmática constituída fundamentalmente por vesículas arredondadas ou alongadas, cujo diâmetro variava entre 100 e 800 nm, e que devem corresponder à área de citoplasma diferenciado, circunvizinha aos cristais, notada na microscopia de luz. Em plantas inoculadas há 6-8 semanas ambos tipos de estrutura cristalina eram raramente encontradas, só permanecendo as vesículas formando as inclusões.

Nos núcleos das células infectadas não foram encontradas modificações atribuíveis ao VMDeF, mas nos cloroplastos observaram-se alterações na forma e estrutura. Alguns deles exibiam zonas fortemente densas aos elétrons geralmente localizadas nos extremos, revelando possuir estrutura laminada em alguns casos (Fig. 15), enquanto outros mostravam invaginações que continham apenas citoplasma ou eventualmente mitocôndrias (Fig. 17). A maioria deles apresentava grãos de amido de dimensões reduzidas e pequenos glóbulos osmiofílicos, e as lamelas das granas eram mais frouxas e desorganizadas que as normais. As mitocôndrias apareciam com forma e estrutura praticamente inalteradas apesar de várias delas apresentarem cristas algo mais largas. Na parede celular das células do parênquima do mesófilo observaram-se pequenas protuberâncias vesiculadas de aproximada

Figs. 14-17. Aspectos da infecção por VMDeF. Fig. 14-Área citoplasmática na qual aparecem cristais densos (setas), visíveis inclusive' ao microscópio de luz (inserção 'a'), constituídos por partículas dispostas em vários arranjos, p.ex. hexagonais (inserção 'b'). Outros cristais menos densos (*) aparecem exibindo uma estrutura distinta da anterior (inserção 'c'). Note a área vesiculada rodeando ambas formações cristalinas. Fig. 15- Inclusão eletrodensa na extremidade de um cloroplasto (seta). Em alguns casos estas inclusões revelam possuir estrutura laminar (inserção). Fig. 16-Pequena protuberância vesiculada na parede celular, em infecção tardia. A inserção mostra um detalhe. As barras das inserções 14b, 14c, 15 e 16 equivalem a 100 nm. Fig. 17-Invaginação de um cloroplasto (seta) contendo uma mitocôndria, em célula parenquimática oito semanas após a infecção.



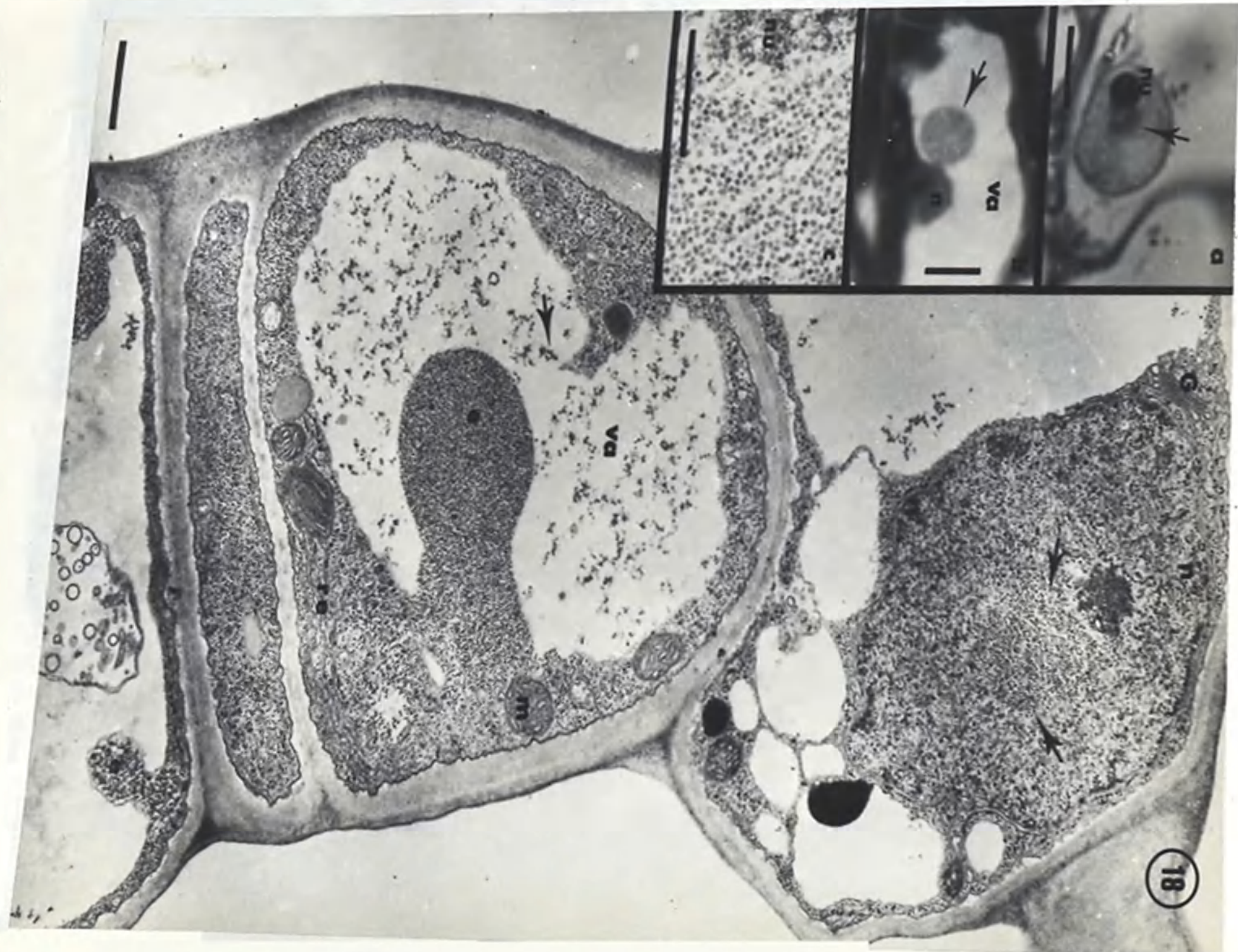
mente a mesma espessura daquela, provavelmente correspondentes aos chamados corpos paramurais (Fig. 16).

3.3.2.3. Vírus do mosaico do sul do feijoeiro (VMSF)

Nas amostras de plantas com duas e três semanas de inoculadas com o VMSF, não foram encontradas alterações notáveis no aspecto geral dos tecidos, em cortes semifinos analisados ao microscópio de luz. Apenas observou-se em alguns núcleos de células do mesófilo, geralmente ao lado do nucleolo, uma zona de contorno mais difuso e menos intensamente corada de azul que aquele. Aproximadamente do mesmo tamanho que o nucleolo, distinguia-se facilmente do resto do nucleoplasma, que aparecia quase incolor (Fig. 18a). No vacúolo de algumas células do parênquima do mesófilo observavam-se corpos arredondados de tamanho variável levemente corados de rosa (Fig. 18b). Tais modificações foram raramente encontradas em amostras coletadas várias semanas após a inoculação. Nestas observou-se uma alteração drástica no aspecto geral de certos tecidos, especialmente da epiderme, cujas células apareciam colapsadas em vários trechos das secções, delas restando apenas as paredes. Às vezes encontravam-se células do parênquima de paliçada ou do lacunoso, nessa mesma situação, acompanhando às células epidérmicas.

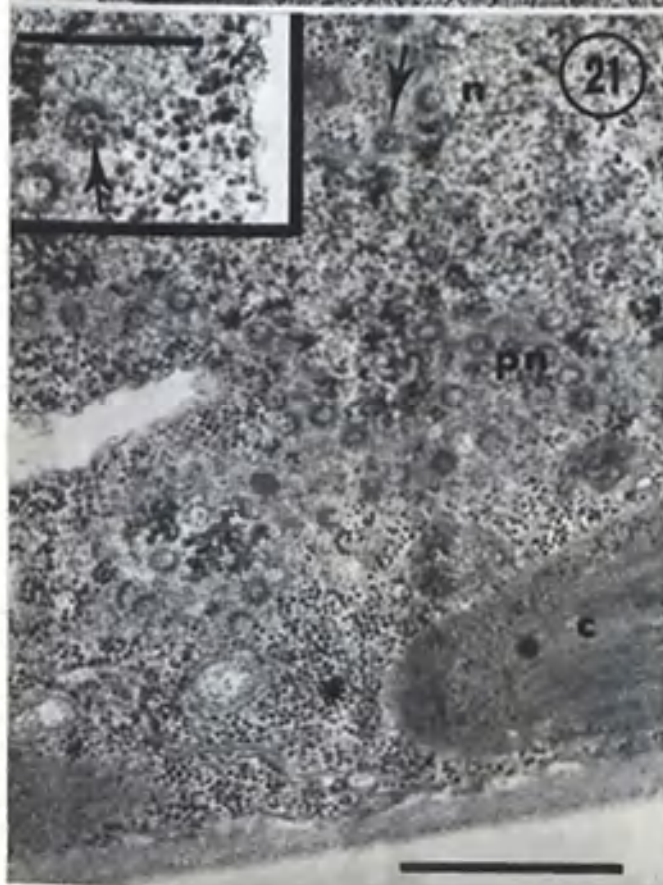
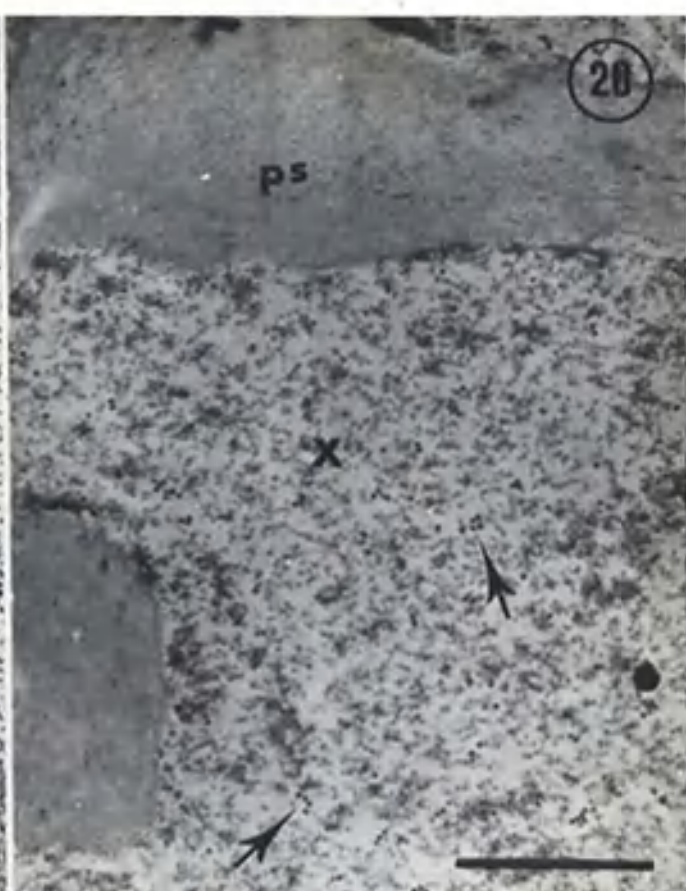
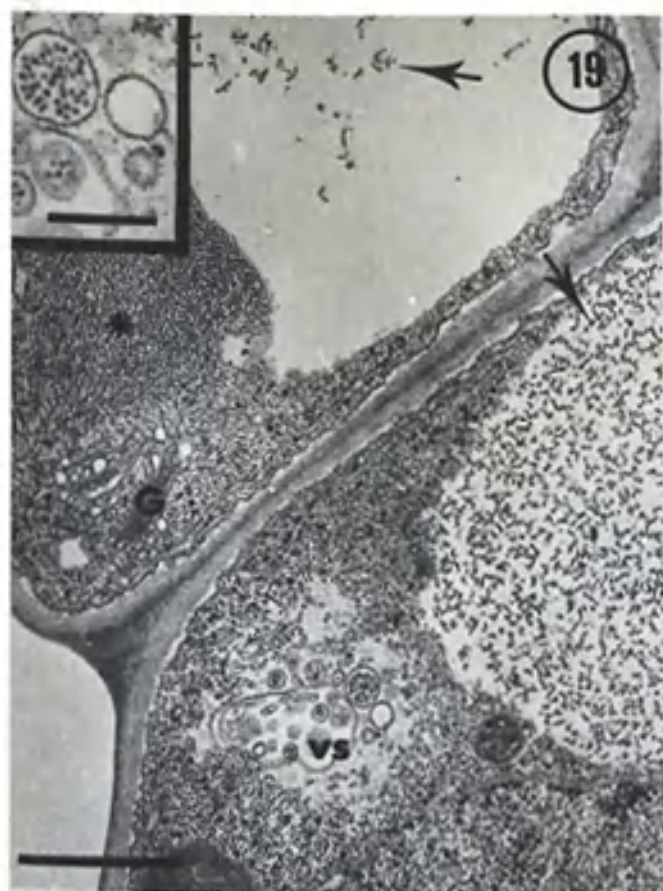
Quando secções ultrafinas de tecidos infectados sistemicamente com o VMSF foram observadas ao microscópio eletrônico encontraram-se modificações características induzidas pela infecção, apresentando algumas variações segundo o momento da colheita das amostras. Após duas e três semanas da inoculação, as mais notáveis dessas alterações eram massas de presumíveis partículas de vírus no citoplasma de células epidérmicas e do parênquima do mesófilo, dispostas muito próximas umas de outras, mas sem exibir organização cristalina (Figs. 18 e 19). Per_{to} destas massas geralmente encontravam-se zonas ricas em vesículas de tamanho variável e de forma arredondada ou alongada, situadas comumente nas proximidades do aparelho de Golgi (Fig. 19), e às vezes contendo partículas de vírus (Fig. 19 inserção). Estas também foram observadas dispersas, ou em pequenos agregados

Fig. 18. Efeito citopático causado pelo VMSF, quinze dias após a infecção. As inserções 'a' e 'b' mostram modificações observadas ao microscópio de luz, em secções semifinas. (a) Estrutura nuclear difusa (seta) menos corada que o nucléolo (nu), geralmente observada ao lado deste. (b) Corpo arredondado granuloso (seta) no vacúolo de uma célula do parênquima paliçádico. A micrografia eletrônica mostra células da epiderme inferior em uma das quais aparece dentro do núcleo (n), uma massa de presumíveis partículas virais (setas), um detalhe das quais pode ser observado na inserção 'c'. No citoplasma observa-se o aparelho de Golgi (G). Em outra célula há evaginações do tonoplasto (e) contendo partículas. Estas também são observadas (setas) dentro do vacúolo (va), livres ou em pequenos agregados. O retículo endoplasmático (re) aparece com proliferações. As mitocôndrias (m) aparentam ser normais.



Figs. 19-21. Aspectos citopáticos adicionais da infecção por VMSF, quinze dias após a infecção. Fig. 19-Massa citoplasmática de prováveis partículas virais (*), também observadas dentro de vesículas (vs), um detalhe das quais aparece na inserção. Às vezes as vesículas aparecem relacionadas com o complexo de Golgi (G); também nos vacúolos observam-se numerosas partículas (setas). Fig. 20-Vaso leñoso (X) no qual se observam partículas isoladas ou em pequenos agregados (setas). Fig. 21-Corte tangencial de um núcleo (n) no qual aparecem numerosos poros nucleares (pn), em alguns dos quais notam-se presumíveis partículas virais (seta). Um detalhe de poro (seta) pode ser observado na inserção. No citoplasma adjacente nota-se uma massa de partículas (*) ao lado de um cloroplasto (c).

Fig. 22-Vaso crivado com partículas livres (*) e em agregados cristalinos (seta) observado em tecidos de feijoeiro seis semanas após a infecção.



nos vacúolos de células de diferentes tecidos (Figs. 18 e 19), e nos vasos crivados e elementos do xilema (Fig. 20). Todavia, nos vacúolos observaram-se evaginações do tonoplasto contendo massas de partículas (Fig. 18).

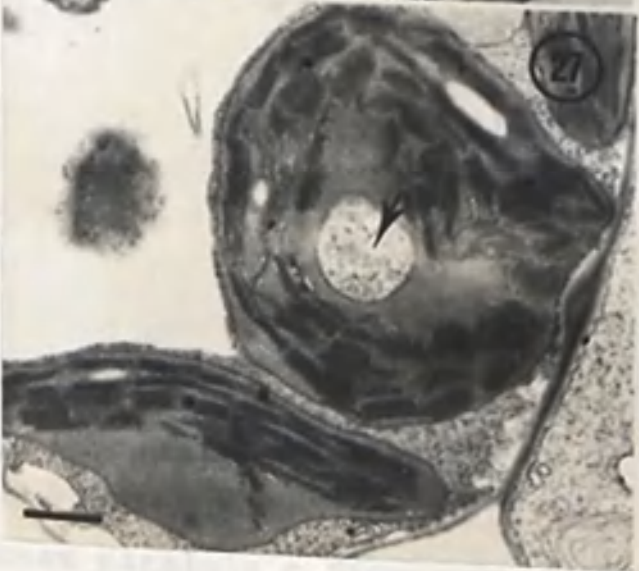
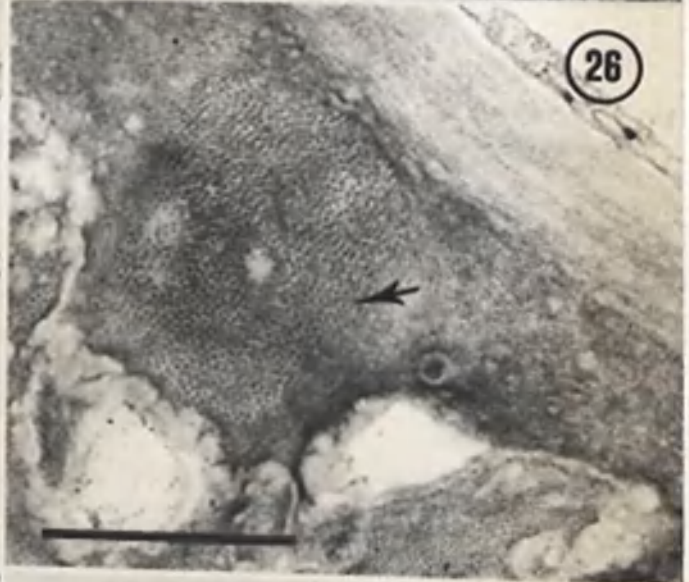
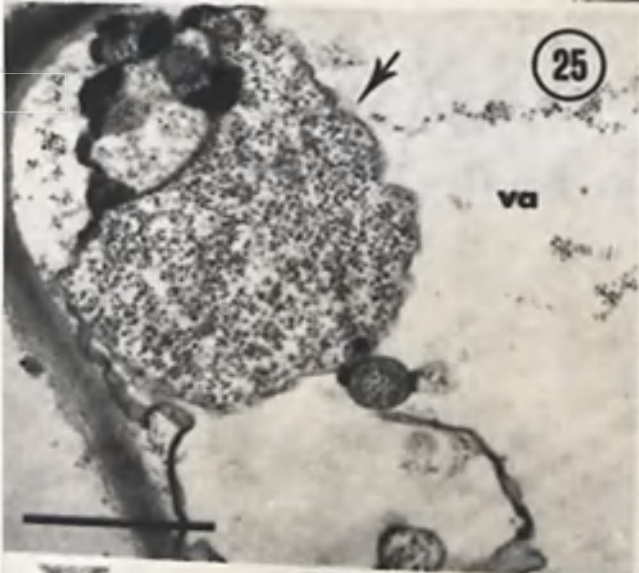
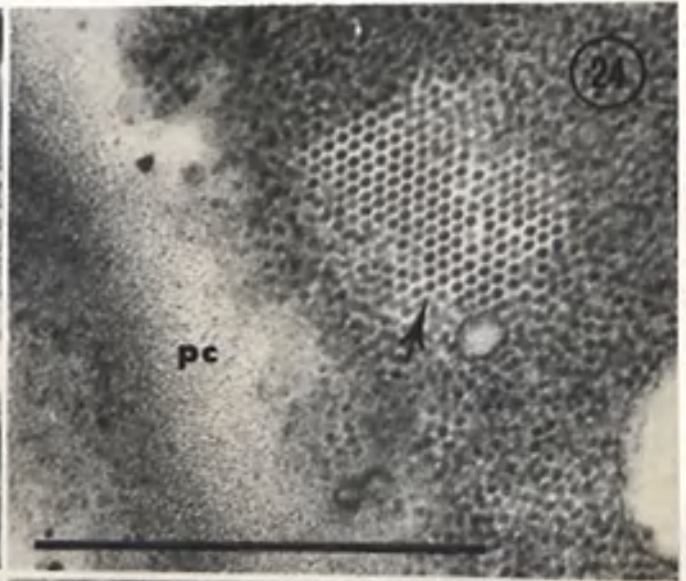
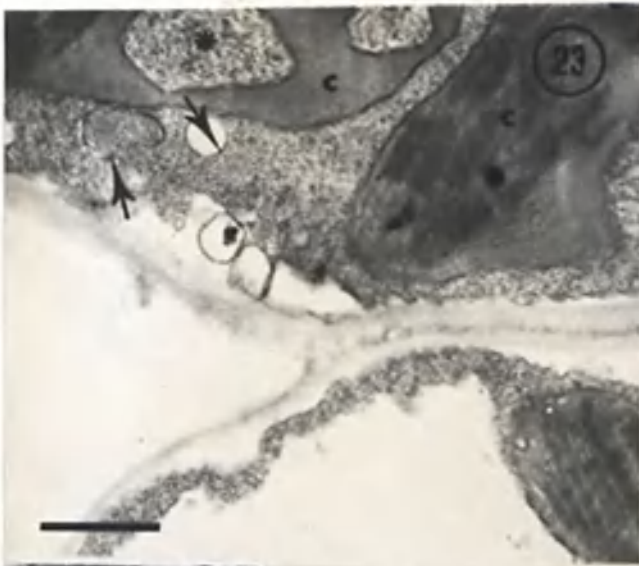
No nucleoplasma da maioria das células encontravam-se partículas isoladas ou em pequenos agregados, mas em alguns núcleos as partículas formavam massas compactas geralmente ao lado do nucleolo (Figs. 18 e 18c). Possivelmente esses agregados correspondem às zonas coradas de azul claro observadas ao lado do nucléolo nas secções semifinas. Cortes tangenciais da membrana nuclear revelaram a presença de zonas ricas em poros, em alguns dos quais apareciam partículas similares às do VMSF (Fig. 21), mas que bem poderiam ser apenas parte da estrutura do poro.

Os cloroplastos apresentavam alguns grãos de amido pequenos e a estrutura lamelar em desorganização. As mitocôndrias não apresentavam alterações significativas, enquanto o retículo endoplasmático mostrava uma notável proliferação em alguns casos (Fig. 18).

Nas secções de tecidos com mais de quatro semanas de inoculados não foram detectadas as massas de partículas anteriormente descritas no citoplasma; porém agregados em arranjos cristalinos ou semicristalinos foram observados nos vasos crivados (Fig. 22), no parênquima vascular e no parênquima do mesófilo, localizados perto da parede celular neste último caso (Fig. 23 e 24). Nos vacúolos observavam-se massas de partículas envolvidas por uma membrana (Fig. 25), provavelmente originada das evaginações do tonoplasto vistas em tecidos com duas e três semanas de infectados. Também freqüentemente eram encontrados agregados de vírus no vacúolo de células do parênquima do mesófilo e da epiderme (Fig. 25). Mesmo em células da epiderme ou do mesófilo inteiramente colapsadas, podia-se notar no seu interior estruturas amorfas eletrodensas e agregados de partículas ocasionalmente cristalinos (Fig. 26).

No nucleoplasma destes tecidos apareciam partículas de vírus isoladas ou em pequenos agregados, mas não em massas compactas como vistas em tecidos com menos tempo de inocula

Figs. 23-28. Efeitos citopáticos causados por VMSF, 6-8 semanas após a infecção. Fig. 23-Cloroplastos (c) com o sistema lamelar em desorganização e com profundas invaginações (*). Agregados semicristalinos de partículas (setas) aparecem perto da parede celular. Fig. 24-Detalhe de um agregado cristalino (seta), próximo à parede celular. Fig. 25-Agregados de partículas livres no vacúolo (va) e outras envolvidas por uma membrana (seta). Fig. 26-Massa de partículas (seta) presente numa célula epidérmica colapsada. Fig. 27-Cloroplasto arredondado com uma profunda invaginação (seta) contendo presumíveis partículas virais. Fig. 28-Estrutura cristalina (setas) observada em alguns cloroplastos.



ção.

Os cloroplastos apresentavam diferentes modificações sendo em alguns casos arredondados com uma invaginação central contendo citoplasma com partículas (Fig. 27), às vezes incluindo também mitocôndrias. Em alguns casos aparecia dentro do estroma do cloroplasto um material cristalino em forma de dedo (Fig. 28). Outras organelas não apresentavam variações com respeito às alterações observadas em tecidos com menos tempo de inoculação.

3.3.2.4. Vírus do mosaico severo do caupi-isolado do feijoeiro (VMSC-F)

Quando secções semifinas coradas com azul de metileno e azur II foram estudadas ao microscópio ótico, não se detectaram alterações profundas nos tecidos, mas observaram-se inclusões amorfas ocupando grande parte das células, muitas vezes, localizadas ao lado do núcleo (Fig. 30). Dentro da massa da inclusão, comumente distinguam-se áreas não coradas e também glóbulos intensamente corados (Fig.31). Todos os tecidos exibiam células com estas alterações, com exceção dos vasculares; um material granular e fortemente corado de azul aparecia nos vasos do xilema de numerosas nervuras secundárias (Fig.29).

A análise de secções ultrafinas no microscópio eletrónico revelou que as inclusões observadas ao microscópio de luz estavam constituídas por massas de vesículas de tamanho variável mais ou menos arredondadas, e outros elementos tais como possíveis partículas de vírus e/ou ribossomas, mitocôndrias, microsomomas e corpos osmiofílicos (Fig. 32).Em algumas inclusões apareciam numerosas estruturas globosas de baixa densidade aos elétrons consideradas como presumíveis grânulos delipídios, que doravante serão assim referidos (Fig. 35),

Além dos componentes já descritos foi comumente observada outra estrutura formando parte ou a quase totalidade das inclusões e que se consistia de fibrilas longas e sinuosas dispostas paralela e frouxamente, e de comprimento variável. Entre elas podiam-se notar partículas arredondadas presumivelmen-

Figs. 29-31. Micrografia de luz de aspectos citopáticos da infecção por VMSC-F. Fig.29- Feixe vascular no qual observa-se um vaso lenhoso (X) com um material denso no seu interior. Fig.30-Inclusão citoplasmática amorfa (seta) ao lado do núcleo (n), corada mais intensamente que este. Os cloroplastos (c) aparecem com numerosos grãos de amido. Fig. 31-Inclusão amorfa (seta) na qual observam-se vários corpos osmiofílicos.

Figs.32-34- Micrografias eletrônicas de aspectos citopáticos da infecção por VMSC-F, duas semanas após a infecção. Fig.32-Áreas ricas em vesículas (*), contendo numerosos glóbulos osmiofílicos (o), além de algumas organelas normais. No vacúolo observam-se partículas em pequenos agregados (seta). Fig. 33-Inclusão fibrilar (seta) no citoplasma de uma célula infectada. Fig. 34-Agregado de partículas envolvidas por uma membrana (seta), dentro do vacúolo.

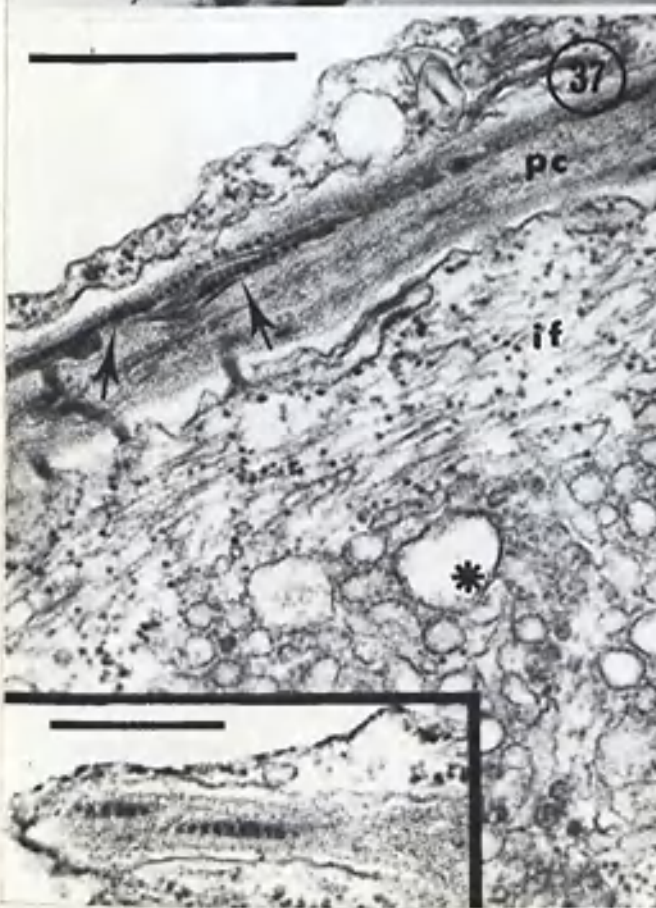
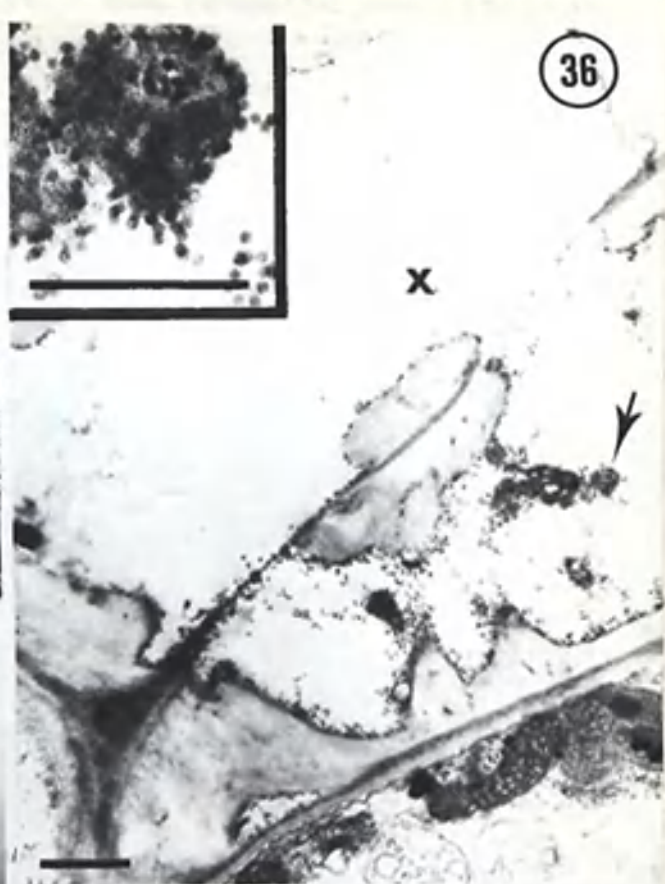
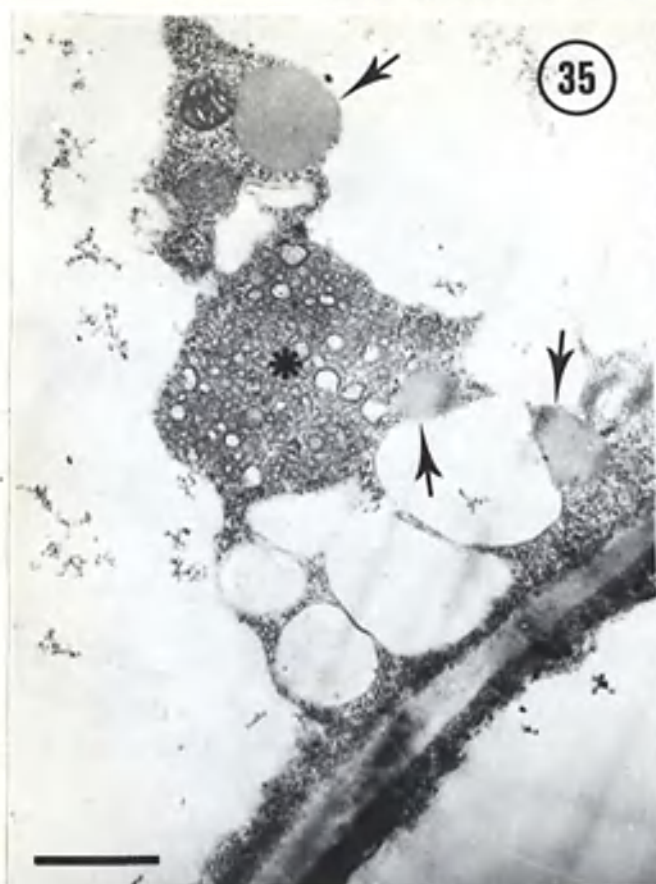
te de vírus ou ribossomas (Fig. 33).

Comparando-se inclusões de tecidos com diferentes tempos de inoculação detectaram-se algumas variações na sua composição. Enquanto às duas semanas da infecção apareciam numerosos glóbulos osmiofílicos esparsos no corpo da inclusão, após oito semanas tais glóbulos praticamente desapareciam (Figs. 32 e 35). Os grânulos de lipídios mostraram a situação inversa, sendo escassos em amostras de tecidos com duas semanas de infecção, mais abundantes naquelas com oito semanas, às vezes como que emergindo da inclusão para o vacúolo (Fig. 35). Por outro lado, as inclusões fibrilares eram mais abundantes em tecidos recentemente inoculados, tornando-se posteriormente escassas.

Abundantes agregados de partículas de vírus de aproximadamente 25 nm de diâmetro apareciam no citoplasma e vacúolos de células de todos os tecidos, inclusive do xilema (Fig. 36). Eventualmente encontraram-se massas de partículas envolvidas numa membrana, dentro do vacúolo (Fig. 34). Túbulos contendo partículas do vírus alinhadas unisseriamente na maioria dos casos foram observados em algumas células, localizados geralmente entre a plasmalema e a parede celular (Fig. 37). A parede celular, às vezes apresentava protuberâncias em forma de dedo dentro das quais havia plasmodesmata modificados com partículas de vírus no seu interior (Fig. 37, inserção). Todas estas estruturas eram encontradas com maior frequência em tecidos com pouco tempo de inoculados.

Nos núcleos das células infectadas não foram observadas modificações, aparecendo em todos os casos, com o mesmo aspecto daqueles tecidos saudáveis. Os cloroplastos apresentavam a sua forma normal, embora com numerosos grãos de amido de dimensões avantajadas e estrutura lamelar escassa, especialmente em tecidos recentemente inoculados (Fig. 32). Naqueles com seis e oito semanas de inoculados, os cloroplastos exibiam grãos de amido menores e a estrutura lamelar com algum sinal de desorganização. As mitocôndrias conservavam a sua forma e estrutura praticamente inalteradas, embora em algumas células encontravam-se anormalmente agrupadas, às vezes alinhadas lateralmente e formando parte das inclusões (Fig. 38). No resto das organelas'

Figs. 35-38. Outros aspectos citopáticos induzidos por VMSC-F. Fig. 35-Inclusão vesiculada (*) em célula parenquimática, oito semanas após a infecção. Notar os vários glóbulos lipídicos (setas) que formam parte da mesma. Fig. 36-Vasos lenhosos (X) contendo partículas livres ou em agregados densos. A seta assinala o agregado que aparece na inserção. Fig. 37-Detalhe de estruturas tubulares (setas) com partículas de vírus situadas na parede celular (pc). Ao lado desta observa-se uma inclusão fibrilar (if), junto de vesículas (*). Na inserção aparece uma protuberância da parede celular com um plasmodema contendo partículas. Fig. 38-Agrupamento anormal de mitocôndrias (m) dispostas paralelamente.



não foram observados desvios notáveis com respeito aos tecidos sadios.

3.3.3. Inoculações mistas

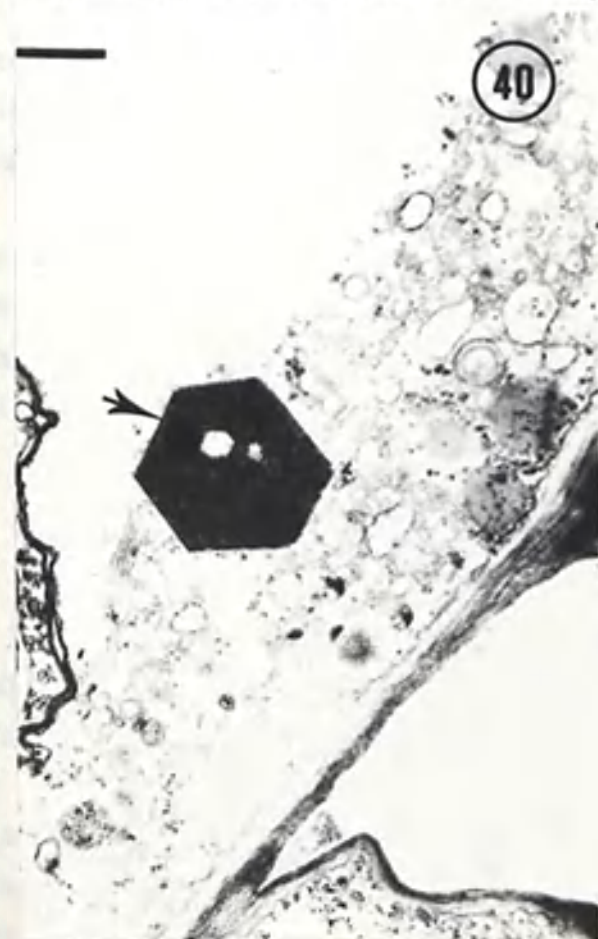
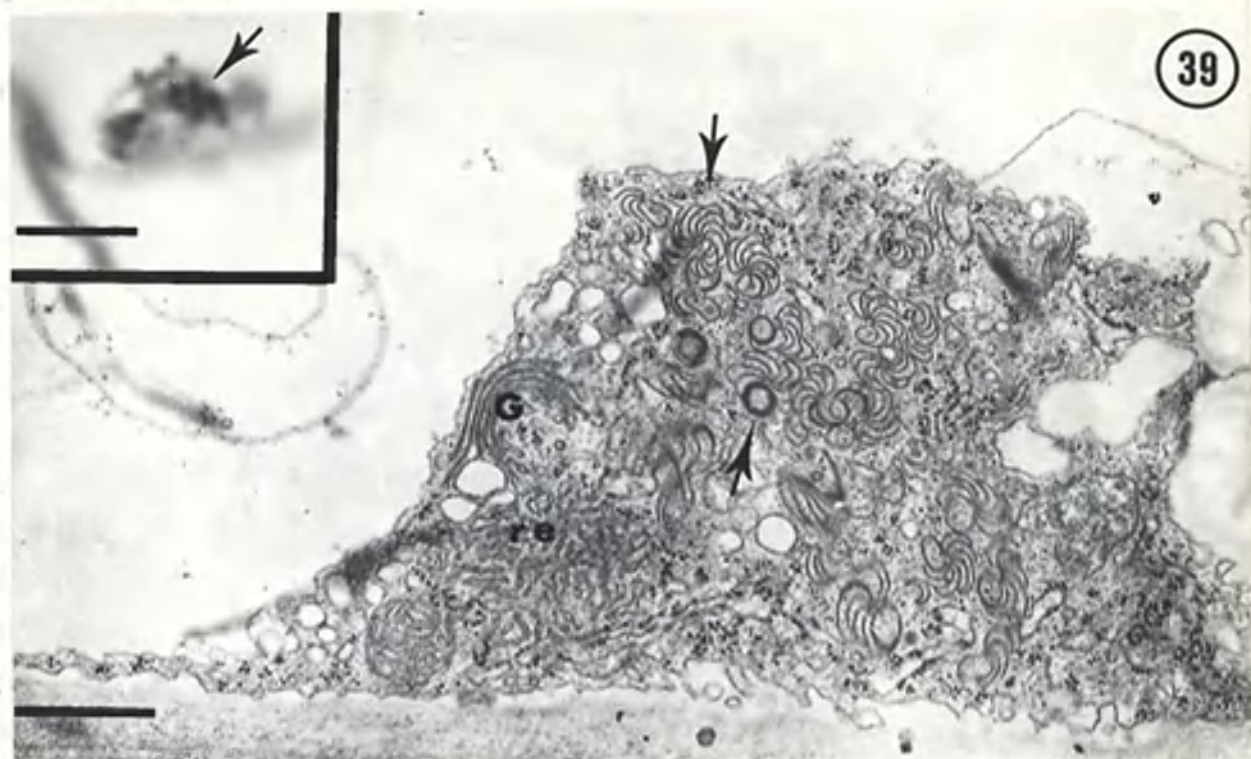
Na maioria dos casos não se detectaram diferenças significativas entre inoculações simultâneas e não simultâneas, não influenciando aparentemente na aparição de modificações a ordem de inoculação de cada vírus. Por esta razão se descrevem os resultados das combinações de cada par de vírus, em conjunto, sem levar em conta a ordem de inoculação, fazendo-se o esclarecimento correspondente nos poucos casos em que se detectaram diferenças.

3.3.3.1. Vírus do mosaico comum do feijoeiro (VMCF) e Vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro (VMDeF).

As secções semifinas de folhas infectadas sistemicamente com o VMCF e VMDeF, não apresentavam maiores alterações no aspecto geral dos tecidos. Cristais angulares intensamente corados de azul, similares àqueles produzidos pelo VMDeF em infecções simples, eram observados em células da epiderme e de ambos parênquimas, do mesófilo e do vascular. A frequência desses cristais nas células não era marcadamente diferente daquela de infecções simples. Inclusões amorfas semelhantes àquelas induzidas pelo VMCF, apareciam em algumas células dos mesmos tecidos que mostravam cristais angulares, porém não foram encontradas células apresentando ambos tipos de inclusões.

Quando secções ultrafinas de folhas infectadas com estes vírus foram analisadas ao microscópio eletrônico, observaram-se as inclusões típicas de cada componente do par, apresentando-se sempre em células diferentes. Em geral não havia diferenças marcantes na estrutura destas inclusões, em relação às infecções simples. Apenas notou-se um aumento do número de vesículas nas inclusões induzidas por VMCF (Fig. 39), enquanto as do VMDeF mostravam uma diminuição na proporção de cristais proteicos e de zonas vesiculadas em comparação com infecções sim-

Figs. 39-41. Efeitos citopáticos causados pela combinação VMCF e VMDeF. Fig.39-Inclusões lamelares típicas do VMCF (setas), junto a proliferações do retículo endoplasmático(re) e vesículas relacionadas com o aparelho de Golgi (G), em célula epidérmica aos quatorze dias após a infecção. Fig. 40-Cristal típico do VMDeF em uma zona ricamente vesiculada de uma célula parenquimática, quatorze dias após a infecção. Fig. 41-Célula do parênquima lacunoso oito semanas após a infecção, na qual aparecem inclusões lamelares (il) ao lado do núcleo (n). Entre a camada citoplasmática e o vacúolo observa-se um arranjo unisseriado' de partículas alongadas (setas) dispostas entre dois tonoplastos (t).



ples (Fig. 40).

Nas amostras de plantas com poucas semanas de inoculadas observaram-se partículas do VMCF dispersas no citoplasma de células do parênquima e da epiderme inclusive dos tricomas numa proporção maior que a encontrada em infecções simples. Em amostras de plantas com várias semanas de infecção apareciam partículas dispostas em fileiras unisseriadas e alinhadas paralelamente ao eixo longitudinal, comumente localizadas na interfase citoplasma-vacúolo e próximas de inclusões (Fig. 41).

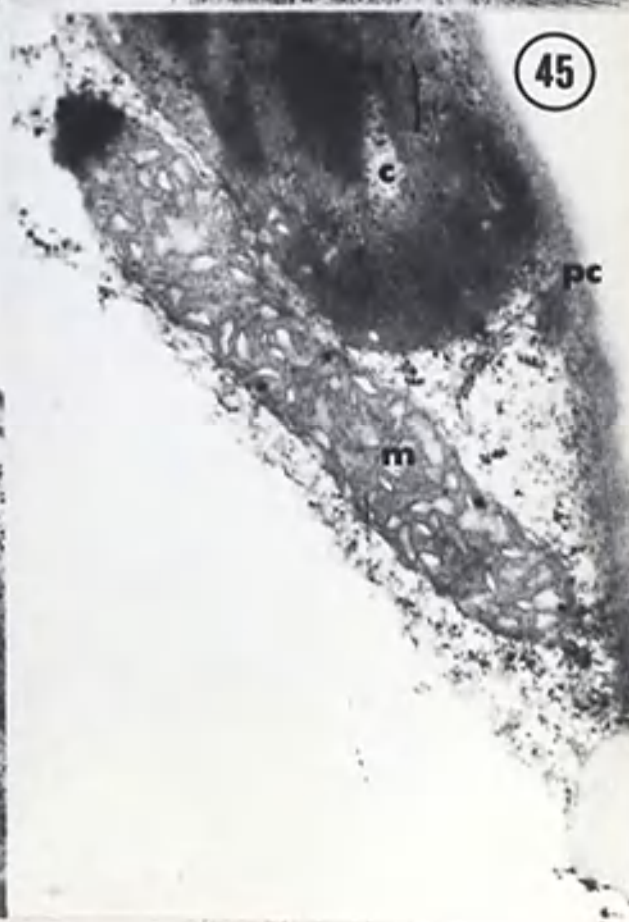
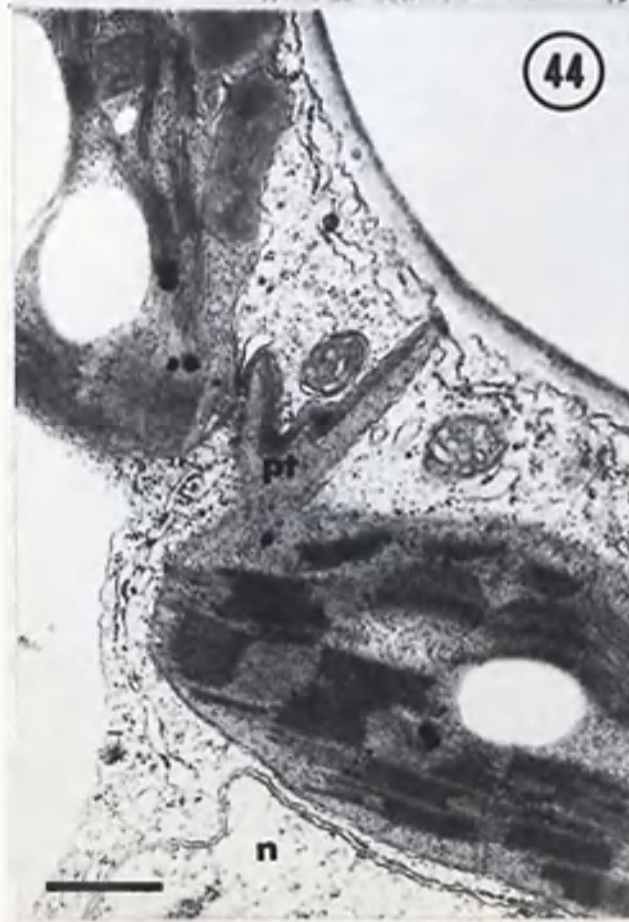
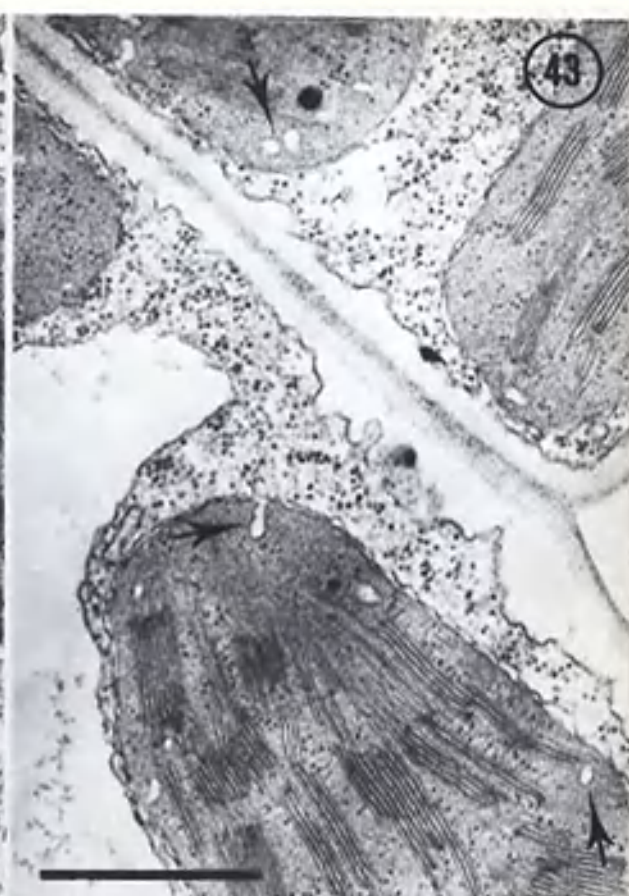
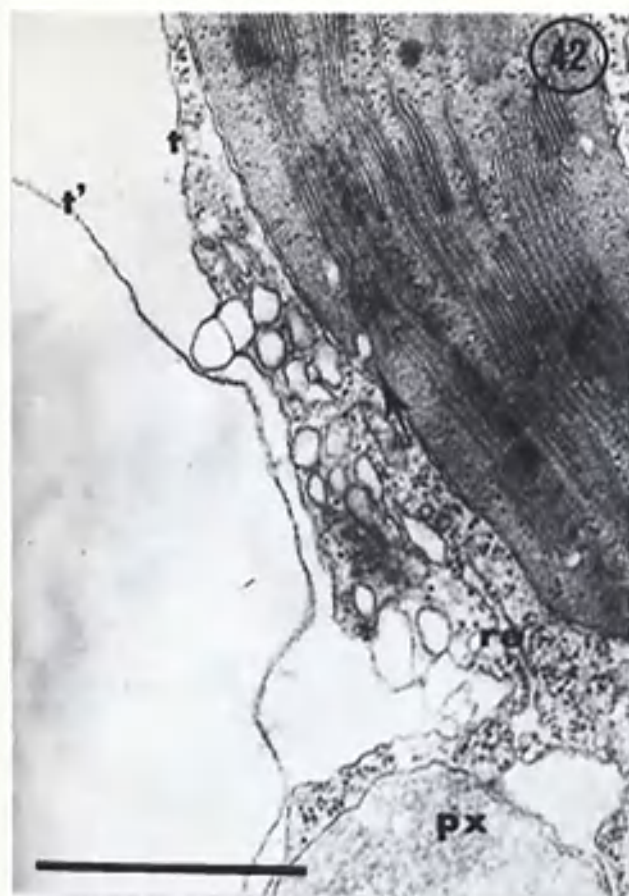
Nos núcleos, tanto nos casos das infecções simples como nas causadas por ambos vírus, não se detectaram modificações induzidas pela infecção. Os cloroplastos apresentavam invaginações similares às causadas pelo VMDeF em infecções simples, bem como também outras, apenas da membrana interna, que geravam em secção, vesículas pequenas arredondadas ou alongadas e com diâmetro médio de 50 nm (Figs. 42 e 43). Alguns cloroplastos por outro lado exibiam protusões geralmente contendo apenas material do estroma (Fig. 44). Ocasionalmente eram observados grãos de amido pequenos, enquanto que glóbulos osmiofílicos de dimensões reduzidas eram de ocorrência comum.

Numerosas mitocôndrias apareciam anormalmente alongadas, sendo que em algumas a relação comprimento/largura atingia o valor de 5. Quanto a sua estrutura interna não mostravam maiores alterações; apenas pequenos pontos osmiofílicos (Fig. 45).

3.3.3.2. Vírus do mosaico comum do feijoeiro (VMCF) e Vírus do mosaico do sul do feijoeiro (VMSF).

Nos cortes semifinos de tecidos infectados com os VMCF e VMSF, estudados sob microscopia de luz, observaram-se várias alterações no aspecto geral. Em amostras com poucas semanas de infecção, o parênquima paliçádico apresentava células que haviam perdido a sua forma normal aparecendo arredondadas. Também nos tecidos vasculares apareciam células deformadas às vezes colapsadas e fortemente coradas. Além destas alterações, nas amostras de plantas com várias semanas de infectadas a epiderme

Figs. 42-45. Modificações induzidas nas organelas pela infecção mista por VMCF e VMDeF. Fig. 42-Área vesiculada nas proximidades do retículo endoplasmático (re) e de um peroxissoma(px). Observar os dois tonoplastos (t e t') correndo aproximadamente paralelos. No cloroplasto' notam-se pequenas invaginações da membrana interna (seta). Fig. 43-Cloroplastos mostrando numerosas vesículas e invaginações da membrana interna (seta). Fig. 44-Célula do parênquima lacunoso apresentando um cloroplasto com uma protuberância (pt) desprovida de estrutura lamelar. Fig. 45-Cloroplasto (c) com a estrutura lamelar em desorganização e mitocôndria anormalmente alongada, (m) com pequenos pontos osmiofílicos.



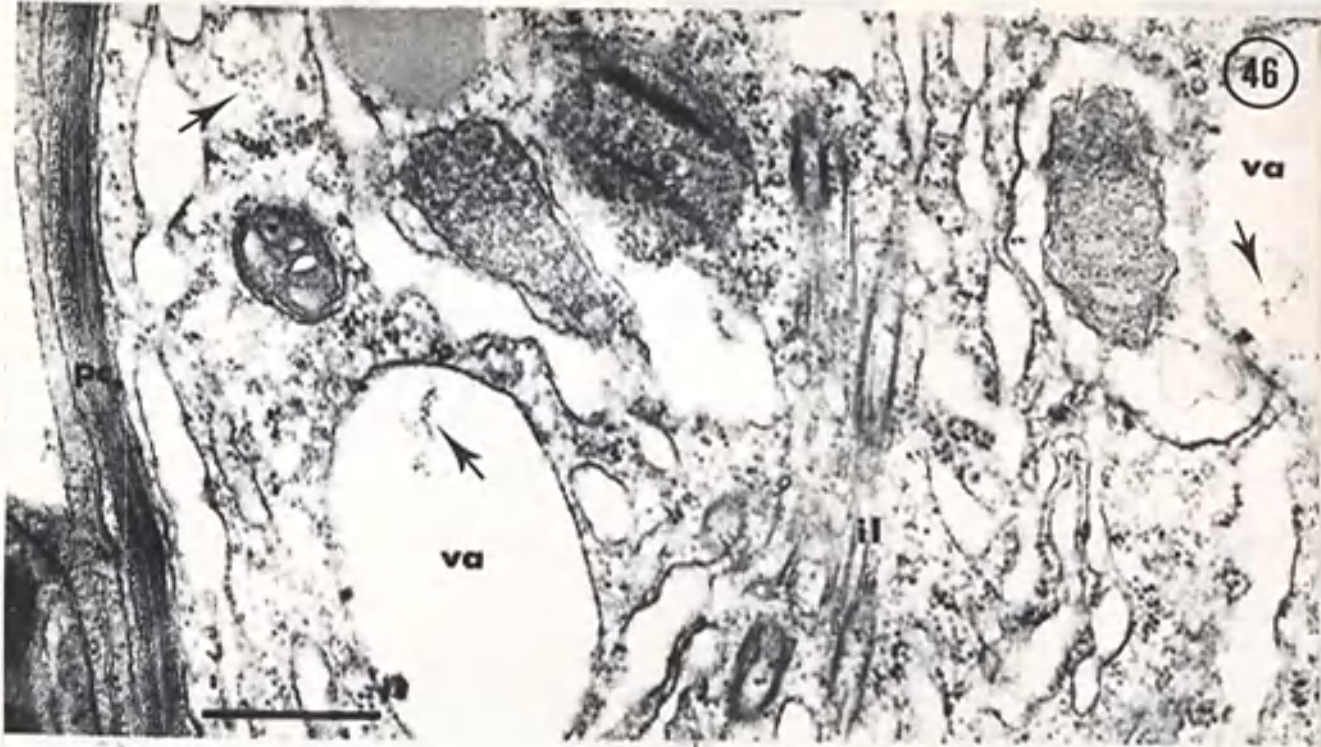
exibia células necrosadas às vezes completamente colapsadas. Quanto às alterações dentro das células, com exceção dos vasculares, em todos os tecidos encontravam-se inclusões amorfas fortemente coradas e nos núcleos o nucléolo era geralmente maior que em tecidos sadios (Fig. 49, inserção). Frequentemente nas células contendo inclusões eram observadas finas projeções do tonoplasto dentro do vacúolo, formando pontes ou anéis citoplasmáticos (Fig. 49, inserção).

No estudo de seções ultrafinas ao microscópio eletrónico, após duas semanas de infecção com esta combinação apareciam numerosas inclusões citoplasmáticas complexas, formadas por elementos típicos do VMCF entre os quais havia partículas isométricas, presumivelmente correspondentes ao VMSF (Figs. 46 e 47). Vesículas semelhantes àquelas observadas em infecções simples com este vírus, ocorriam frequentemente formando parte das inclusões, assim como proliferações do retículo endoplasmático (Fig. 48). As partículas do VMSF apareciam também nos vacúolos, especialmente de células epidérmicas e do parênquima vascular, e dentro dos vasos crivados e lenhosos. Porém a modificação mais conspícua observada em tecidos com poucas semanas de infecção, foi a ocorrência frequente de finas projeções citoplasmáticas limitadas por dois ou mais tonoplastos, formando delgadas pontes ou anéis, segundo o plano de secção, e entre as quais ocorriam partículas alongadas, dispostas unisseriada e paralelamente (Fig. 49 e 50). Estas projeções, que às vezes podiam ser várias na mesma célula haviam sido detectadas inclusive ao microscópio de luz.

No nucleoplasma apareciam partículas isométricas esparsas ou eventualmente em massas. Ocasionalmente nessas amostras de plantas com duas semanas de infecção, ocorreram inclusões nucleares compostas por fibrilas onduladas dispostas paralelamente, em células do parênquima do mesófilo (Fig. 51). Este tipo de inclusão não foi observado em nenhum outro tratamento.

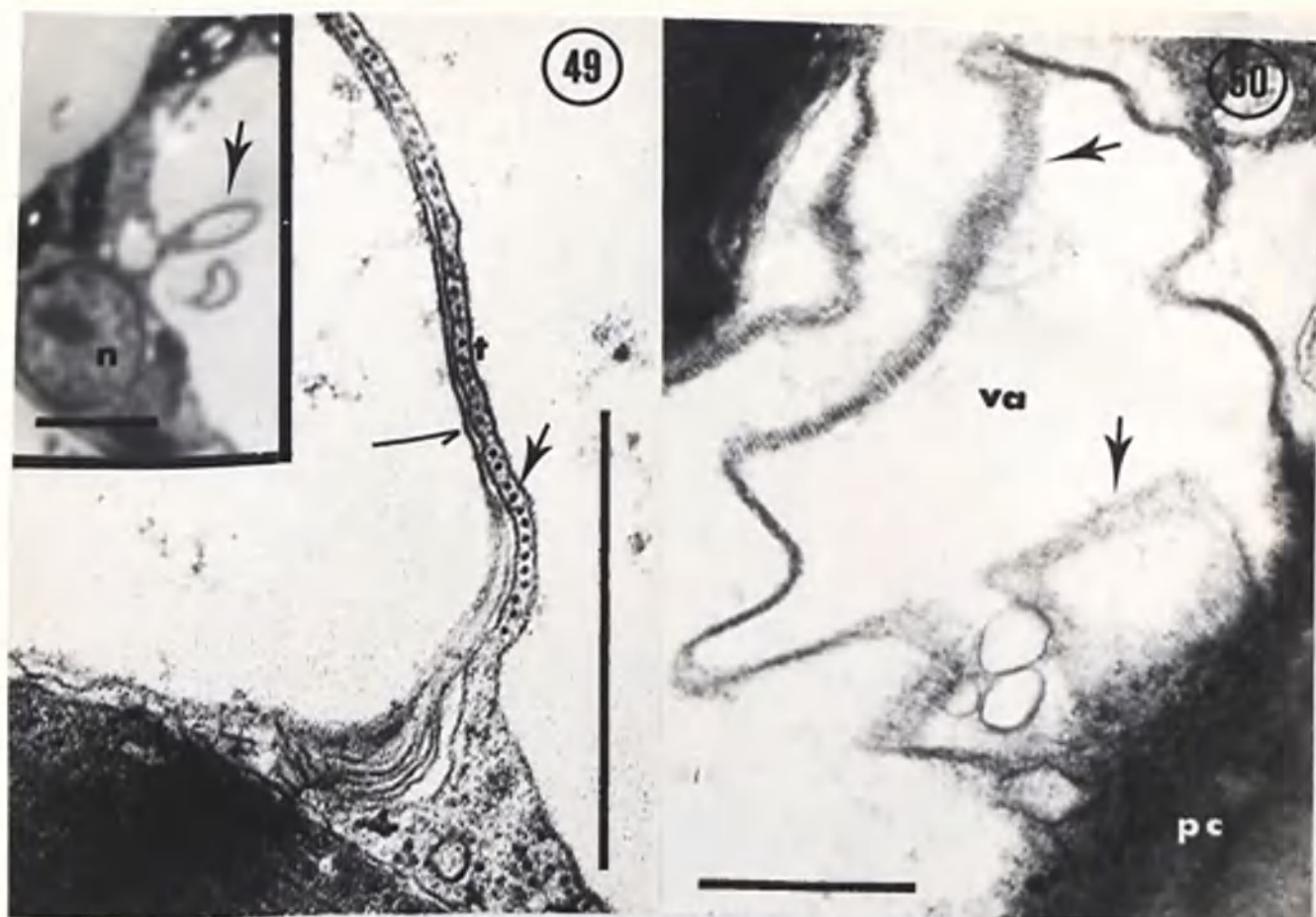
Após várias semanas da infecção as modificações observadas continuavam a ocorrer com o mesmo aspecto, mas com menor frequência, especialmente as projeções citoplasmáticas. Em células colapsadas da epiderme, arranjos cristalinos de par-

Figs. 46-48. Aspectos da infecção mista por VMCF e VMSF. Fig. 46 - Inclusões lamelares (il) em célula parenquimática numa área intensamente vesiculada. Partículas isométricas (setas) podem ser observadas no citoplasma e nos vacúolos. Notar as organelas em processo de desorganização. Fig. 47 - Inclusões lamelares entre as quais aparecem partículas isométricas (setas), presumivelmente virais. Fig. 48 - Inclusões lamelares associadas a proliferações do retículo endoplasmático (setas), em célula do parênquima lacunoso seis semanas após a infecção. Na parte inferior nota-se uma célula epidérmica colapsada com um material denso no seu interior (E).



Figs. 49-50 - Aspecto das projeções citoplasmáticas encontradas em células infectadas pela combinação VMCF e VMSF. Fig. 49 - Secção transversal de uma fileira unisseriada de partículas (seta), contidas entre dois tonoplastos (t), projetando-se dentro do vacúolo de uma célula parenquimática. Notar a presença de um terceiro tonoplasto (meia seta), acompanhando o arranjo. Na inserção, o aspecto das projeções citoplasmáticas (seta), vistas ao microscópio de luz. Fig. 50 - Projeções citoplasmáticas seccionadas obliquamente (setas), penetrando no vacúolo (va), a partir da parede celular (pc).

Fig. 51 - Inclusão fibrilar (seta) dentro do núcleo (n) de uma célula parenquimática, 15 dias após a infecção pela mistura VMCF e VMSF.



tículas isométricas eram a única estrutura discernível (Fig. 52). Nos tricomas, completamente deformados, haviam massas cristalinas destas partículas, às vezes alternando com inclusões lamelares (Figs. 53 e 54). Dentro da massa, estas se orientavam seguindo diferentes padrões cristalinos (Fig. 55). Nas células basais destes tricomas era constante a presença de inclusões mistas, apresentando abundantes cataventos, lamelas e partículas isométricas livres.

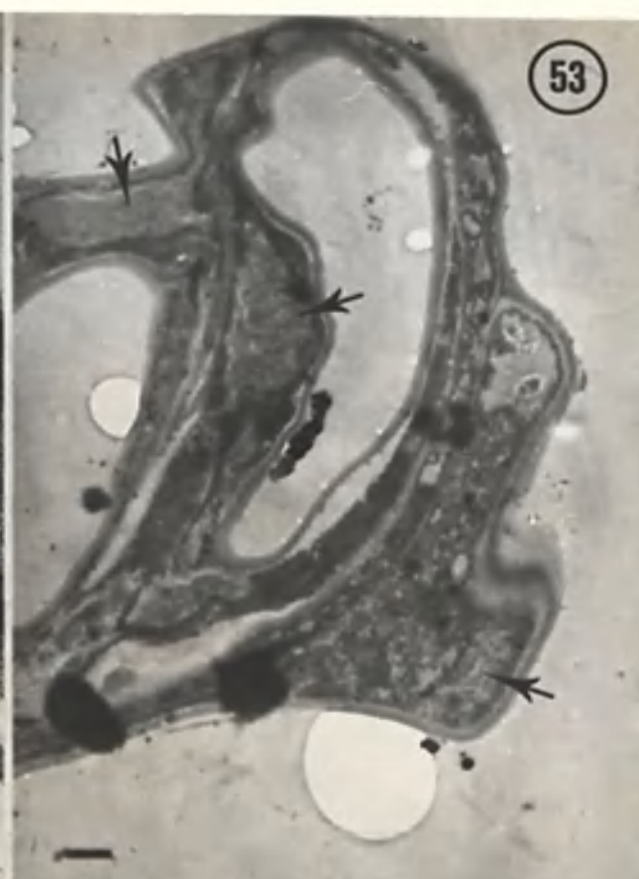
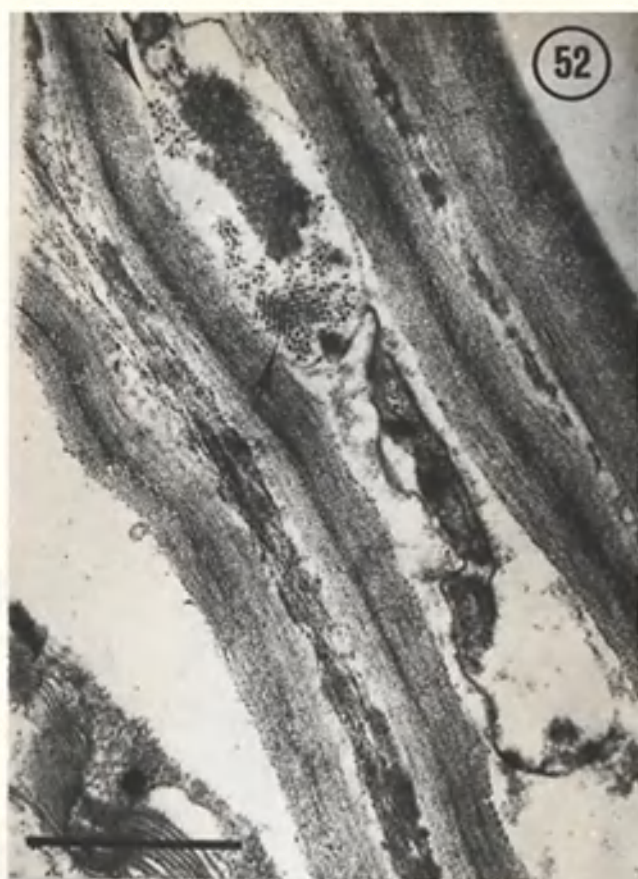
Os cloroplastos apareciam deformados, com numerosas invaginações contendo citoplasma com partículas ou mitocôndrias. Estas em geral mantinham o seu aspecto normal, embora as cristas se mostrassem algo inchadas na maioria delas, e em algumas apresentavam-se desorganizadas.

3.3.3.3. Vírus do mosaico comum do feijoeiro (VMCF) e Vírus do mosaico severo do caupi-isolado do feijoeiro (VMSC-F)

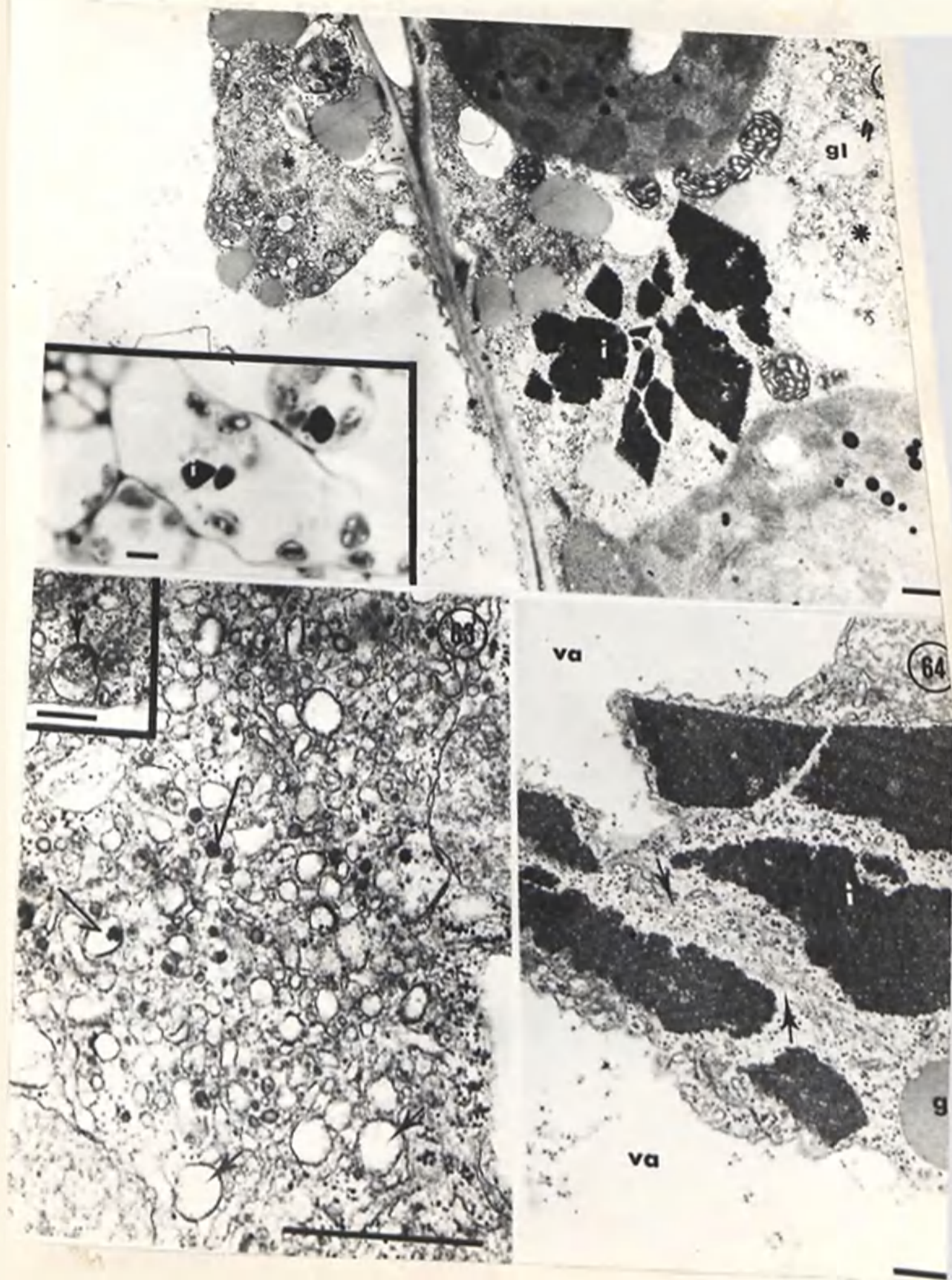
Nas secções semifinas de tecidos infectados com os VMCF e VMSC-F analisadas ao microscópio ótico, não foram observadas maiores alterações no aspecto geral dos tecidos. Foram contudo, notadas abundantes inclusões amorfas no citoplasma de células de todos os tecidos, com exceção dos vasculares.

Quando secções ultrafinas destes tecidos foram estudadas ao microscópio eletrônico, verificou-se que a maioria das inclusões amorfas vistas ao microscópio de luz, eram compostas por uma mistura de estruturas induzidas por ambos vírus. Numerosas vesículas arredondadas, semelhantes àquelas que produz o VMSC-F em infecções simples, apareciam junto às inclusões lamelares características do VMCF (Fig. 56). A proporção de inclusões mistas em relação àquelas induzidas por apenas um dos componentes foi maior em amostras de plantas com várias semanas de infecção, nas quais era raro encontrar inclusões que não contassem com elementos dos dois vírus. Por outro lado, amostras de plantas inoculadas inicialmente com o VMSC-F, apresentavam maior quantidade relativa de inclusões típicas deste, quando comparadas com amostras de plantas inicialmente inoculadas

Figs. 52-55 - Arranjos cristalinos ou semicristalinos de partículas isométricas 6-8 semanas após da infecção mista por VMCF e VMSF. Fig. 52 - Célula epidérmica colapsada na qual se observam partículas isométricas em arranjo semicristalino (setas). Fig. 53 - Pelo pluricelular deformado apresentando algumas células colapsadas e outras contendo massas de partículas em arranjos cristalinos (setas). Fig. 54 - Detalhe da figura anterior no qual se observam agregados cristalinos de partículas isométricas junto a estruturas semelhantes a inclusões lamelares (il). Fig. 55 - Massas de arranjos cristalinos de partículas isométricas em uma célula de tricoma, dispostas em diferentes padrões. Na inserção aparece um detalhe de um arranjo hexagonal. A barra da inserção equivale a 100nm.



Figs. 56-61 - Aspectos da infecção mista por VMCF e VMSC-F. Fig. 56 - Inclusão complexa formada por uma massa de vesículas (*), junto a inclusões lamelares (il). Entre o tonoplasto (t) e uma segunda membrana (t') observam-se agregados de partículas isométricas (setas). Fig. 57 - Estruturas tubulares (seta) contendo partículas isométricas em arranjo unisseriado, perto da parede celular (pc) de uma célula do parênquima lacunoso. Fig. 58 - Pequeno cristal de partículas isométricas (setas), em uma célula epidérmica. Fig. 59 - Cloroplasto (c) com a sua estrutura lamelar em desorganização apresentando invaginações com partículas isométricas (*). Fig. 60 - Cloroplasto (c) apresentando glóbulos osmiofílicos e uma mitocôndria (m) dentro de uma invaginação. Fig. 61 - Agrupamento de mitocrôndrias no citoplasma de uma célula parenquimática. No vacúolo observam-se agrupamentos de partículas isométricas (seta).



com o VMCF. Também naquele arranjo, a associação entre elementos de ambos vírus revelava-se mais estreita, mesmo em amostras tomadas duas semanas após a inoculação.

Partículas semelhantes àsquelas do VMSC-F foram notadas dentro das inclusões, bem como no citoplasma e vacúolos de células epidérmicas e parenquimáticas, onde ocorriam em grande quantidade, isoladas ou formando massas envolvidas por uma membrana. Nos tecidos vasculares essas partículas também apareciam freqüentemente, tal como foi observado em infecções simples causadas por este vírus. Estruturas tubulares situadas entre a plasmalema e a parede celular e também protuberâncias desta incluindo plasmodesmata modificados, apareciam freqüentemente contendo partículas isométricas no seu interior, em células epidérmicas e parenquimatosas de amostras provenientes de plantas com diferentes tempos de infecção. Em uma amostra de planta com oito semanas de infecção, encontraram-se no citoplasma de células epidérmicas pequenos cristais formados por partículas dispostas em arranjo hexagonal (Fig. 58).

Não foram observadas modificações nos núcleos das células de plantas infectadas com esta combinação de vírus, mas os cloroplastos apareciam deformados, com invaginações contendo citoplasma unicamente ou também mitocôndrias (Fig. 60). Em geral apresentavam poucos grãos de amido e glóbulos osmiofílicos, enquanto a estrutura lamelar era notavelmente reduzida e desorganizada (Fig. 59). As mitocôndrias apresentavam-se praticamente inalteradas, embora às vezes aparecessem anormalmente agrupadas de maneira semelhante à observada em infecções simples com o VMSC-F (Fig. 61).

3.3.3.4. Vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro (VMDeF) e Vírus do mosaico do sul do feijoeiro (VMSF)

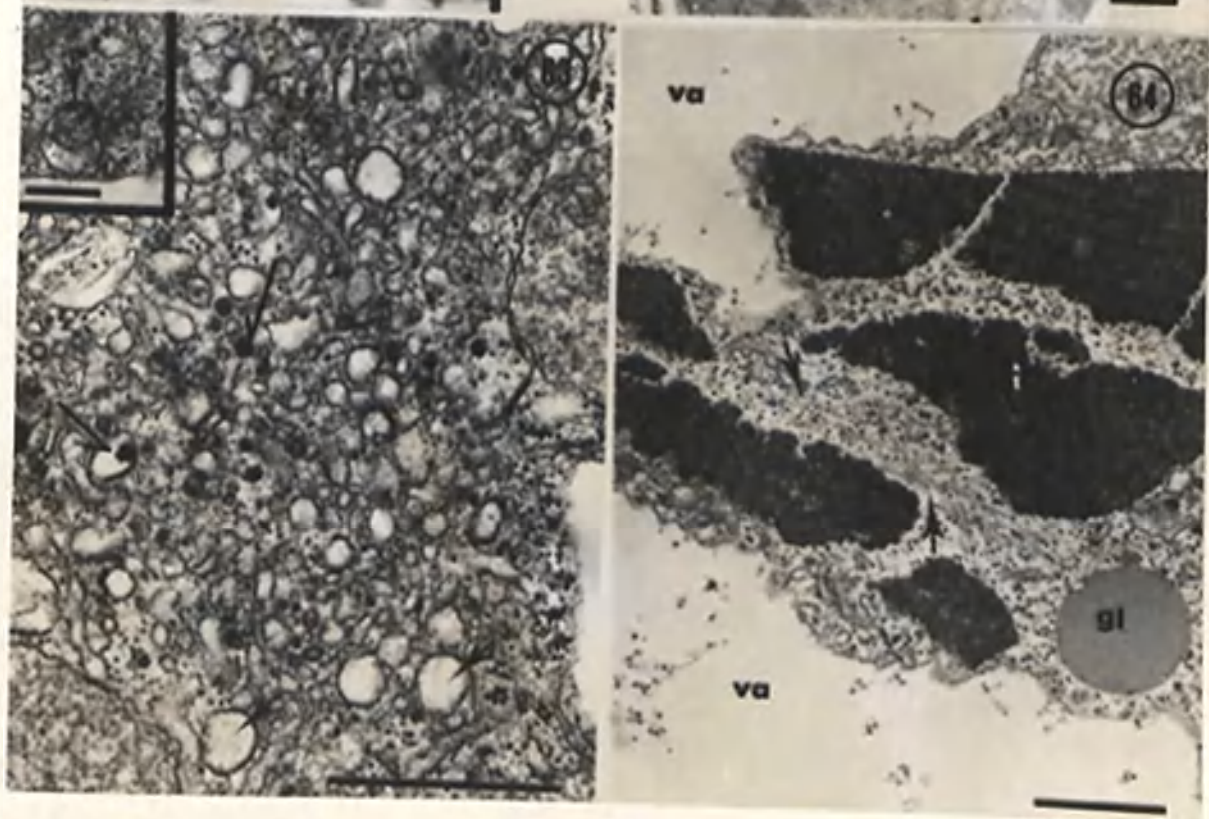
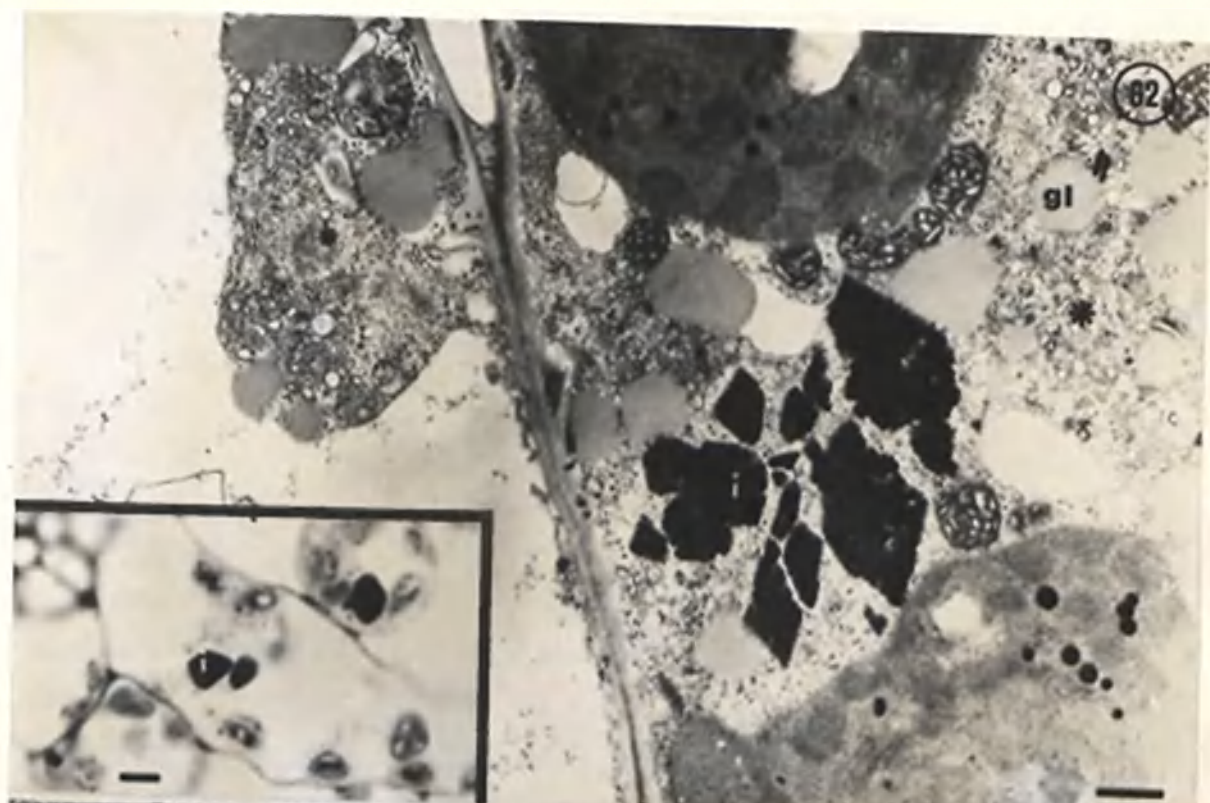
Nas secções semifinas de tecidos infectados com o VMDeF e VMSF, não se detectaram alterações drásticas no aspecto geral dos tecidos, mas no citoplasma de muitas células'

ocorriam estruturas poligonais coradas fortemente de azul, de aspecto e tamanho semelhantes àqueles observados em infecções simples com o VMDeF. Neste arranjo de vírus, a quantidade desses cristais foi notavelmente maior do que a encontrada em qualquer outra combinação que incluísse o VMDeF, aparecendo eles nos tricomas, células epidérmicas, parênquima do mesófilo e parênquima vascular (Fig. 62, inserção).

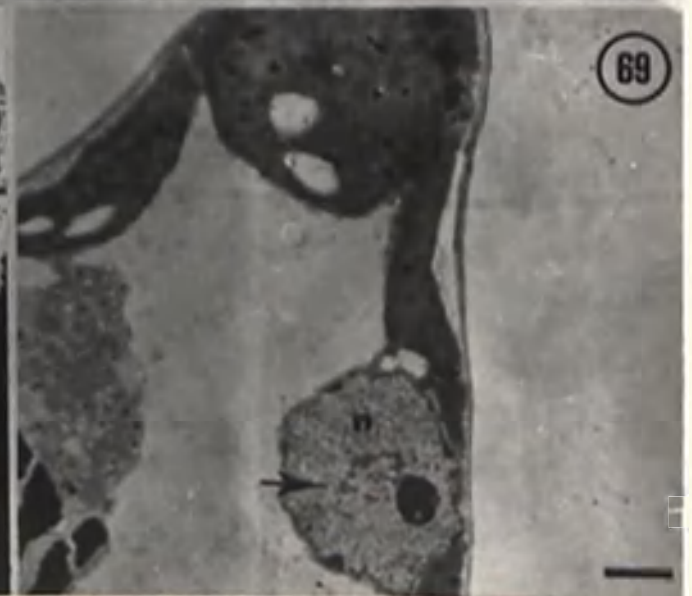
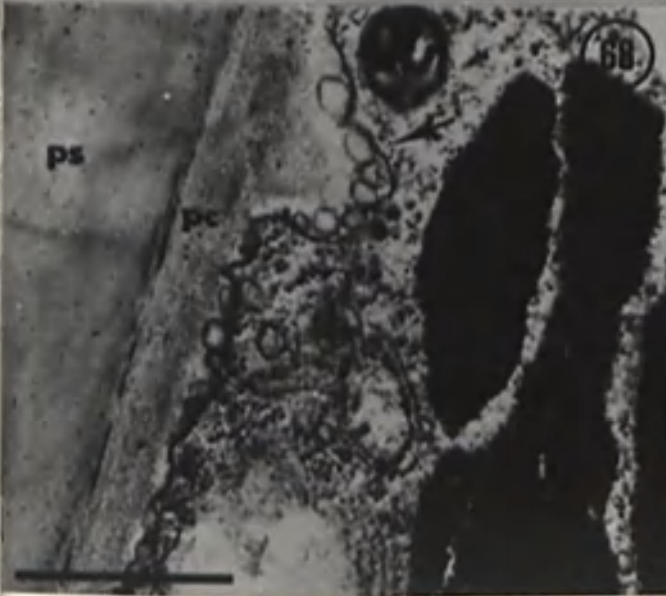
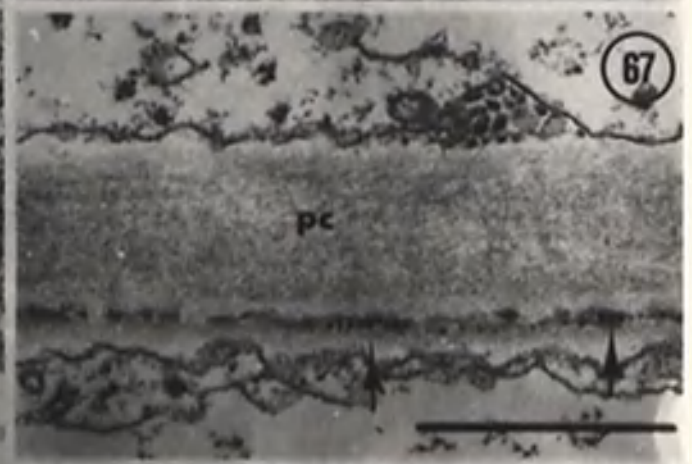
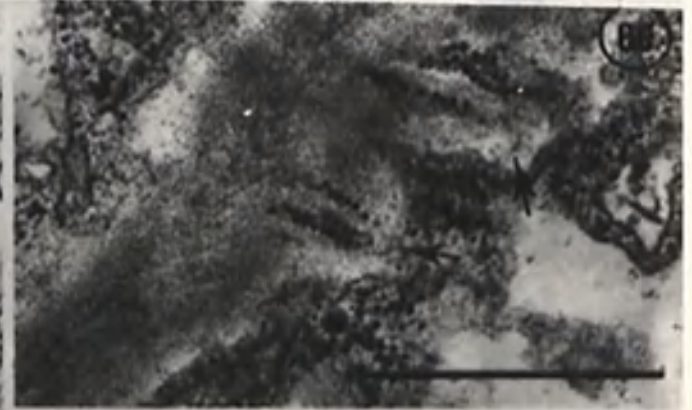
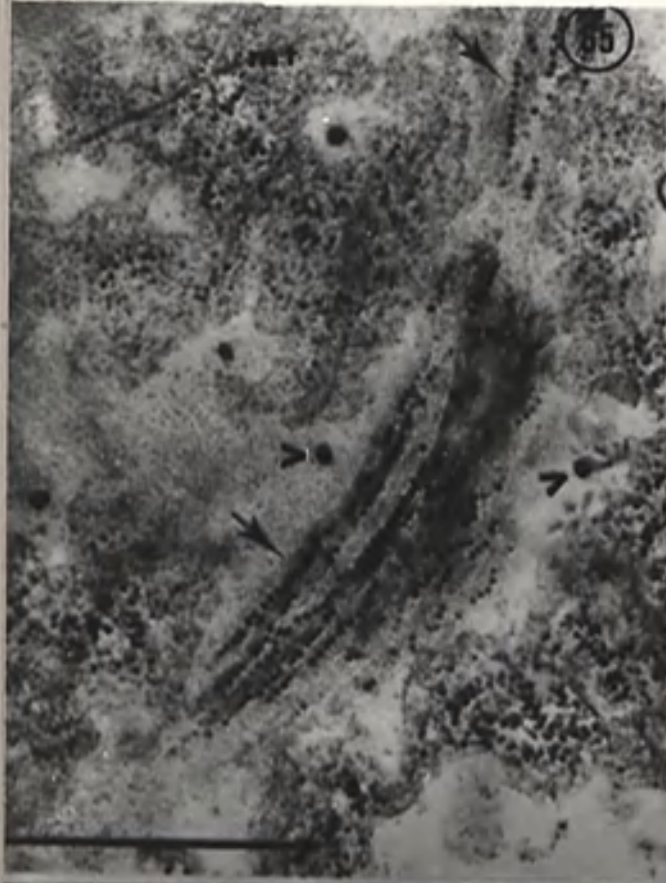
A análise de secções ultrafinas ao microscópio eletrônico, revelou a presença de inclusões de grandes dimensões e de composição complexa, no citoplasma de numerosas células provenientes de amostras coletadas 2 e 3 semanas após a inoculação. Nestas ocorriam cristais angulares de dimensões avantajadas, constituídos por presumíveis partículas de vírus, similares aos achados em infecções simples causadas pelo VMDeF, assim como um outro tipo de inclusão cristalina menor, de contorno irregular e menos densa aos elétrons, formada por unidades dispostas em padrões hexagonais ou quadrangulares (Fig. 62). Geralmente ao redor de ambas as estruturas cristalinas, apareciam massas de vesículas arredondadas usualmente de perfil arredondado e de tamanho variável. Algumas dessas vesículas continham um material denso, ou fibrilas, no seu interior (Fig. 63). Presumíveis partículas de vírus, porém difíceis de diferenciar dos ribossomas, ocorriam esparsas entre as vesículas, às vezes contidas dentro delas (Fig. 63, inserção). Peroxisomas e glóbulos lipídicos eram também comumente observados nessas áreas diferenciadas (Fig. 64). Em algumas inclusões encontravam-se fibrilas flexuosas dispostas frouxamente e orientadas no mesmo sentido, e próximas dos cristais de vírus (Fig. 64).

Além destas modificações, nas amostras de tecidos com poucas semanas de infecção, apareciam numerosos túbulos relacionados com as paredes celulares, contendo partículas de vírus no seu interior, dispostas unisseriamente (Fig. 65). Estes túbulos eram observados especialmente em células do parênquima do mesófilo, e geralmente ocorriam em zonas próximas das inclusões. Em alguns casos os túbulos ocorriam sem partículas (Fig. 65) e freqüentemente ficavam adsorvidos nas pare

Figs. 62-64 - Inclusões induzidas pela combinação VMDeF e VMSF. Fig. 62 - Aspecto de inclusões citoplasmáticas cristalinas densas (i) , formadas por presumíveis partículas virais. Outras inclusões cristalinas menos densas e de menor tamanho aparecem numa célula vizinha (* pequeno). Ambos tipos de inclusões aparecem rodeadas de zonas vesiculadas (* grande) nas quais observam-se numerosos glóbulos lipídicos (gl). Na inserção, as inclusões (i) quando vistas ao microscópio de luz. Fig. 63 - Região vesiculada na qual observam-se algumas vesículas contendo um material fibrilar (setas), outras com um material eletrodense (meias setas) e outras com presumíveis partículas virais (inserção , seta). Fig. 64 - Detalhe de cristais de vírus, entre os quais aparecem fibrilas flexíveis orientadas mais ou menos paralelas (setas). Os cristais estão localizados no citoplasma, próximos do vacúolo (va) e de um glóbulo lipídico (gl).



Figs. 65-68 - Estruturas citopáticas associadas com a parede celular, induzidas pela combinação VMDeF e VMSF. Fig. 65 - Túbulos contendo partículas em arranjo unissériado (setas), vistos numa secção tangencial da parede celular. Alguns plasmodesmata aparecem seccionados transversalmente (cabeça de seta) e um microtúbulo seccionado longitudinalmente (mt) aparece sem nenhum conteúdo. Fig. 66 - Protuberâncias da parede celular (setas) contendo plasmodesmata modificados, com partículas no seu interior. Fig. 67 - Secção de uma parede celular (pc) na qual observa-se absorvidos, túbulos contendo partículas presumivelmente virais (setas). Fig. 68 - Vesículas situadas entre uma protuberância da parede celular (pc) e a plasmalema (seta), produzindo um corpo paramural em uma célula do parênquima vascular, vizinha a um vaso lenhoro, do qual aparece uma porção da parede secundária (ps). Fig. 69 - Inclusão (seta) observada no núcleo (n) de uma célula do parênquima lacunoso.



des celulares, orientados paralelamente (Fig, 67). Todavia, protuberâncias da parede celular contendo plasmodesmata modificados com partículas de vírus no seu interior eram encontradas com certa regularidade (Fig, 66). Também na região das inclusões apareciam freqüentemente protuberâncias da parede intimamente relacionadas com vesículas que as contornavam, formando uma estrutura similar aos denominados corpos paramurais (Fig, 68).

Abundantes agregados de partículas, semelhantes aos encontrados em infecções simples pelo VMSF, apareciam nos vacúolos de células epidérmicas e parenquimáticas, assim como nos tecidos vasculares.

Na maioria das células que apresentavam inclusões citoplasmáticas os núcleos mostravam inclusões cristalinas de forma irregular (Fig, 69). Pela sua densidade aos elétrons e o arranjo quadrangular apresentado, assemelhavam-se às inclusões cristalinas do citoplasma, porém a periodicidade dos arranjos era de apenas 15 nm, enquanto que nas citoplasmáticas este valor era de cerca de 30 nm. Numerosas partículas de vírus apareciam esparsas no nucleoplasma, inclusive entre os cristais (Fig, 70).

Os cloroplastos mantinham a sua forma normal, a maioria com pequenos grãos de amido, enquanto outros estes eram de tamanho avantajado, especialmente em algumas células do parênquima lacunoso. Todos apresentavam glóbulos osmiofílicos pequenos e em muitos, a estrutura lamelar era algo mais aberta ou então desorganizada (Fig, 62). As mitocôndrias não mostravam alterações, embora algumas aparecessem com cristas anormalmente desenvolvidas e com corpos densos no seu interior (Fig, 71).

Nas amostras coletadas quatro semanas ou mais após a inoculação, a presença de inclusões reduzia-se drasticamente, sendo que às oito semanas da infecção apenas apareciam alguns cristais isolados de presumíveis partículas virais, no citoplasma sem qualquer outro dos componentes observados em plantas recentemente infectadas. Agregados de partículas continuavam a ocorrer no vacúolos de células epidérmicas

Fig. 70 - Detalhe de um núcleo (n) dentro de cujo envoltório (en), observam-se partículas isométricas esparsas (seta) e uma inclusão cristalina (ic), próximo do nucléolo (nu), 15 dias após a infecção com VMDeF e VMSF.

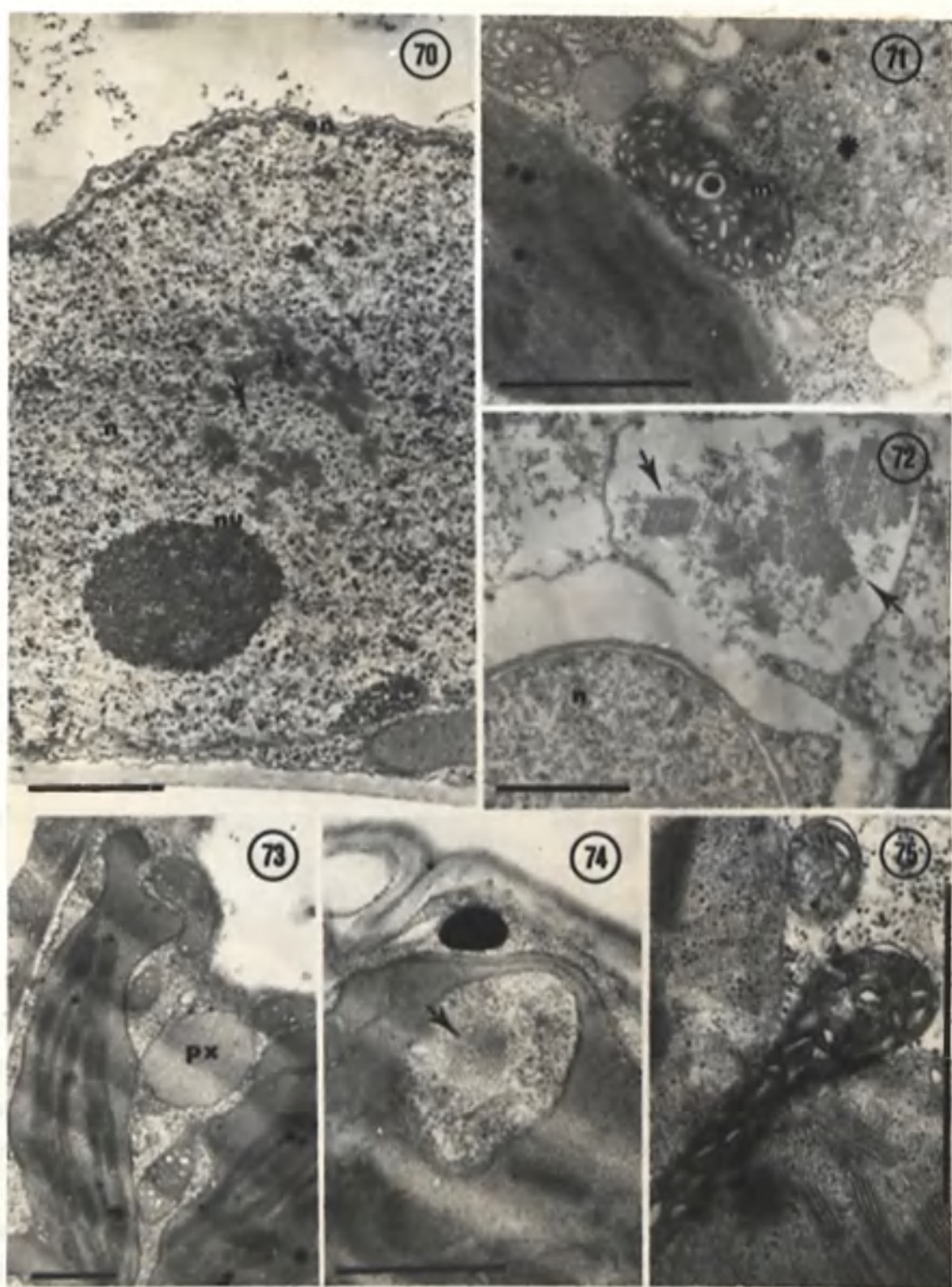
Figs. 71-75 - Mais aspectos citopáticos da infecção mista por VMDeF e VMSF. Fig. 71 - Mitocôndria (m) mostrando um corpo osmiofílico dentro de uma crista anormalmente desenvolvida, numa região rica em vesículas (*) de uma célula parenquimatosa, aos quinze dias da infecção.

Fig. 72 - Arranjo cristalino de partículas (setas) no vacúolo de uma célula epidérmica 8 semanas após a infecção. No núcleo (n) observam-se numerosas partículas esparsas.

Fig. 73 - Cloroplastos com a estrutura lamelar em desorganização e com a sua forma alterada; mitocôndrias em situação similar e peroxissomas (px) de aspecto normal.

Fig. 74 - Cloroplastos apresentando uma invaginação dentro da qual observa-se um agregado cristalino de partículas presumivelmente virais (seta).

Fig. 75 - Mitocôndria aprisionada entre dois cloroplastos em uma célula parenquimática.



e parenquimáticas, freqüentemente formando arranjos cristalinos (Fig. 72). Em células colapsadas da epiderme podiam-se visualizar massas de partículas localizadas entre estruturas densas de formas indefinidas.

Nos núcleos haviam desaparecido as inclusões cristalinas, mas as partículas de vírus eram observadas em quantidades similares à de tecidos com menos tempo de infecção (Fig. 72). Nas organelas as modificações haviam-se intensificado, de modo que os cloroplastos apresentavam-se com profundas invaginações contendo citoplasma, mitocôndrias ou às vezes pequenos cristais de vírus (Figs. 73 e 74). A estrutura lamelar encontrava-se reduzida, em alguns casos totalmente desorganizada. Freqüentemente apareciam mitocôndrias anormalmente alongadas, às vezes apertadas entre cloroplastos ou também com invaginações e cristas arredondadas (Fig. 75). Zonas vesiculadas relacionadas com estruturas semelhantes a corpos paramurais ocorriam eventualmente nas amostras desses tecidos.

3.3.3.5. Vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro (VMDeF) e Vírus do mosaico severo do caupí-isolado do feijoeiro (VMSC-F)

Os tecidos de folhas de plantas infectadas com os VMDeF e VMSC-F, observados no microscópio de luz, apresentavam algumas alterações nas disposição das organelas dentro das células, aparecendo freqüentemente cloroplastos esparsos nos vacúolos. Inclusões amorfas coradas de azul ocorriam em células da epiderme e dos parênquimas do mesófilo e vascular. Ocasionalmente nos dois primeiros tecidos anteriormente mencionados, eram encontrados cristais pequenos fortemente corados, às vezes nas mesmas células que apresentavam inclusões amorfas.

Quando os tecidos eram observados ao microscópio eletrônico ocorriam cristais semelhantes aos induzidos por VMDeF, em poucas células. Em alguns casos foram encontrados cristais alongados, formados por presumíveis partículas de vírus envolvidas por uma membrana (Fig. 76). Abundantes inclusões ve

Figs. 76-79 - Aspectos da infecção por VMDeF e VMSC-F. Fig. 76 - Arranjo cristalino de partículas envolvidas por uma membrana (seta) no vacúolo de uma célula parenquimática, um detalhe do qual pode ser apreciado na inserção. Fig. 77 - Inclusão vesiculada na qual se observam glóbulos osmiofílicos e presumíveis partículas virais. Notar a mitocôndria anormalmente alongada e estrangulada e o apêndice do cloroplasto. Fig. 78 - Massa de partículas (*) situadas nas proximidades do núcleo (n), entre dois tonoplastos (t e t'). Fig. 79 - Massa de partículas (*) envolvidas por membranas, um detalhe da qual observa-se na inserção.

siculadas típicas da infecção por VMSC-F, apareciam em células da epiderme dos parênquimas do mesófilo e da região vascular (Fig. 77). Massas de partículas localizadas na interfase vacúolo-citoplasma (Fig. 78), ou nos vacúolos rodeados por membranas, eram comumente observadas em células do parênquima do mesófilo (Fig. 79), enquanto agregados livres podiam ser visualizados em todos os tecidos inclusive os vasculares. Protuberâncias das paredes celulares contendo plasmodesmata modificados com presumíveis partículas virais no seu interior, eram observadas tal como nas infecções simples pelo VMSC-F.

Os núcleos apareciam com aspecto normal. Os cloroplastos apresentavam numerosos globulos osmiofílicos grandes, poucos grãos de amido e a estrutura lamelar desarranjada e reduzida na maioria deles e, às vezes, grupos de vesículas pequenas no estroma (Figs. 80 e 81). Eventualmente eram encontrados alguns com delgadas prolongações (Fig. 77). Quanto às mitocôndrias muitas delas apareciam com porções da membrana externa dissolvidas (Fig. 82), no entanto, outras mostravam finas prolongações parecidas àquelas observadas no cloroplasto (Fig. 77). Quanto a sua estrutura interna, a maioria apresentava pontos osmiofílicos na matriz enquanto outras exibiam poucas cristas (Fig. 80). Em algumas células apareciam em grupos de várias unidades, às vezes fusionadas e em consequência com perda da sua individualidade (Fig. 83).

Corpos osmiofílicos de diferentes tamanhos e de contorno irregular, eram frequentemente achados esparsos no citoplasma ou então aderidos à superfície de cloroplastos e mitocôndrias (Figs. 80 e 82).

3.3.3.6. Vírus do mosaico do sul do feijoeiro (VMSF) e Vírus do mosaico severo do caupí-isolado do feijoeiro (VMSC-F).

Os tecidos inoculados com a combinação VMSF e VMSC-F, mostraram algumas alterações quando observados ao microscópio de luz. Duas semanas após a infecção, os vasos do xilema de nervuras secundária apareciam fortemente corados de

Figs. 80-83 - Alterações observadas nas organelas de plantas infectadas com VMDeF e VMSC-F.

Fig. 80 - Célula do parênquima lacunoso na qual observa-se uma mitocôndria com poucas cristas e um glóbulo osmiofílico aderido à sua superfície (seta). Um cloroplasto aparece com a estrutura lamelar mais aberta que em tecidos sadios.

Fig. 81 - Cloroplasto com numerosos glóbulos osmiofílicos e vesículas em uma das extremidades (seta).

Fig. 82 - Corpos osmiofílicos no citoplasma e aderidos à superfície de um cloroplasto (c) que mostra a sua estrutura lamelar em desorganização. As mitocôndrias aparecem com porções da sua membrana dissolvida.

Fig. 83 - Agrupamento de mitocôndrias com pequenos pontos osmiofílicos, situadas ao lado de uma inclusão vesiculada (*) e de um peroxissoma (px). No vacúolo observam-se agregados de partículas presumivelmente virais (seta).

azul com um material denso no seu interior. Na oitava semana havia na epiderme numerosas células necrosadas alternando com outras de aspecto normal. Inclusões amorfas, semelhantes àquelas induzidas pelo VMSC-F em infecções simples, ocorriam em algumas células da epiderme do parênquima (Fig. 84, inserção).

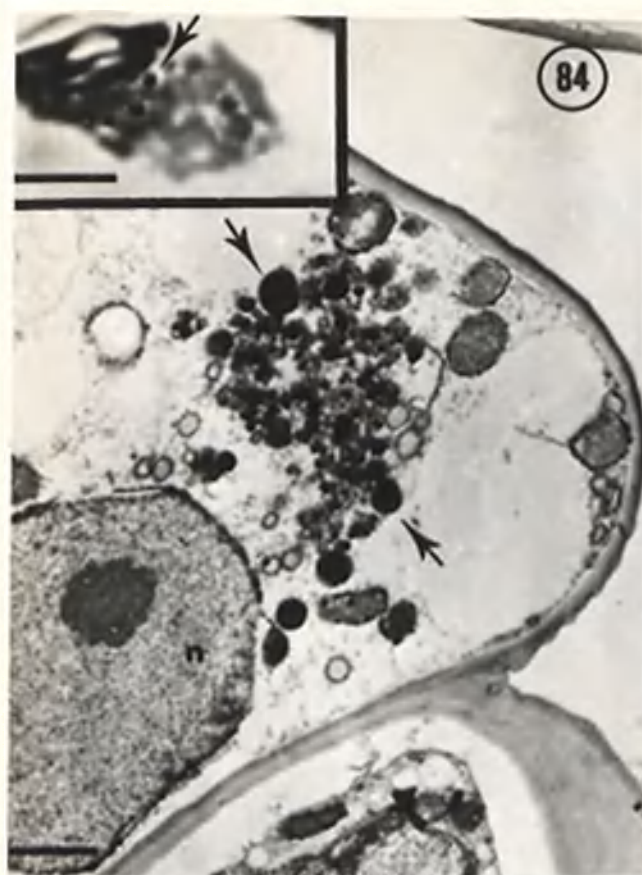
Nas secções ultrafinas apareciam inclusões basicamente semelhantes àquelas causadas pelo VMSC-F, mas com maior quantidade relativa de glóbulos osmiofílicos e com menos vesículas (Fig. 84). Agregados de presumíveis partículas de vírus eram observados no citoplasma e vacúolos de células de todos os tecidos, embora na maioria dos casos, em proporção notavelmente inferior à encontrada em outras combinações que incluíssem o VMSF ou o VMSC-F. Contudo, em nervuras secundárias ocorriam vasos de xilema completamente ocupados por massas de partículas, às vezes dispostas em arranjos semicristalinos (Figs 85 e 86). Nas células do parênquima vascular adjacente, invariavelmente apareciam agregados de partículas no vacúolo e no núcleo (Fig. 87).

A presença de partículas de vírus dentro do núcleo foi raramente constatada em células da epiderme e do parênquima do mesófilo, mas era constante nas células do parênquima vascular vizinhas dos vasos do xilema que continham as massas de partículas (Fig. 87). Os cloroplastos apresentavam alguns grãos de amido e glóbulos osmiofílicos, geralmente pequenos, no entanto a estrutura lamelar aparecia algo desorganizada (Fig. 87). As mitocôndrias mostravam-se de aspecto normal, eventualmente algumas de contorno denso aos elétrons (Fig. 84). Protuberâncias da parede celular contendo plasmodesmata modificados com partículas de vírus, eram observadas com aparência similar àquelas induzidas pelo VMSC-F em infecções simples.

3.3.4. Estudo com o vírus do mosaico amarelo do feijoeiro.

Nas secções semifinas coradas com azul de metileno e azur II os tecidos apresentavam-se sem maiores modificações quando observados ao microscópio de luz, e comparados com tecidos sadios. Porém nas células da epiderme e do parênquima'

Figs. 84-87 - Aspectos citopatológicos da infecção por VMSF e VMSC-F. Fig. 84 - Inclusão citoplasmática na qual observam-se numerosos glóbulos osmiofílicos (setas). Na inserção, um aspecto das inclusões quando vistas ao microscópio de luz, podendo-se discriminar alguns glóbulos osmiofílicos (seta). Fig. 85 - Secção transversal de vasos lenhosos (x), cujo lumen aparece completamente ocupado por massas de partículas presumivelmente virais. Fig. 86 - Detalhe da figura anterior na qual aparecem agregados de partículas, às vezes em arranjos semicristalinos. Fig. 87 - Célula do parênquima vascular em cujo núcleo (n) observam-se agregados de partículas sométricas (seta), ao lado do nucléolo (nu). Na inserção, um detalhe desse agregado de partículas possivelmente virais (seta).

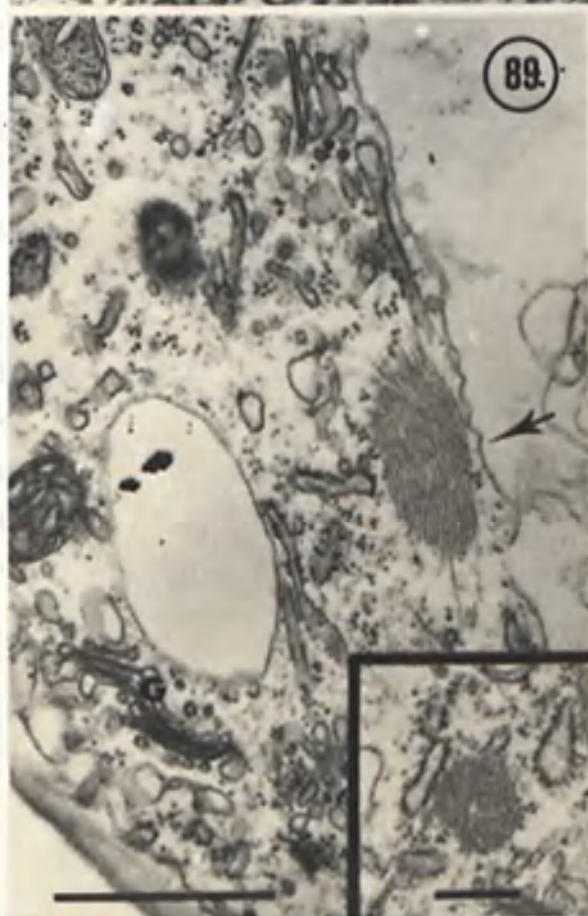
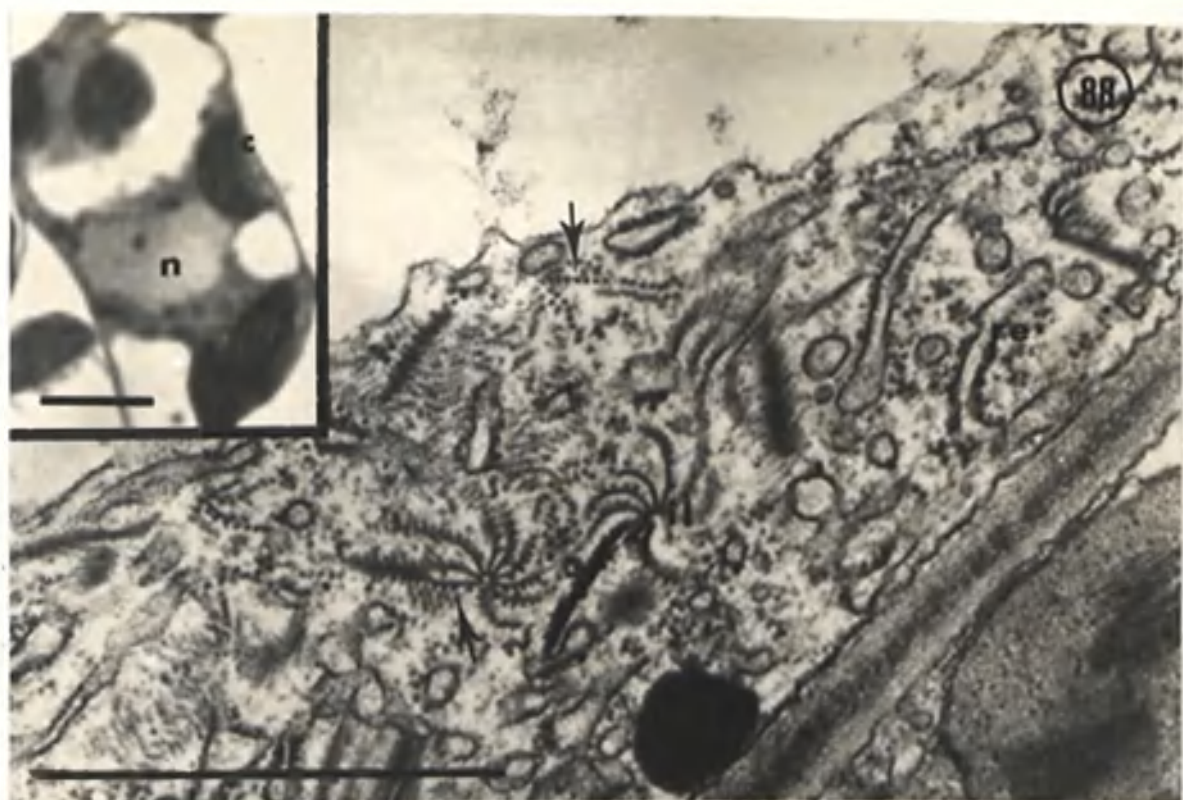


do mesófilo, freqüentemente apareciam inclusões amorfas dentro das quais não era possível distinguir com clareza elementos menores (Fig. 88, inserção). Às vezes o núcleo de algumas células mostrava uma estrutura tingida com a mesma intensidade que o nucléolo, de menor tamanho que este e situada ao seu lado, interpretada como possível inclusão cristalina (Fig. 93, inserção).

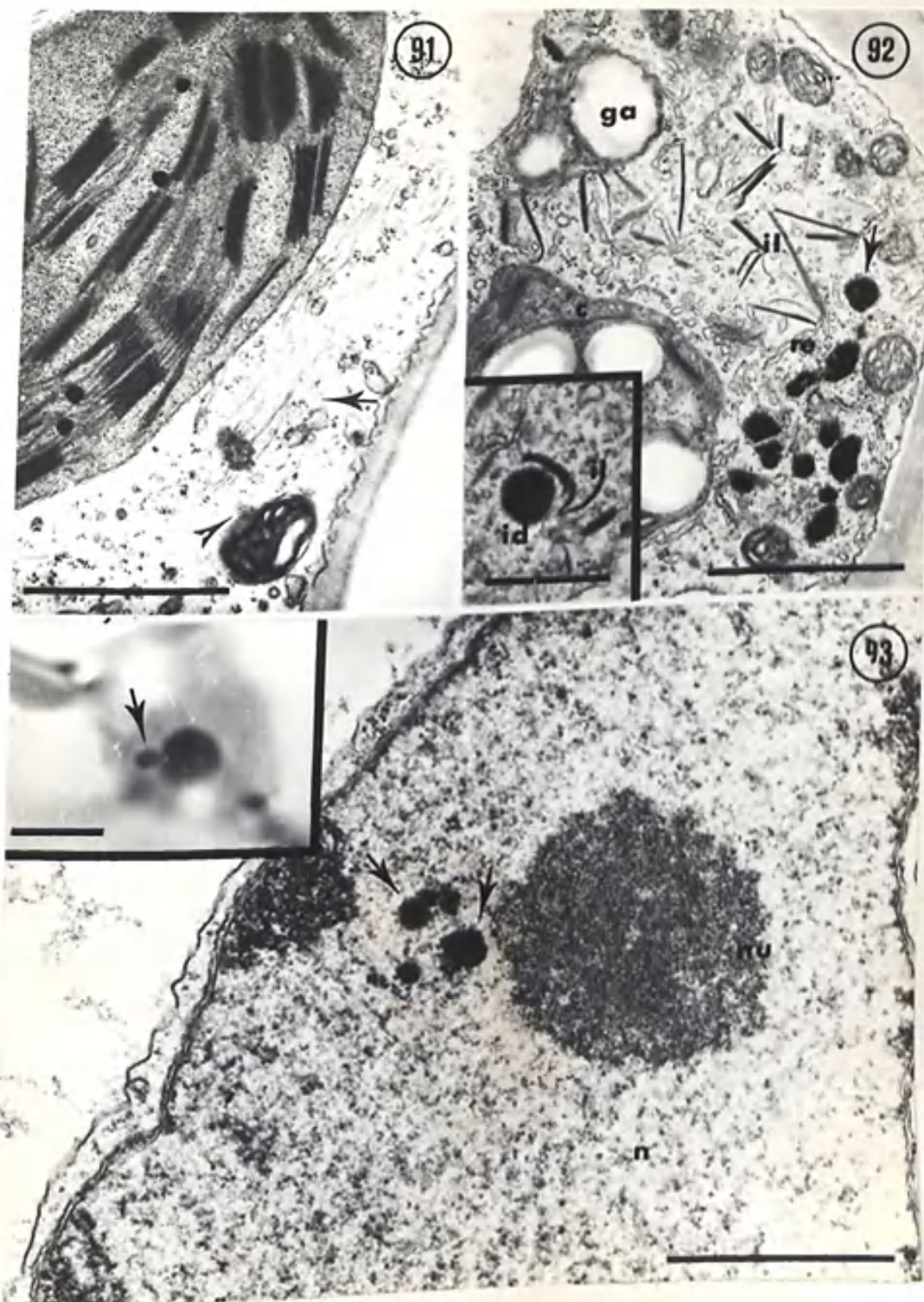
Quando secções ultrafinas eram analisadas ao microscópio eletrônico, visualizavam-se inclusões lamelares e em cataventos, no citoplasma de células da epiderme, do parênquima do mesófilo e do parênquima vascular, geralmente localizadas perto da parede celular (Figs. 88, 90 e 92). Aderidas aos cataventos geralmente ocorriam estruturas circulares densas de 10-12 nm de diâmetro, interpretadas como partículas de vírus seccionadas transversalmente ao eixo (Fig. 88). No citoplasma adjacente a cataventos e lamelas, comumente apareciam partículas de vírus dispostas em feixes de muitas unidades paralelas (Fig. 89), embora também fossem encontrados arranjos incluindo partículas dispostas em dois planos diferentes em ângulo de aproximadamente 30° (Fig. 90). Ocasionalmente ocorreram partículas ligadas a uma estrutura densa e amorfa, ao lado de uma mitocôndria que também exibia partículas perpendicularmente aderidas a sua membrana (Fig. 91). Formando parte das inclusões pareciam com certa regularidade cristais densos de contorno geralmente arredondado, às vezes muito próximos das lamelas (Fig. 92). Todavia vesículas arredondadas e tubulares relacionadas com o aparelho de Golgi, proliferações do retículo endoplasmático, às vezes ligado com o extremo das lamelas, e partículas semelhantes a ribossomas, eram componentes comuns do complexo das inclusões (Figs. 89 e 92).

Cristais densos, pequenos e arredondados apareciam em alguns núcleos geralmente perto do nucléolo (Fig. 93). Exceto aqueles dos estômatos, os cloroplastos eram desprovidos de grãos de amido e mostravam a sua estrutura lamelar praticamente inalterada e alguns glóbulos osmiofílicos de dimensões reduzidas (Fig. 91). As mitocôndrias apareciam normais apenas ocasionalmente com cristas anormalmente desenvolvidas e com pre

Figs. 88-90 - Aspectos citopáticos da infecção por VMAF. Fig. 88 - Inclusões lamelares (il) com presumíveis partículas virais aderidas à sua superfície, vistas em secção transversal (setas). Nas proximidades observam-se ramificações do retículo endoplasmático (re). A inserção é uma micrografia de luz na qual aparece uma zona densa rodeando o núcleo (n), situada entre este e os cloroplastos (c) de uma célula do parênquima lacunoso. Fig. 89 - Feixe de partículas alongadas (seta) no citoplasma. Uma secção transversal das mesmas pode ser apreciada na inserção. Vesículas relacionadas com o aparelho de Golgi (G) podem ser observadas perto da parede celular. Fig. 90 - Inclusões lamelares (il), em secção transversal e longitudinal, neste caso, aparecendo ligadas ao retículo endoplasmático. A seta assinala partículas alongadas dispostas em dois planos.



Figs. 91-93 - Aspectos adicionais da citopatologia da infecção por VMAF. Fig. 91 - Presumíveis partículas virais (seta) no citoplasma de uma célula do parênquima lacunoso, aderidas a uma estrutura amorfa e densa. Outras partículas aparecem na superfície de uma mitocôndria (cabeça de seta). No cloroplasto observam-se pequenos glóbulos osmiofílicos e a sua estrutura lamelar inalterada. Fig. 92 - Célula guarda com numerosas inclusões lamelares (il), algumas com um extremo ligado ao retículo endoplasmático (re). Numerosas inclusões densas aparecem também no citoplasma (seta). Na inserção observa-se uma inclusão densa (id) intimamente relacionada com uma lamelar (il). Fig. 93 - Inclusões nucleares (setas) perto do nucléolo (nu), no núcleo (n) de uma célula do parênquima paliçádico. A inserção mostra uma estrutura densa (seta) ao lado do nucléolo, vista ao microscópio de luz.



sumíveis partículas aderidas a sua membrana (Fig. 91).

3.4. Detecção do VMSC-F e VMSF 'In Vivo' pela técnica da imunomicroscopia eletrônica.

A técnica de detecção de antígenos intracelulares pelo tratamento de secções com anticorpo marcado com ouro coloidal produziu resultados que nem sempre foram consistentes. Houve problemas freqüentes de contaminação e falta de marcação específica, provavelmente em parte devido a idade do anticorpo marcado com ouro coloidal. Mesmo assim em alguns casos favoráveis houve nítida marcação específica.

Em tecidos infectados com o VMSC-F e tratados com anticorpo anti VMSC-F, houve marcação sobre agregados de partículas do vacúolo, mas não sobre outras estruturas (Fig. 94). No caso do VMSF, o método resultou em marcação de partículas intranucleares, mas a mesma foi mais discreta sobre as presumíveis partículas presentes no citoplasma e vacúolo (Figs. 95 e 96).

Em infecções mistas com VMSF e VMSC-F, o tratamento com antissoro contra VMSC resultou na marcação apenas dos agregados de partículas do vacúolo mas não sobre as partículas intranucleares. Quando tratados com antissoro para VMSF, houve marcação nas partículas intranucleares. Neste caso a marcação sobre as partículas citoplasmáticas e do vacúolo foi mais errática. Nos testes de controle não houve nenhuma reação específica (Fig. 97).

Figs. 94-95 - Aspectos de secções ultrafinas de tecidos enfermos, tratadas com anticorpos marcados com ouro coloidal. Fig. 94 - Marcação positiva com ouro coloidal sobre grupos de partículas no vacúolo (setas); após tratamento com anticorpo contra VMSC-F, de células infectadas com VMSC-F. Fig. 95 - Marcação positiva com ouro coloidal sobre grupos de partículas intranucleares, em células infectadas com VMSF. Fig. 96 - Similar à figura anterior, mas sobre grupos de partículas no citoplasma (seta). Fig. 97 - Marcação inespecífica (setas) em uma secção ultrafina de tecido infectado com VMSC-F, tratada com antissoro para VMSF marcado com outro coloidal.

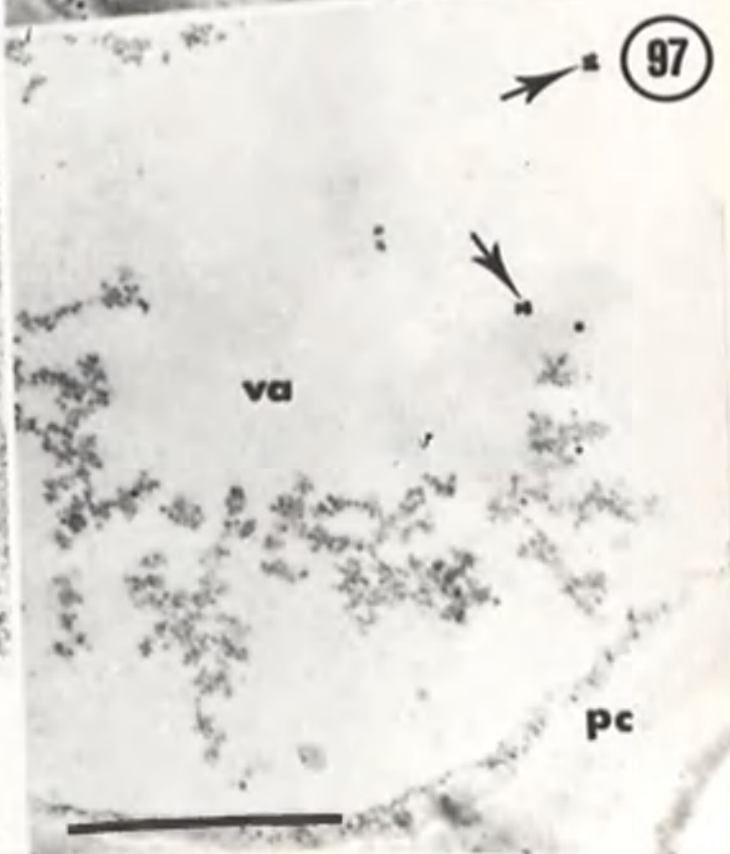
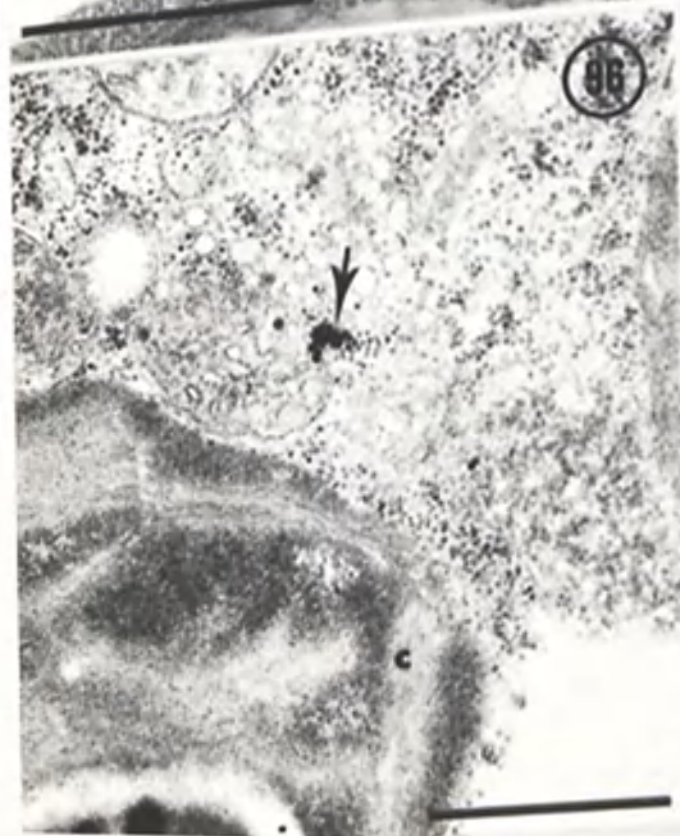
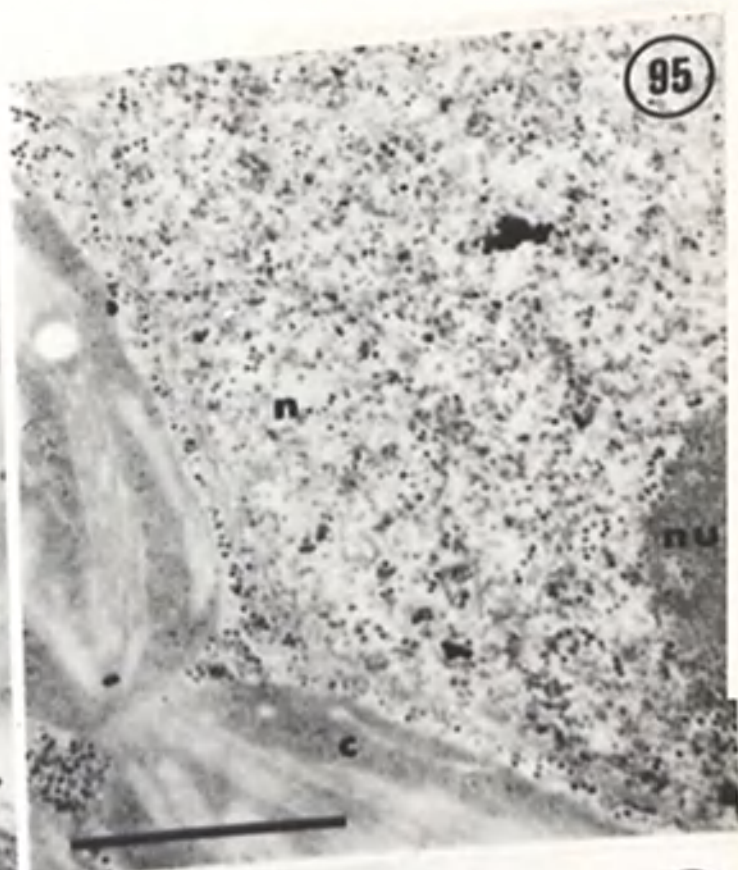
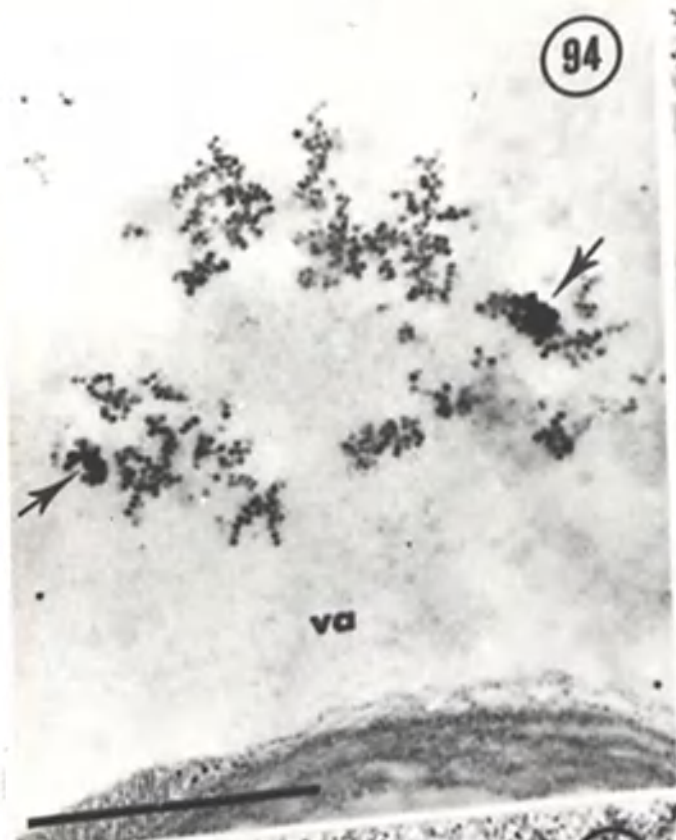


Tabela 2

LOCALIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS EM CÉLULAS E TECIDOS

VÍRUS (a)	EPIDERME E PARÊNQUIMA (do mesófilo e vascular)				VASOS CRIVADOS E DO XILEMA
	CITOPLASMA	VACÚOLO	TÚBULOS E PLASMODESMOS	NÚCLEO	
VMAF	L,A (b)	-	-	-	-
VMCF	L,U	-	-	-	-
VMDeF	C	-	-	-	-
VMSF	L,A,C	L,A,C	-	L,A	L
VMSC-F	L	L,A	U	-	L,A
VMCF + VMDeF	L,U C	U -	- -	-	-
VMCF+	L,U	U	-	-	-
VMSF	L,C	L,A	-	L,A	L
VMCF+	L,U	-	-	-	-
VMSC-F	L	L,A	U	-	L,A
VMDeF+VMSF	L,A,C	L,A	U	L,A	L,A
VMDeF+VMSC-F	L,A,C	L,A,C	U	-	L,A
VMSF+VMSC-F	L,A	L,A	U	L,A	L,A,C

(a): VMAF= vírus do mosaico amarelo do feijoeiro; VMCF = vírus do mosaico comum do feijoeiro;
 VMDeF = vírus do mosaico em desenho do feijoeiro; VMSF = vírus do mosaico do sul do feijoeiro;
 VMSC-F = vírus do mosaico severo do caupi-isolado do feijoeiro.

(b): A = partículas em agregado; C = partículas em cristais; L = partículas livres;
 U = partículas em arranjos unisseriados.

Tabela 1

TIPOS E LOCALIZAÇÃO DAS INCLUSÕES INDUZIDAS POR VMAF EM INFECÇÕES
SIMPLES E POR VMCF, VMDeF, VMSF E VMSC-F EM INFECÇÕES SIMPLES E MISTAS

VÍRUS (a)	INCLUSÕES CITOPLASMÁTICAS						INCL. NUCLEARES
	lamelares	cristais de vírus	outros cristais	vesiculadas	fibrilares	glóbulos osmiofílicos	
VMAF	++ (b)	-	++	-	-	-	+
VMCF	++	-	-	-	-	-	-
VMDeF	-	++	++	+	-	-	-
VMSF	-	+	-	-	-	-	-
VMSC-F	-	-	-	++	++	++	-
VMCF+VMDeF	++	++	+	++	-	-	-
VMCF+VMSF	++	+	-	-	-	-	-
VMCF+VMSC-F	++	-	-	++	++	++	-
VMDeF+VMSF	-	++	++	++	-	-	++
VMDeF+VMSC-F	-	++	+	++	++	++	-
VMSF+VMSC-F	-	+	-	++	+	++	-

(a): VMAF= vírus do mosaico amarelo do feijoeiro; VMCF = vírus do mosaico comum do feijoeiro;
VMDeF= vírus do mosaico em desenho do feijoeiro; VMSF= vírus do mosaico do sul do feijoeiro;
VMSC-F= vírus do mosaico severo do caupi-isolado do feijoeiro.

(b): ++= abundantes; + = poucas - = ausentes

4-DISCUSSÃO

A infecção das amostras com cada vírus utilizado neste estudo foi adequadamente comprovada não só pelas reações causadas nas plantas hospedeiras, como também pelo exame de preparações "leaf-dip", nas quais partículas alongadas do VMCF e do VMAF, e isométricas dos VMDeF, VMSF e VMSC-F eram facilmente detectáveis. Esta constatação foi completada pelos testes sorológicos.

O exame de secções histológicas, quer ao microscópio de luz de cortes semifinos, quer ao microscópio eletrônico de secções ultra-finas, vieram a confirmar a identidade desses vírus, revelando aspectos citopatológicos característicos a cada um deles, em geral similares aos já relatados na literatura. Contudo, pôde-se no presente trabalho demonstrar alguns detalhes adicionais nas infecções individuais e notadamente nas mistas. Um resumo das observações gerais pode ser apreciado nas tabelas 1 e 2.

4.1-Infecções Simples

4.1.1-Vírus do mosaico comum do feijoeiro

As alterações celulares observadas no tecido foliar de feijoeiro infectado pelo VMCF, tanto ao microscópio de luz como ao eletrônico foram essencialmente iguais às aquelas relatadas anteriormente (Edwardson, 1966; 1974; Camargo *et al.*, 1969). Tais modificações incluem a presença abundante de inclusões lamelares no citoplasma características dos potyvírus, cujos agregados são perfeitamente visíveis, mesmo ao microscópio de luz. Essas inclusões lamelares adquirem nas secções ultra-finas configurações variadas e tridimensionalmente formam estruturas tubulares, correspondendo segundo a classificação de Edwardson (1974) ao subgrupo I. Além disso foram notados arranjos uniseriados de partículas alongadas, presumivelmente virais, dispostas na parte interna do tonoplasto, muitas vezes em finas projeções citoplasmáticas no vacúolo. O significado deste ar

ranjo não está claro e o fenômeno é comum a muitos outros potyvirus. As observações feitas em tecidos com diferentes tempos de infecção, não revelaram diferenças significativas quanto à quantidade e localização das inclusões lamelares, tendo-se notado contudo, que ocorria maior número de partículas alongadas dispersas no citoplasma em amostras com duas e três semanas de infecção. Em outros potyvirus, como por exemplo "Sweet potato russet crack", tem sido relatada certa variação na localização das inclusões lamelares nas fases iniciais da infecção, a tempos inferiores a duas semanas (Hollings & Brunt, 1981).

Uma certa proliferação e ramificação do retículo endoplasmático, notada com frequência neste trabalho com VMCF, não parece ser muito comum a outros vírus. Numa ilustração do aspecto celular da infecção por um isolado do VMCF obtido de ervilha, nota-se este fenômeno (Kitajima, 1979). Também em ervilha infectada pelo "pea seed-borne virus", Hampton *et al.* (1973) descrevem alteração similar. Esta modificação talvez esteja relacionada com o aparecimento de vesículas em certas áreas citoplasmáticas, muito comum em infecções com um grande número de vírus de diferentes morfologias, e possivelmente relacionado com a replicação do ácido nucleico viral (Shepardson *et al.* 1980). Essas vesículas contudo costumam aparecer associadas ao complexo de Golgi, fato este também observado no presente estudo, como está bem ilustrado na descrição dos aspectos citopatológicos do "pokeweed mosaic virus", um outro potyvirus (Kim & Fulton, 1969).

Uma característica marcante foi as dimensões avantajadas dos grãos de amido nos cloroplastos do parênquima do mesófilo de folhas infectadas pelo VMCF, significativamente maiores que as observadas nas infecções pelos outros vírus aqui estudados. Não há contudo menção de tal anomalia nas descrições prévias dos aspectos citopatológicos do VMCF, e que deve estar relacionada com a dificuldade na translocação dos produtos fotossintéticos.

Pesquisas utilizando cultivares diferenciais -

permitiram discriminar vários grupos de estirpes do VMCF (Drijfhout, 1978), e o isolado usado neste trabalho corresponde ao grupo II (Costa, 1983). Nos trabalhos anteriormente publicados sobre aspectos histológicos da infecção pelo VMCF não há detalhes sobre qual foi o isolado usado, muito embora não haja diferenças significativas entre eles. Contudo, seria interessante fazer uma comparação crítica dos aspectos citológicos da infecção por esses vários isolados para se detectar eventuais diferenças de valor diagnóstico.

4.1.2-Vírus do mosaico amarelo do feijoeiro

A literatura é bem mais rica em descrições de vários aspectos da biologia do VMAF do que o VMCF, inclusive as suas relações com a célula invadida, e isto se deve ao fato de aparentemente o VMAF ter uma distribuição geográfica maior e porque a maioria dos seus isolados induz uma inclusão intranuclear característica (Moeller & Koenig, 1965). Tais inclusões variam em tamanho e quantidade, havendo mesmo alguns isolados do VMAF que não as produzem. Este fato foi usado por esses autores para detecção do fenômeno da proteção cruzada entre estirpes do vírus, baseados na observação dos cristais ao microscópio de luz. O isolado paranaense do VMAF aqui estudado, causou o aparecimento de pequenos e pouco numerosos cristais intranucleares detectáveis mesmo ao microscópio de luz, similares àqueles induzidos pelo isolado do gladiolo de Moeller & Koenig. No trabalho de Camargo *et al.* (1968) com um isolado de Campinas do VMAF, não foram encontrados esses cristais, o que sugere uma diferença entre aquele e o do Paraná.

As diferenças nas propriedades biológicas encontradas por Bianchini (comunicação pessoal) no isolado do VMAF do Paraná, em relação ao VMCF, foram confirmadas não só pela presença das inclusões intranucleares, mas também pelo tipo das abundantes inclusões lamelares citoplasmáticas. Conforme já previamente descrito na literatura (Edwardson, 1966; 1974; Camargo *et al.*, 1969), essas inclusões seriam pertencentes ao

subgrupo II de Edwardson que se diferenciam daquelas do VMCF pelo fato de as lamelas tenderem a se justaporem, formando camadas densas, lineares, raramente curvas e nunca em túbulos. Frequentemente as presumíveis partículas virais apareciam aderidas à sua superfície como descrito para o VMAF (Kamei *et al*, 1969). Além das lamelas apareceram no citoplasma inclusões densas cuja natureza proteica foi demonstrada citoquimicamente - por Weintraub & Ragetli (1968). Estas foram especialmente abundantes nas células guardas dos estômatos, e pareciam possuir certa relação com o complexo de Golgi. Sua relação com a infecção contudo não se acha explicada.

Como um exemplo adicional de associação de partículas virais com a superfície de organelas, foram encontradas ocasionalmente partículas alongadas aderidas longitudinalmente à superfície de mitocôndrias tal como descrito com o "henbane mosaic virus" (Kitajima & Lovisolo, 1972). Fenômeno similar foi observado por Kitajima e Costa (1973) em lesões de *Chenopodium quinoa* Wild, mas envolvendo cloroplastos. É possível que esse tipo de interação decorra de relações entre cargas superficiais das partículas virais e da membrana das organelas. Este isolado do VMAF do Paraná não induziu proliferação de membranas ou hipertrofia de mitocôndrias, como relatadas para um isolado de Piracicaba (Kitajima & Costa, 1974).

As diferenças citopatológicas nas infecções do VMCF e do VMAF são suficientes, muito embora ambos sejam morfologicamente indistinguíveis e sorologicamente relacionados, para permitirem sua discriminação com relativa facilidade e é um exemplo marcante da utilidade dos estudos da ultra-estrutura da infecção que produzem informações para permitir uma rápida diagnose de certas enfermidades virais de feijoeiro.

4.1.3-Vírus isométricos

Os três vírus isométricos de feijoeiro aqui investigados, respectivamente VMDeF, VMSF e VMSC-F são morfologicamente indistinguíveis. Sintomatologicamente eles podem ser

identificados sob condições experimentais controladas, mas no campo isto usualmente torna-se difícil. Preparações "leaf dip" também não servem para distingui-los, sendo a sorologia o melhor método para fazer uma rápida diagnose. Do ponto de vista citológico existem alterações peculiares a cada um desses vírus, cujo conhecimento pode auxiliar na diagnose.

Um dos problemas fundamentais nesses estudos citológicos tem sido a identificação dos virions *in situ*. Em geral as partículas virais de diâmetro na faixa de 20-30 nm se confundem com ribossomas, e somente são nitidamente distinguíveis destes quando ocorrem em agregados cristalinos ou não, ou dispersos em áreas isoladas do citoplasma ou vacúolo, ou ainda quando ocorrem nos elementos dos vasos. Também a presunção de que tais partículas representem as do vírus é baseada meramente em critérios morfológicos e da sua ausência em tecidos sadios. No presente estudo, pelo menos com relação ao VMSF e ao VMSC-F, para os quais se dispunha de antissoro bastante específicos, pôde-se, pelo uso da técnica do anticorpo conjugado ao ouro coloidal em secções, obter fortes evidências de que tais partículas seriam de fato de natureza viral, vindo portanto a confirmar o critério morfológico. Apesar de algumas dificuldades existentes com essa técnica, em condições favoráveis, houve significativa marcação com ouro coloidal, sobre grupos de partículas no vacúolo, citoplasma ou mesmo no núcleo no caso do VMSF. Estes resultados concordam com os obtidos por Hatta e Franck (1981), que identificaram partículas do VMSF trabalhando com técnicas citoquímico-enzimáticas.

A seguir discutiremos os aspectos citológicos da infecção por esses vírus isométricos notados no presente trabalho.

4.1.3.1-Vírus do mosaico em desenho do feijoeiro

O aparecimento de formações cristalinas de partículas tidas como virais, bem como de outra formação cristalina, menos densa, possivelmente de material protéico, são caracte-

terísticas descritas anteriormente para o VMDeF (Camargo, 1973) e para o vírus do mosaico rugoso do feijoeiro, estirpe A₁, de Guatemala (Kitajima *et al.*, 1974), que são por sinal proxima-mente relacionados do ponto de vista sorológico (Lin *et al.*, 1986). Embora não referido por Camargo (1973), notou-se neste trabalho o aparecimento de inclusões laminadas, densas aos ele-trons nas extremidades de alguns cloroplastos, algo similares àquelas descritas por Kitajima *et al.* (1974), para o VMRF e que possivelmente estavam relacionadas com a desorganização desta organela e o conseqüente aparecimento de áreas cloróticas na folha. Outra alteração no cloroplasto ainda não mencio-nada para o VMDeF foi a produção de profundas invaginações, a-barcando grandes porções do citoplasma e até mitocôndrias. Contudo isto não é peculiar ao VMDeF, tendo já sido notado na infecção por vários outros vírus, como o do mosaico do fumo em tomateiro (Shalla, 1964) e mesmo no feijoeiro, pelo VMSF (Wein-traub & Ragetli, 1970).

Embora sendo comovirus, o VMDeF não induziu as projeções da parede celular em direção ao citoplasma, e tão pouco estruturas tubulares contendo presumíveis partículas vi-rais. Por outro lado, como a grande maioria dos comovirus e outros vírus, a infecção pelo VMDeF induziu o aparecimento de áreas extensas do citoplasma ricas em vesículas, possivelmente relacionadas com a síntese do material nucleico do vírus, cons-tituindo-se numa das indicações mais óbvias da presença de in-fecção viral.

4.1.3.2-Vírus do mosaico do sul do feijoeiro

Weintraub & Ragetli (1970) fizeram no Canadá um estudo comparativo detalhado dos aspectos citológicos da infecção por duas estirpes do VMSF, respectivamente do caupi e do feijoeiro, ao longo do processo de infecção. Presumíveis par-tículas virais foram notadas no citoplasma, vacúolo e núcleo. Formações cristalinas de partículas virais foram notadas, con-tudo, apenas para o isolado do caupi até cerca de 19 dias após a infecção, não se detectando posteriormente. Na estirpe do

feijoeiro, tais cristais não são aparentes (Weintraub & Ragetli, 1970; de Zoeten & Gaard, 1969), embora tenham sido notados arranjos paracrystalinos nos vasos do floema.

O isolado do VMSF usado neste trabalho teve um comportamento similar ao da estirpe de feijoeiro, estudada por Weintraub & Ragetli. Contudo, a partir da sexta semana da infecção, foram notados agregados cristalinos tanto no parênquima do mesófilo como na região vascular e nos próprios vasos. A formação dos cristais não teria relação com a concentração do vírus, pois as partículas presumivelmente virais foram muito mais conspícuas e numerosas ao redor da segunda semana de infecção, ocorrendo em enormes massas no citoplasma, especialmente em evaginações em direção ao vacúolo, e também no interior deste. Alias, essas evaginações poderiam representar estágios intermediários num processo de eliminação das partículas do vírus do citoplasma para o vacúolo. Essas observações morfológicas a respeito da concentração viral nas células são de acordo com os testes de inoculação, quando a concentração máxima de vírus no suco da planta infectada se dá ao redor dos 15 dias após a inoculação (Sehgal, 1981).

Deve-se salientar que a presença de partículas em arranjos para ou semi-cristalinos em células epidermais colapsadas não foi relatada nos estudos anteriores com o VMSF. A ocorrência de partículas nos vasos do xilema sugere que eles possam representar uma via adicional de translocação deste e de outros vírus a longas distâncias na planta infectada, um fenômeno bem demonstrado nos clássicos experimentos de Schneider & Worley (1959), nos quais o VMSF inoculado por enxertia ou injeção em feijão "Pinto" movia-se para cima ou baixo de porções do caule, morto por exposição ao vapor. Contudo, a mera presença de partículas não significa necessariamente que elas estão sendo transportadas, pois podem representar apenas remanescentes da célula do vaso após sua morte, permanecendo aberta a questão de como essas partículas conseguiriam invadir outras células, uma vez que não haveria normalmente conexões entre vasos do xilema e células adjacentes vivas.

De Zoeten & Gaard (1969) produziram evidências sugestivas da passagem de partículas virais através do poro nuclear. Neste trabalho em alguns cortes tangenciais à superfície nuclear foram notados poros com partículas semelhantes às do vírus, mas o mesmo não foi possível nas secções transversais, ficando portanto aberta a questão sobre a natureza dessas partículas.

As demais alterações notadas tais como cloroplastos e mitocôndrias invaginados, proliferação do retículo endoplasmático e zonas citoplasmáticas ricas em vesículas já haviam sido assinaladas por Weintraub & Raetli (1970). A elas pode se juntar a presença de um material cristalino no cloroplasto, que parece ser peculiar ao presente isolado. Com relação a um isolado do VMSF descrito na Colômbia (Jayashinge, 1982), este do Distrito Federal parece diferir significativamente, ao menos do ponto de vista citopatológico. Este isolado colombiano não induziu formações cristalinas; poucas partículas virais foram detectadas apenas no vacúolo e as organelas celulares permaneceram praticamente inalteradas. Os exames ao microscópio de luz de células epidermais de folhas infectadas com o isolado colombiano apenas revelaram grânulos densos no vacúolo, enquanto o isolado do Distrito Federal induzia a aparição de zonas diferenciadas no núcleo e no citoplasma, nas secções semifinas.

4.1.3.3-Vírus do mosaico severo do caupi isolado do feijoeiro

O aspecto citopatológico do feijoeiro infectado pelo VMSC-F, foi similar aos anteriormente relatados para outros isolados do VMSC no que tange à presença de inclusões citoplasmáticas, bem como o conteúdo do xilema fortemente cromófilo (Christie & Edwardson, 1978). Em cortes semi-finos foi também possível distinguir glóbulos osmiofílicos de possível natureza lipídica. Sua detecção consistente associada a infecção pelo VMSC-F mas não a outros vírus estudados neste trabalho, sugere seu eventual valor diagnóstico, pelo menos nas fases iniciais da infecção, porquanto após a terceira semana seu nú

mero reduz-se consideravelmente.

Do ponto de vista ultraestrutural, os efeitos citopáticos observados em tecidos de feijoeiro infectados pelo VMSC-F correspondem em geral àqueles mencionados na literatura para outros isolados do VMSC. Uma das peculiaridades do VMSC que o faz distinguir do VMCP é o aparecimento de um agregado fibrilar, produzindo inclusões de tamanho variado, de aspecto fibroso, e que podem atingir dimensões consideráveis (Camargo, 1973). Isto tem sido notado em todos os isolados do VMSC, embora parece haver certa variação quantitativa entre os diferentes isolados (Kitajima *et al.*, 1983). Na infecção com o VMSC-F as inclusões fibrosas são mais discretas, ocorrendo junto às massas de vesículas, inclusive tornando-se mais difíceis de serem encontradas nas fases mais avançadas da infecção. A natureza proteica deste material ficou bem evidenciada nos trabalhos de Camargo (1973), mas o seu papel no processo de infecção pelo VMSC é ainda obscuro.

Os glóbulos osmiofílicos detectáveis mesmo nos cortes semi-finos possivelmente compõem-se de lipídios e proteínas. Estruturas similares acham-se relatadas, associadas às infecções com outros comovirus, tendo sido postulada sua origem citoplasmática dirigindo-se junto a parede celular, transformando-se depois em corpos mielínicos os quais, por sua vez, estariam relacionados com o aparecimento de estruturas tubulares contendo vírions (Kim *et al.*, 1974). Contudo no presente trabalho não se notaram estruturas internas nestes glóbulos e tão pouco sua possível origem associada à parede celular. Verificou-se sua sensível redução nas fases mais tardias da infecção em contraposição ao aumento dos grãos de lípidios no citoplasma, não tendo sido possível encontrar uma relação entre esses dois fatos. Como no presente caso foram observadas quantidades apreciáveis de glóbulos osmiofílicos e de túbulos contendo vírions perto da parede celular, simultaneamente, parece improvável haver relação entre essas duas estruturas como sugerido por Kim *et al.*, (1974) para outros comovirus.

Agrupamentos de mitocôndrias comumente observados em células infectadas pelo VMSC-F já haviam sido assinalados por Camargo (1973). Kitajima *et al.* (1983) nos seus estudos comparativos de diferentes isolados e sorotipos do VMSC notaram essa agregação paralela de mitocôndrias e que parece ser particularmente conspícua com o isolado do feijoeiro.

Massas de partículas isométricas, observadas no vacúolo, suficientemente grandes, para serem detectáveis ao microscópio de luz, devem representar agregado de vírions pois produziram marcação consistente com ouro coloidal nos testes de imunomicroscopia eletrônica. A mais provável via de acesso das partículas virais ao vacúolo parece ser através da evaginação do tonoplasto carregando consigo grupos de vírions, como sugerido a vários outros vírus isométricos.

4.2-Infecções Mistas

Investigações ao nível ultraestrutural sobre infecções mistas têm sido esparsas na literatura. Algumas delas relatam estudos feitos em plantas naturalmente infectadas por dois ou mais vírus, muitas vezes não havendo identificação definitiva de um deles. Estes relatos em geral limitam-se a assinalar a presença simultânea numa mesma célula de vírus distintos. Contudo, merece destaque uma publicação recente de Carr & Kim (1983), na qual há descrição detalhada da citopatologia da infecção mista pelos VMAF com o VMCP ou com o VMSC, sendo o fato mais notável um arranjo íntimo entre as partículas alongadas do VMAF com as isométricas de ambos comovírus; fenômeno similar foi constatado numa infecção mista, em condições naturais, com os vírus do mosaico da abóbora e do mosaico da melancia (Kitajima, dados não publicados)

4.2.1-Vírus do mosaico comum do feijoeiro e vírus isométricos

Não se notou como no caso do VMAF e VMSC (Carr & Kim, 1983), associação íntima entre as partículas alongadas do VMCF e as isométricas do VMDeF, VMSE ou VMSC-F, embora ocorressem na mesma célula os dois tipos de partículas, nas combi

nações com VMSF e VMSC-F. No caso do arranjo VMCF e VMDeF, as inclusões lamelares do VMCF nunca foram encontradas nas células contendo os agregados cristalinos do VMDeF, estas ocorrendo em áreas citoplasmáticas vesiculadas significativamente menores do que aquelas das infecções simples pelo VMDeF. Este arranjo, por sinal, foi um dos que menor influência tivera na redução foliar e da produção da cv. Rosinha G-2 (Costa, 1983). Também deste arranjo resultaram algumas alterações não detectadas na infecção simples pelos componentes, como as vesículas periféricas nos cloroplastos, derivadas de invaginações da membrana interna, semelhantes ao relato de Mc Mullen *et al.* (1978) na infecção por uma estirpe do "barley stripe mosaic virus" em cevada. O aparecimento de mitocôndrias alongadas e deformadas notado neste arranjo é similar ao descrito na infecção pelo "radish mosaic virus" (Honda & Matsui, 1972).

Os efeitos citopáticos drásticos encontrados no arranjo VMCF e VMSF teriam relação com o efeito sinérgico em termos de redução de produção e porte da planta, incluindo área foliar, observado por Costa (1983). Nas células infectadas destacava-se a presença de grande quantidade de inclusões lamelares do VMCF, muitas vezes associadas a partículas isométricas do VMSF, e particularmente, o aparecimento em quantidade significativamente maior que na infecção simples pelo VMCF, de delgadas projeções citoplasmáticas contendo arranjos uniseriados de partículas alongadas, detectáveis mesmo ao microscópio de luz. Houve acentuado aumento no número de formações cristalinas do VMSF, particularmente conspícuas nas células e pidermais e dos tricomas, de maneira semelhante àquela descrita para a estirpe caupi do VMSF (Weitraub & Raetli, 1970). As estruturas cristalinas, não virais, encontradas em certos núcleos de células e pidermais são essencialmente similares àquelas assinaladas em feijoeiro sadio (Wergin *et al.*, 1970), tanto no núcleo como no citoplasma adjacente. É possível que a infecção pelo arranjo VMCF e VMSF exacerbe o aparecimento desta estrutura normal.

Embora o arranjo VMCF e VMSC-F não houvesse in

duzido significativo efeito na redução da área foliar, foi o segundo em importancia, em termos de redução de produtividade do feijoeiro (Costa, 1983). Houve um significativo aumento no número de partículas isométricas detectáveis em relação a infecção simples pelo VMSC-F, e também, surgiram deformações em organelas como mitocôndrias e cloroplastos não observadas nas infecções simples pelos componentes desta combinação.

4.2.2- Infecções mistas por vírus isométricos

O arranjo VMDeF e VMSF foi o que provavelmente mais efeitos sinérgicos causou nas células infectadas, e que também resultou em drásticas reduções da área foliar e em rendimento do feijoeiro (da Costa, 1983). As estruturas tubulares contendo partículas virais em seu interior entre a plasmalemma e parede celular e também nas protuberâncias das paredes celulares, não foram detectadas em infecções individuais dos componentes deste arranjo. Este tipo de alteração é muito comum em comovirus (Kim & Fulton, 1971; 1973), e possivelmente está ligada ao VMDeF, embora este não pareça induzir seu aparecimento em infecções simples (Camargo *et al.*, 1976), nem em combinação com o VMCF ou com o VMSC-F. O significado desses túbulos não está bem claro, podendo representar estruturas relacionadas à translocação célula a célula dos vírions ou um mecanismo de defesa da célula para exatamente dificultar isso (Martelli, 1982). Também a frequente aparição de corpos paramurais, isto é, estruturas membranosas formadas de túbulos ou vesículas agregadas entre a plasmalemma e a parede celular, foi típico deste arranjo, e possivelmente teria relação direta com a formação das protuberâncias das paredes celulares. Tais estruturas foram descritas por Favali *et al.* (1978), na infecção de *Nicotiana glutinosa* L pelo TMV, como sendo o primeiro sintoma da infecção ao nível celular. Em infecções simples com o VMDeF há o aparecimento de dois tipos de inclusões cristalinas no citoplasma: uma densa formada de vírions e outra menos densa, de natureza proteica (Camargo, 1973). Na infecção mista por VMDeF e VMSF, uma inclusão similar a este segundo tipo de

inclusão citoplasmática foi encontrada também no núcleo. É possível que a infecção em conjunto com o VMSF induza perturbações na distribuição do material que forma esta inclusão que terminaria por penetrar no núcleo, juntamente com os vírions do VMSF e/ou precursores dos mesmos.

Afora essas alterações, aparentemente há uma exacerbação na replicação do VMDeF pois a quantidade das duas estruturas cristalinas induzidas por este vírus no citoplasma, juntamente com as áreas vesiculadas foi significativamente maior que na infecção simples.

A infecção mista envolvendo VMDeF e VMSC-F, por outro lado, foi a que menos efeito teve no aspecto exterior da planta infectada (Costa, 1983). Aparentemente a presença do VMSC-F interferiu no processo replicativo do VMDeF, a julgar pela escassez das alterações produzidas por este vírus, embora aquelas causadas pelo VMSC-F ocorressem no níveis normais de uma infecção simples ou até maior. Talvez o fato de ambos pertencerem a um mesmo grupo taxonômico e terem relações sorológicas, ainda que distantes (Lin *et al*, 1981 b), resultasse numa interferência do VMSC-F sobre o VMDeF. Outras alterações notadas nas organelas como cloroplastos e mitocôndrias não podem ser consideradas como específicas, pois há descrições similares na literatura para infecções por outros vírus.

Finalmente, o arranjo VMSF e VMSC-F talvez tenha sido o que menos alterações citopáticas tenha causado, pelo menos na cv. Rosinha G-2, e que em última análise parece refletir em menores danos externos. Apenas o que chamou a atenção foi a presença de numerosos corpos osmiofílicos no citoplasma.

Os aspectos citopatológicos causados individualmente pelos cinco vírus de feijoeiro aqui estudados, permitem, até com certa facilidade, a identificação do vírus causador, e portanto, são um critério auxiliar nos trabalhos de diagnose. Muito embora tenham sido notadas variações no padrão de tais alterações quando se comparam estirpes ou isolados de um dado vírus, estas aparentemente não são significativas para compro

meter tal diagnose. Por outro lado, o estudo comparativo da infecção mista por quatro desses vírus revelou que é possível também identificar os componentes das misturas aos pares, principalmente porque via de regra, ambos podem ocorrer na mesma célula, induzindo suas alterações características. Apenas em alguns casos houve um efeito sinérgico, com o aparecimento de estruturas ausentes nas infecções individuais, mas o conhecimento de sua presença constitui-se em outro argumento para a diagnose. Apenas na mistura VMDeF e VMSC-F, ambos comovírus e com distante relacionamento sorológico, houve supressão significativa de modificações induzidas pelo VMDeF, o que poderia dificultar o reconhecimento de sua presença.

Assinale-se que houve em geral, certa correlação entre intensidade dos efeitos citopáticos, seja em infecções simples ou mistas, e a redução da área foliar e da produtividade na cv. Rosinha G-2, determinadas por Costa (1983).

Obviamente este trabalho apenas descobriu o topo de uma vasta problemática, ainda não adequadamente explorada que é o das infecções mistas com implicações em sinergismo, interferência, mascaramento genômico, produtividade, transmissibilidade, etc. A exiguidade do tempo não permitiu analisar combinações mais complexas, e também envolver outros parâmetros, principalmente a análise quantitativa da concentração dos vírus componentes da mistura ao longo do processo da infecção.

5-RESUMO

As doenças virais são uma das causas da queda no rendimento de feijão no Brasil. Na região Centro Oeste, quatro vírus são de ocorrência comum: VMCF, VMDeF, VMSF e VMSC-F. Tendo em vista o fato de terem começado a se produzirem naturalmente infecções mistas com esses vírus, realizou-se um estudo comparativo da citopatologia induzida por eles. Secções semifinas e ultrafinas de folhas de feijoeiro da cv. Rosinha G-2, infectadas individualmente com esses vírus e com pares dos mesmos foram analisadas sob microscopia de luz e eletrônica. O VMAF, um potyvírus comum em outras regiões do Brasil, também foi incluído no estudo de infecções simples. Os efeitos citopáticos produzidos por todos os cinco vírus em infecções simples foram similares aos relatados previamente na literatura, com algumas poucas diferenças. Nos tecidos infectados com VMCF apareceram inclusões lamelares (cataventos e túbulos) no citoplasma, proliferações do retículo endoplasmático e partículas alongadas, presumivelmente virais, esparsas no citoplasma ou em arranjos unisseriados, os que às vezes projetavam-se dentro do vacúolo envolvidos pelo tonoplasto. O VMAF induziu a aparição de inclusões lamelares (cataventos e agregados laminados), além de outras inclusões citoplasmáticas e nucleares. Presumíveis partículas do vírus apareciam aderidas às inclusões lamelares e também em feixes. No citoplasma das células de tecidos infectados com VMDeF, apareceram grandes cristais angulares formados por presumíveis partículas do vírus, além de outros cristais menos densos, de natureza proteica, ambos rodeados de uma zona vesiculada. Alguns cloroplastos mostravam inclusões laminadas, enquanto outros apresentavam profundas invaginações. No caso do VMSF, massas de partículas foram vistas no citoplasma, vacúolo e núcleo das células, 2 semanas após a infecção. Nos elementos dos vasos também foram encontrados agregados de partículas. Após 6 semanas da infecção, arranjos cristalinos de partículas foram encontrados no citoplasma de células parenquimáticas e dos tecidos vasculares.

Os cloroplastos e mitocôndrias exibiam comumente profundas invaginações. Os tecidos infectados com o VMSC-F apresentavam ' inclusões citoplasmáticas vesiculares e fibrilares. Formando parte das inclusões vesiculadas encontravam-se frequentemente presumíveis partículas virais, glóbulos osmiofílicos e mitocôndrias, em tecidos analisados 2 semanas após a infecção. Na 8ª semana de infecção, os glóbulos osmiofílicos se tornaram escassos, mas havia numerosos lipídicos. Partículas presumivelmente virais foram observadas no citoplasma e vacúolo de células de diferentes tecidos, inclusive do xilema, e também em túbulos e protuberâncias da parede celular.

Nas infecções mistas, em geral cada vírus componente do par manteve o efeito citopático que induziu nas infecções simples, aparecendo em alguns casos estruturas ausentes ' nas infecções simples. O arranjo VMCF + VMDeF induziu as inclusões características de cada vírus, mas estas nunca foram encontradas na mesma célula. A combinação VMCF+VMSF, provocou a aparição de inclusões lamelares junto a partículas isométricas, similares àquelas do VMSF. Estas também ocorreram no citoplasma e núcleo. A epiderme apresentava numerosas células colapsadas contendo massas de partículas isométricas, em arranjos cristalinos, o mesmo acontecendo nos pelos pluricelulares. Projeções citoplasmáticas, de arranjos unisseriados de partículas alongadas no vacúolo, foram encontrados em abundância nas células dos tecidos infectados com este arranjo.

O arranjo VMCF + VMSC-F, induziu a aparição de inclusões complexas com elementos típicos dos dois vírus, além de agregados de partículas isométricas no citoplasma e vacúolo de células parenquimáticas e epidérmicas. Nos tecidos infectados com o arranjo VMDeF+VMSF foram observadas abundantes inclusões citoplasmáticas compostas por massas vesiculadas rodeando cristais angulares formados por presumíveis partículas de vírus, além de outros cristais menos eletrondensos. Túbulos contendo ' partículas em arranjos unisseriados e protuberâncias da parede celular com plasmodesmata modificados, e também inclusões intranucleares cristalinas, foram efeitos citopáticos exclusivos

do arranjo, não tendo sido observados em infecções simples com estes vírus. A infecção mista com VMDeF eVMSC-F, induziu a aparição de cristais virais típicos do VMDeF e de inclusões vesiculadas próprias do VMSC-F, em uma proporção semelhante à de infecções simples. O arranjo VMSF+VMSC-F, foi um dos que menos efeitos citopáticos causou sendo que os mais importantes foram inclusões citoplasmáticas com abundantes glóbulos osmofílicos e massas de partículas nos vasos lenhosos.

Os resultados obtidos mostram que a análise de secções de tecidos infectados com estes vírus em feijoeiro, seja em infecções simples ou mistas, permite diagnosticar com bastante segurança qual ou quais os vírus envolvidos, constituindo-se assim em um auxílio valioso para completar determinações realizadas por outros meios. Também revela certa correlação entre os danos ao nível celular com a sintomatologia externa da planta afetada.

6-SUMMARY

Dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a staple food in Brazil and many Latin America countries. Among the several factors that have been contributing to a progressively decreasing yields in bean during recent years are virus diseases, and at least four of them occur commonly in central Brazil, namely one potyvirus, bean common mosaic virus (BCMV), and three isometric viruses, bean "mosaico em desenho" virus (BMDV), southern bean mosaic virus (SBMV) and a bean isolated of cowpea severe mosaic virus (CSMV-B). As a complement to the pathological effects of single or double infections by these viruses, an ultrastructural study was undertaken to compare bean leaf tissues single or double infected by these viruses. Bean yellow mosaic virus (BYMV), another potyvirus which occurs quite commonly in other regions of Brazil, although yet found in central Brazil, was included in this study, only as single infection.

Most of the cytopathic effects registered in the single infections by these five viruses were similar to those previously described in the literature. However some additional peculiarities could be observed. In BCMV-infected leaf cells, lamellar inclusions were frequently found in association with membranous proliferation of the endoplasmic reticulum and elongated, putative virions. The latter were, in several instances, seen between tonoplasts, in a single layer, projecting into the vacuole. BYMV also induced the appearance of lamellar inclusions in the cytoplasm usually as lamellar aggregates with presumptive, elongated virus particles attached onto their surface or forming loose bundles in the cytoplasm.

In BMDV infected cells the most characteristic feature was the presence of two types of crystalline inclusions in a highly vesiculated cytoplasmic area: one was larger and denser, made up of presumptive virus particles and the other was smaller, less dense and possibly proteinaceous in nature.

Large masses of isometric viral particles were found in the cytoplasm, vacuole or nucleus in the SBMV-infected cells. Occasionally, xylem vessels were filled up with these particles. In later stages of infection, virus particles formed crystals in the cytoplasm. Loose, fibrous inclusions, typical for CSMV-infection were also seen in tissues invaded by CSMV-B. Virus particles as well as osmiophilic globules and mitochondria were found in a highly vesiculated region of the cytoplasm 2 weeks after infection. However, after 8 weeks, the dense osmiophilic globules became scarce while the number of less dense droplets, possibly lipidic in nature, increased significantly. Virions were found in the cytoplasm, vacuole, xylem vessels, and in tubules associated with cell wall outgrowth. In the case of SBMV and CSMV-B, the identification of the isometric particles as virions was obtained through a immunoelectron microscope technique applying colloidal gold labelled antibodies onto the sections.

In the double infections, with different viruses each of the component virus induced the same type of cytopathic effect as in single infections, and in some cases new structures were formed as a consequence of the double infection. The BCMV-BMDV arrangement induced the characteristic inclusions of each component virus, but so far, they were never seen in the same cell, suggesting some reciprocal exclusion. In tissues infected simultaneously by BCMV and SBMV, lamellar inclusions of BCMV appeared sometimes associated with the isometric SBMV virions. In later stages of the infection cytopathic effects were quite severe on the epidermal cells which collapsed, and within them crystalline arrays of the SBMV were discernible. Also this mixture increased significantly the slender cytoplasmic projections toward the vacuole containing a single row of presumptivel BCMV particles. Complex cytoplasmic inclusions formed by structures induced by both BCMV and CSMV-B were noticed in leaf cells infected with this arrangement. In the double infection by SBMV and

BMDV the most remarkable events were the presence of tubules containing viruslike particles associated with cell wall as well as cell wall outgrowth with modified plasmodesmata, and the intranuclear masses possibly formed by the SBMV particles. Simultaneous infection by BMDV and CSMV-B induced the appearance of typical crystals associated with BMDV infection and fibrous masses present in CSMV-invaded cells, in the same cell. The arrangement SBMV and CSMV-B was the one that less cytopathic effects caused, agreeing with pathological data. The most remarkable changes in infected cells were the presence of abundant osmiophilic globules in the cytoplasm and large masses of viruslike particles in the xylem elements.

This study permitted a critical evaluation of the cytology of the single infection by 5 different bean viruses under comparable experimental conditions, demonstrating the peculiarities caused by each one in the infected cell. In double infection tested, by the arrangement of 4 of these viruses in pairs, usually cytopathic effects of each the component could be identified in the invaded cells, with minor synergistic effects. This fact indicates that analysis of the ultrastructure of the infection might reveal double infections and identify the component viruses, therefore serving as a useful complement in diagnosis. As expected there is commonly a correlation between damages at the cell level with the severity of the external symptoms caused by single or double infections.

7. LITERATURA CITADA

- BOS, L. Bean yellow mosaic virus. C.M.I./A.A.B. Descriptions of plant viruses nº 40. 1970.
- BOS, L. Bean common mosaic virus. C.M.I./A.A.B. Descriptions of plant viruses nº 73. 1971.
- CAMARGO, I.J.B. Estudo comparativo ao microscópio de luz e eletrônico de dois vírus de Leguminosae. Tese de Doutorado. Universidade de Campinas, São Paulo. 66pp. 1973.
- CAMARGO, I.J.B., KITAJIMA, E.W. & COSTA, A.S. Estudo ao microscópio eletrônico de tecidos de plantas infetadas pelo vírus do mosaico comum e mosaico amarelo do feijoeiro. *Bragantia* 27:409-420. 1968.
- CAMARGO, I.J.B., KITAJIMA, E.W. & COSTA, A.S. Inclusões cristalinas de um vírus isodiamétrico que afeta o feijoeiro. *Ciências e Cultura (São Paulo)* 21:490. 1969.
- CAMARGO, I.J.B., KITAJIMA, E.W. & COSTA, A.S. Microscopia eletrônica do vírus do mosaico em desenho do feijoeiro 'in situ'. *Fitopatologia Brasileira*. 1:207-214. 1976.
- CANER, J., SILBERSCHMIDT, K. & FLORES, E. Ocorrência do vírus do mosaico da vigna no Estado de São Paulo. *O Biológico* 35: 13-16. 1969.
- CARR, R.J. & KIM, K.S. Ultrastructure of mixed plant virus infection: bean yellow mosaic virus with cowpea severe mosaic virus or cowpea mosaic virus in bean. *Virology*:338-348. 1983.
- CHRISTIE, R.G. & EDWARDSON, J.R. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. Florida Agricultural Experiment Station. Monograph series nº 9, 150 pp. 1977.
- CLARK, R.L., HILL, J.H. & ELLIS, M.D. Tomato scorch a new virus disease of tomatoes. *Phytopathology* 70:131-134. 1980.
- COSTA, A.F.da. Efeito de infecções simples e duplas de quatro ví

- rus do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) na produção e algumas características da planta. Dissertação de Mestrado - Universidade de Brasília. Brasília-DF. 99p. 1983.
- COSTA, A.S. Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat of widespread virus infection of legume crops in Brazil, In: J. Bird & K. Maramorosch eds. Tropical diseases of legumes. New York, Academic Press. p. 27-49, 1975.
- COSTA, A.S., KITAJIMA, E.W., MYSAKA, A. & ALMEIDA, L.D. Moléstias do feijoeiro causadas por vírus. In: Vieira, C. ed. Anais do I Simpósio Brasileiro de Feijão. Viçosa. Imprensa Universitária (UFV) p. 342-384. 1972.
- COSTA, A.S., OLIVEIRA, A.R., KITAJIMA, E.W. & MATSUOKA, S. ocorrência do mosaico do feijão macassar em São Paulo. Rev. Soc. Bras. Fitop. 3: 56-57. 1969.
- COSTA, C.L., LIN, M.T., KITAJIMA, E.W., SANTOS, A.A., MESQUITA, R.C.M. & FREIRE Fº, F.R. *Ceratomyza arcuata* (OLIV.) Um crisomelídeo vector do mosaico da *Vigna* no Brasil. Fitopatologia Brasileira 3:81-82. 1978.
- COSTA, C.L., LIN, M.T. & SPERANDIO, C.A. Besouros crisomelídeos os vectores do sorotipo IV do "cowpea severe mosaic virus", isolado de feijoeiro. Fitopatologia Brasileira 6:523. 1981.
- CRAIG, S. & MILLERD, A. Pea seed storage proteins - Immunocytochemical localization with Protein A - Gold by Electron Microscopy. Protoplasma 105:333-339. 1981.
- CUPERTINO, F.P., COSTA, C.L., LIN, M.T. & KITAJIMA, E.W. Infecções simples e mistas dos vírus do mosaico do sul e do mosaico em desenho em feijão-vagem no Brasil Central. Fitopatologia Brasileira 7:269-274. 1982a.
- CUPERTINO, F.P., COSTA, C.L., LIN, M.T. & KITAJIMA, E.W. Infecção natural do feijoeiro pelo vírus do mosaico severo do feijão macassar. Fitopatologia Brasileira 7:275-283. 1982b.
- CUPERTINO, F. P. LIN, M.T., KITAJIMA, E.W. & COSTA, C.L. Occurrence of southern bean mosaic virus in Central Brazil. Plant Disease 66:742-743 1982c.
- DE JAGER, C.P. Cowpea severe mosaic vírus. C.M.I./A.A.B. Descrip

- tions of plant viruses n° 209. 1979.
- DE ZOETEN, G.A. & GAARD, G. Possibilities for inter and intracellular translocation of some icosahedral plant viruses. *J. Cell. Biol.* 40: 814-823. 1969.
- DRIJFHOUT, E. Genetic interaction between *Phaseolus vulgaris* and bean common mosaic virus with implications for strain identification and breeding for resistance. Agr. Res. Dept. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen. 98 p. 1978.
- EDWARDSON, J.R. Electron microscopy of cytoplasmic inclusions in cells infected with rod-shaped viruses. *Am. J. Bot.* 53: 359-364. 1966.
- EDWARDSON J.R. Some properties of the potato virus Y group. Fla. Agr. Expt. Sta Monograph Series n° 4. 398 pp. 1974.
- EDWARDSON J.R., ZETTLER, F.W., CHRISTIE, R.G. & EVANS, I.R. A cytological comparison of inclusions as a basis for distinguishing two filamentous legume viruses. *J. gen. Virol.* 15, 113-118. 1972.
- F.A.O. Production year book, volume 30. Food and Agriculture Organisation. Rome 296 pp. 1976.
- F.A.O. Production year book, volume 34. Food and Agriculture Organisation. Rome 296 pp. 1980.
- FAVALI, M.A. CONTI, G.G. & BASSI, M. Modifications of the vascular bundle ultrastructure in the "resistant zone" around necrotic lesions induced by tobacco mosaic virus. *Physiological Plant Pathology* 13:247-251. 1978.
- GALVEZ, G.E., CÁRDENAS, M., KITAJIMA, E.W., DIAZ, A.J. & NIETO, M.P. Purification, serology, electron microscopy and properties of the ampollado strain of bean rugose mosaic virus. *Turrialba* 27:343-350. 1977.
- GAMEZ, R. Las enfermedades virales como factores limitantes en la producción de fríjol (*Phaseolus vulgaris*) en la América Latina. *Fitopatología (Lima)* 12:24-26. 1977.
- GAMEZ, R. Bean rugose mosaic virus. C.M.I./A.A.B. Descriptions of plant viruses n° 246. 1982.

- GUAZZELLI, R.J. Cultivares melhoradas e tradicionais de feijão nos Estados. Embrapa/Centro Nacional de Pesquisa - Arroz, Feijão. Comunicado Técnico nº 7. 1980.
- HAMILTON, R.I. & NICHOLS, C. The influence of bromegrass mosaic virus on the replication of tobacco mosaic virus in *Hordeum vulgare*. *Phytopathology* 67: 484-489. 1977.
- HAMPTON, R.O., PHILLIPS, S., KNESEK, J.E. & MINK, G.I. Ultrastructural cytology of pea leaves and roots infected by pea seedborne mosaic virus. *Virusforschung* 42, 242-253, 1973.
- HATTA, T. & FRANCKI, R.I.B. Identification of small polyhedral virus particles in thin sections of plant cells by an enzyme cytochemical technique. *J. Ultrastruct. Res.* 74: 116-129. 1981.
- HOLLINGS, M. & BRUNT, A.A. Potyviruses in Kurstak, ed. Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Pag. 731-807. 1981.
- HONDA, Y. & MATSUI, C. Distribution of tobacco mosaic virus in etiolated tobacco leaf cells infected with two viruses. *Phytopathology* 61:759-762. 1971.
- HONDA, Y. & MATSUI, C. Electron microscopy of intracellular radish mosaic virus. *Phytopathology* 62:448-452. 1972.
- HULL, R. The grouping of small spherical plant viruses with single RNA components. *J. gen. Virol.* 36, 289-295. 1977.
- JAYASINGHE, W. U. Chlorotic mottle of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). CIAT Série 09EB(2)82. Cali. Colombia. 156 pp. 1982.
- KAMEI, T., HONDA, Y. & MATSUI, C. Intracellular appearance of turnip mosaic and bean yellow mosaic virus particles. *Phytopathology* 59:139-144. 1969.
- KHAN, M.A. & DEMSKI, J.W. Identification of turnip mosaic and cauliflower mosaic virus naturally infecting collards. *Plant Disease* 66, 253-256. 1982.
- KIM, K.S. & FULTON, J.P. Electron microscopy of pokeweed leaf

- cells infected with pokeweed mosaic virus. *Virology* 37, 297-308. 1969.
- KIM, K.S. & FULTON, J.P. Tubules with virus like particles in leaf cells infected with bean pod mottle virus. *Virology* 32(2): 329-337. 1971.
- KIM, K.S. & FULTON, J.P. Plant virus induced cell-wall overgrowth and associated membrane elaboration. *J. Ultrastruct. Res.* 45: 328-342. 1973.
- KIM, K.S., FULTON, J.P., & SCOTT, H.A. Osmiophilic globules and myelinic bodies in cells infected with two comoviruses. *J. gen. Virol.* 25, 445-452. 1974.
- KITAJIMA, E.W. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. *J. Electron Microscopy (Japan)* 14:119-121. 1965.
- KITAJIMA, E.W. Citopatologia e localização de vírus de milho e de leguminosas alimentícias nas plantas infetadas e nos vetores. *Fitopatologia Brasileira* 4:241-254. 1979.
- KITAJIMA, E.W. & COSTA, A.S. Aggregates of chloroplasts in local lesions induced in *Chenopodium quinoa* Wild by turnip mosaic virus. *J. gen. Virology.* 20, 413-416. 1973.
- KITAJIMA, E.W. & COSTA, A.S. Alterações nas estruturas celulares associadas à infecção pelo isolado "Piracicaba" do vírus do mosaico amarelo do feijoeiro. *Bragantia* 33:41 - 44. 1974.
- KITAJIMA, E.W. & LOVISOLO, O. Mitochondrial aggregates in *Datura* leaf cells infected with henbane mosaic virus. *J. gen. Virol* 16, 265-271. 1972.
- KITAJIMA, E.W., KIM, K.S. & FULTON, J.P. Comparison of the cytopathic effects induced by different isolates of the cowpea severe mosaic virus in monarch cowpea. *Phytopatology* 73:791. 1983.
- KITAJIMA, E.W. TASCÓN, A., GAMEZ, & R. GALVEZ, R.E. Ultrastructural studies on bean leaf tissues infected with two strains:

- of bean rugose mosaic virus. Turrialba 24:393-397. 1974.
- KITAJIMA, E.W., LIN, M.T., COSTA, C.L. & BATISTA, M.F. Ocorrência do vírus do mosaico em desenho do feijoeiro no Distrito Federal. Fitopatologia Brasileira 5(3):408 (Resumo) 1980.
- LEE, Y.S. & ROSS, J.P. Top necrosis and cellular changes in soybean doubly infected by soybean mosaic and bean pod mottle viruses. Phytopathology 62:839-845. 1972.
- LIMA, J.A.A. & NELSON, M.R. Purificação e identificação sorológica de "cowpea mosaic virus" em *Vigna sinensis* Endl., no Ceará. Ciência Agronômica 3:5-8. 1973.
- LIN, M.T., ANJOS, J.R.N. & RIOS, G.P. Serological grouping of cowpea severe mosaic virus from Central Brazil. Phytopathology 71:435-438. 1981a.
- LIN, M.T., GAMEZ, R. & KITAJIMA, E.W. Bean "mosaico-em-desenho" virus is a member of the bean rugose mosaic virus sero group. Fitopatologia Brasileira 6:293-298. 1981b.
- LIN, M.T., KITAJIMA, E.W. & COSTA, C. L. New serotypes of cowpea severe mosaic virus. Phytopathology 71:890 (abstract) 1981c.
- LIN, M.T., KITAJIMA, E.W. & RIOS, G.P. Serological identification of several cowpea viruses in Central Brazil. Fitopatologia Brasileira 6:073-085. 198d.
- MARTELLI, G.P. Ultrastructural aspects of possible defence reactions in virus-infected plant cells. Microbiologica 3:369-391. 1980.
- MATTHEWS, R.E.F. Classification and nomenclature of viruses. Intervirology 17, nº 1-3 (p.1-200). 1982.
- Mc MULLEN, C.R., GARDNER, W.S. & MYERS, G.A. Aberrant plastids in barley leaf tissue infected with barley stripe mosaic virus. Phytopathology 68:317-325. 1978.
- MEINERS, J.P., WATERWORTH, H.E., LAWSON, R.H. & SMITH, F.F. Curly dwarf mosaic disease of beans from El Salvador. Phytopathology 67:163-168. 1977.
- MILNE, R.G. Electron microscopy of thin section of Italian ryegrass infected with both ryegrass cryptic virus and oat sterile dwarf virus. Microbiologica 3:333-341. 1980.

- MUELLER, W.C., & KOENING, R. Nuclear inclusions produced by bean yellow mosaic virus as indicators of cross protection. *Phytopathology* 55:242-243. 1965.
- MUNIYAPPA, V. Yellow mosaic of French bean (bean golden mosaic virus) *In: Vectors of Plant Pathogens*. Ed. K.F. Harris & K. Maramorosch. Academic Press. p.52. 1980.
- PAGUIO, O.R. Incidência e algumas propriedades de um membro do subgrupo severo do "cowpea mosaic virus", em Pernambuco. *Fitopatologia Brasileira*. 4:133.1979.
- PIO-RIBEIRO, G., WYATT, S.D. & KUNH, C.W. Cowpea stunt: a disease caused by a synergistic interaction of two viruses. *Phytopathology* 68:1260-1265. 1978.
- QUINIONES, S.S. & DUNLEAVY, J.M. Filiform enations in virus-infected soybeans *Phytopathology* 61:763-766. 1971.
- ROCHOW, W. F. The role of mixed infections in the transmission of plant viruses by aphids. *Ann. Rev. Phytopathol.* 10: 101-124. 1972.
- ROCHOW, W. F. Barley yellow dwarf: dependent virus transmission by *Rhopalosiphum maidis* from mixed infections. *Phytopathology* 65:99-105. 1975.
- ROCHOW, W. F. Dependent transmission by aphids of barley yellow dwarf luteoviruses from mixed infections. *Phytopathology* 72: 302-305. 1982.
- SCHNEIDER, I.R. & WORLEY, J. F. Upward and downward transport of infection particles of southern bean mosaic virus through steamed portions of bean stems. *Virology* 8:230 - 242. 1959.
- SEHGAL, O. P. Southern bean mosaic virus group. *In "Hand book of plant virus.-Infection and Comparative Diagnosis"*. E. Kurstak (ed). Elsevier/North-Holland. Biomedical Press. p. 91-121. 1981.
- SHALLA, T.A. Assembly and aggregation of tobacco mosaic virus in tomato leaflets. *J. Cell. Biol.* 21:253-264. 1964.

- SHEPARDSON, S., ESAU, K. & MCCRUM, R. Ultrastructure of potato leaf phloem infected with potato leaf roll virus. *Virology* 105: 379-392. 1980.
- SHEPHERD, R.J. Southern bean mosaic virus. C.M.I./A.A.B. Descriptions of plant viruses nº 57. 1971.
- SIEVERT, R.C. Effect of potato virus Y and tobacco mosaic virus on field-grown burley tobacco. *Phytopathology* 68:823-825. 1978.
- SILVEIRA JR. , W.G., COSTA, C.L., COSTA, A.F. DA & LIN, M.T. *Diatrofica speciosa e Cerotoma arcuata* vectores do vírus do mosaico do sul do feijoeiro no Distrito Federal. Resumo apresentado no XVI Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Belém, Pará. 4-8 julho de 1983.
- SPERANDIO, C.A. Caracterização do vírus do mosaico em desenho do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília.DF.57pp.1982.
- SPERANDIO, C.A. & COSTA, C.L. Besouros crisomelídeos vectores do vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro. In: Reunião Nacional De Pesquisa de Feijão, 1, *Anais*. Goiânia, EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa - Arroz, Feijão. p.231-233. 1982.
- STACE-SMITH, R. Comoviruses. In "Hand-book of plant virus-infections and comparative Diagnosis" - E. Kurstak (ed) Elsevier/North Holland Biomedical Press. pp.171-195. 1981.
- TRINDADE, D.R. Identificação e caracterização das estirpes do vírus do mosaico comum do feijoeiro, no Brasil. Dissertação de Mestrado - Universidade de Brasília- Brasília-DF. 38 pp. 1979.
- UYEMOTO, J.K., CLAFLIN, L.E., WILSON, D.L. & RANEY, R.J. maize chlorotic mottle and maize dwarf mosaic viruses: effect of single and double inoculations on symptomatology and yield. *Plant Disease* 65, 39-41. 1981.

- WATERWORTH, H. Bean mild mosaic virus. C.M.I./A.A.B. Descriptions of plant viruses n^o 231. 1981
- WEINTRAUB, M. & RAGETLI, H. W. Intracellular characterization of bean yellow mosaic virus-induced inclusions by differential enzyme digestion. Journal of Cell Biology. 38: 316-328. 1968.
- WEINTRAUB, M. & RAGETLI, H.W., Electron microscopy of the bean and cowpea strains of southern bean mosaic virus within leaf cells. J. Ultrastruct. Res. 32:167-189. 1970.
- WERGIN, W.F., GRUBER, P.J. & NEWCOMB E.H. Fine structural investigations of nuclear inclusions in plants. J. Ultrastruct. Res. 30:553-557. 1970.