

**DETERMINAÇÃO DO SÍTIO INTRACELULAR DE SÍNTESE
DO RNA DO VÍRUS DO ANEL DO PIMENTÃO ATRAVÉS
DE AUTO-RADIOGRAFIA A NÍVEL DE MICROSCOPIA
ELETRÔNICA**

NEUSA DE LIMA NOGUEIRA

Orientador: DARCY MARTINS DA SILVA

**Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade
de São Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Fitopatologia**

**PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Abril, 1978**

Ao Francisco Pedro

e nossas filhas,

Luciana e Claudia

DEDICÓ

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que de uma forma ou de outra permitiram a execução deste trabalho, em especial

as seguintes pessoas:

- Professor Dr. *Darcy Martins da Silva*, pela valiosa orientação, pelos conhecimentos transmitidos com inteligência e dedicação contribuindo de forma decisiva para minha formação científica.

Professor Dr. *Zilkar Cavalcanti Maranhão*, pela revisão dos originais e valiosas sugestões.

Professor Dr. *Álvaro Santos Costa*, pela leitura do manuscrito bem como pelas sugestões e discussões esclarecedoras.

- Professores do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", onde tive oportunidade de desenvolver minha formação científica.
- Doutores *Kurt* e *Denise Bienz*, pela orientação da parte de auto-radiografia.
- Sra. *Diva Athiê*, pelo auxílio e versão do resumo para o inglês.
- Sr. *Ivan Pedro Salati de Almeida*, pelas sugestões nas análises e cálculos estatísticos.

- Técnico químico *José Elias Gomes*, pelo auxílio nas revelações fotográficas.
- Colegas da Seção de Fitopatologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), pela amizade e colaboração.

e às seguintes instituições:

- Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) na pessoa do Dr. *Admar Cervellini* onde todo o trabalho foi desenvolvido.

Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), pela concessão de bolsa de estudo fornecida durante o Curso de Pós-Graduação.

- UNDT-IAEA-BRA-71/556 na pessoa do Dr. *Peter B. Vose* pelas doações que muito contribuíram para a realização desta Tese.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
1. RESUMO	01
2. INTRODUÇÃO	04
3. REVISÃO DA LITERATURA.	07
3.1. Considerações gerais sobre o vírus do anel do pimentão. .	07
3.2. Métodos utilizados para investigações dos locais de síntese intracelular dos vírus e seus constituintes.	09
3.2.1. Microespectrofotométricos.	09
3.2.2. Citológicos.	10
3.2.3. Fracionamento celular.	11
3.2.4. Imunomicroscópicos	11
3.2.5. Citoquímicos e auto-radiográficos.	12
3.3. Uso de AMD no estudo dos processos de replicação do vírus de planta	13
3.4. Características do traçador	20
3.5. Locais de síntese do RNA de vírus de planta	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Hospedeira utilizada.	27
4.2. Preparo do espécime	28

	<u>Página</u>
4.3. Microtomia	30
4.4. Auto-radiografia	30
4.5. Técnicas fotográficas	32
4.6. Determinação das áreas celulares e seus componentes e análises quantitativas dos grãos de prata.	34
5. RESULTADOS	36
6. DISCUSSÃO.	51
7. CONCLUSÕES	60
8. SUMMARY	63
9. LITERATURA CITADA.	66

LISTA DAS TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
01 - Análise do efeito dos tratamentos sobre as áreas médias das células foliares de fumo sadio (S) e doente (VAP) pelo teste F	37
02 - Análise do efeito dos tratamentos sobre as áreas médias dos organelas das células foliares de fumo pelo teste F.	38
03 - Áreas e quantidade de organelas da célula foliar padrão de <i>Nicotiana tabacum</i> L. var. Turkish NN	39
04 - Médias das contagens dos grãos de prata em células foliares de fumo tratadas com uridina tritiada durante 3 horas	40
05 - Médias das contagens dos grãos de prata em células foliares de fumo tratadas com uridina tritiada durante 5 horas	40
06 - Médias das contagens dos grãos de prata em células foliares de fumo tratadas com uridina tritiada durante 9 horas	40
07 - Número médio de grãos de prata por unidade de área das organelas de células foliares do fumo tratadas com uridina tritiada durante 3 horas	41

Tabela	Página
08 - Número médio de grãos de prata por unidade de área das <u>or</u> ganelas de células foliares do fumo tratadas com uridina tritiada durante 5 horas	41
09 - Número médio de grãos de prata por unidade de área das <u>or</u> ganelas de células foliares do fumo tratadas com uridina tritiada durante 9 horas.	42

LISTA DAS FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
01 - Estrutura química da actinomicina D	17
02 - Ilustração da molécula da actinomicina.	19
03 - Ilustração da principal etapa de incorporação U-5- ³ H em RNA ou DNA	21
04 - Curvas das densidades de grãos de prata obtidos em fotomicrografias de células de fumo sadias afetadas pelo VAP pré-tratadas com água (16 horas) e U-5- ³ H durante 3, 5 e 9 horas	42
05 - Curvas das densidades de grãos de prata obtidos em fotomicrografias de células de fumo sadias e afetadas pelo VAP pré-tratadas com AMD (16 horas) e U-5- ³ H (3, 5 e 9 horas)	43
06 - Curvas das densidades dos grãos de prata de núcleo (N), nucléolo (Nc) e citoplasma (C) obtidas em fotomicrografias de tecido foliar de fumo sadio pré-tratado com AMD (16 horas) e U-5- ³ H (3, 5 e 9 horas)	44
07 - Curvas das densidades dos grãos de prata do núcleo (N), nucléolo (Nc) e citoplasma (C) obtidas em fotomicrografias de células foliares de fumo afetadas pelo VAP pré-tratadas com AMD (16 horas) e U-5- ³ H (3, 5 e 9 horas). .	45

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
08 - Curvas das densidades dos grãos de prata do núcleo (N), nucléolo (Nc) e citoplasma (C) obtidas em fotomicrografias de células foliares de fumo afetadas pelo VAP corrigidas com os valores correspondentes das organelas das células sadias pré-tratadas com AMD (16 horas) e U-5- ³ H (3, 5 e 9 horas)	46
09 - Histograma mostrando as porcentagens dos grãos de prata do núcleo (N), nucléolo (Nc) e citoplasma (C) em relação ao número total de grãos da célula para cada tratamento..	47
10 - Dois aspectos da associação das partículas de vírus do anel do pimentão com mitocôndrios de células de folha de fumo	48
11 - Grãos de prata obtidos no tratamento de célula sadia de folha de fumo pré-tratada com água (A) ou actinomicina D (B) durante 16 horas e uridina tritiada durante 5 horas..	49
12 - Grãos de prata obtidos no tratamento de célula de folha de fumo afetada pelo vírus do anel do pimentão pré-tratada com água (C) ou actinomicina D (D) durante 16 horas e uridina -5- ³ H durante 5 horas	50

1. RESUMO

Na presente tese foi estudado o local de replicação do RNA do vírus do Anel do Pimentão (VAP) associando-se as técnicas de auto-radiografia e microscopia eletrônica.

Tecidos foliares de *Nicotiana tabacum* L. var. Turkish NN sadios e com VAP foram incubados com Actinomicina D (AMD) ou água e a seguir tratadas com uridina tritiada (atividade específica 29,2 curies/m mol) durante três intervalos de tempo, 3, 5 e 9 horas. Depois de fixados com glutaraldeído e ácido ósmico foram desidratados com acetona 30, 50, 70, 90, e 100% e incluídos em resina Epon. Os cortes ultrafinos e semifinos foram cobertos com emulsão fotográfica e após tempo de exposição adequado foram revelados e examinados.

A produção de grãos de prata reduzida (grãos) devido a incorporação de uridina $-5-^3\text{H}$ (U- $5-^3\text{H}$) no RNA permitiu contagens que, analisadas quantitativamente, serviram para identificar o local de replicação do RNA viral.

Os resultados obtidos indicaram que:

1. O efeito dos tratamentos utilizados sobre as áreas médias das secções das células foliares e as áreas médias de seus constituintes não apresentam diferença estatística significativa a nível de 1% de probabilidade.
2. A densidade dos grãos de prata da célula afetada pelo VAP e tratada com água indica que a síntese de RNA sofre uma redução no período de 3 a 5 horas de incubação com U-5-³H e que a taxa de redução no período de 5 a 9 horas é semelhante entre célula doente e sadia.
3. O tratamento dos tecidos foliares sadios e doentes com AMD revelou que a ação do antibiótico foi seletiva no sentido de inibir a polimerase dependente do DNA e não a replicase do RNA viral, permitindo acompanhar com melhor aproximação o curso da biossíntese do RNA do VAP.
4. O estudo do comportamento individual de três regiões da célula sadia ao tratamento com AMD, mostrou, pela comparação dos números de grãos de prata por unidade de área, que a atividade de síntese do RNA no nucléolo foi a mais inibida pelo antibiótico, seguindo-se a do citoplasma e a do núcleo.

5. As densidades dos grãos de prata das organelas da célula afetada tratada com AMD e corrigidas com respeito às densidades da célula sadia inibida com AMD, mostraram que o curso da biossíntese do ácido nucléico no núcleo (excluindo o nucléolo) e no citoplasma é bastante semelhante, diferindo do processo biossintético do RNA no nucléolo.

6. Examinando as taxas de síntese do RNA da célula afetada pelo VAP, tratada com AMD e corrigida com os respectivos valores da célula sadia nas mesmas condições e no período de 3 a 5 horas, observou-se que a taxa de síntese no nucléolo é aproximadamente três vezes a do citoplasma e a do núcleo sem nucléolo.

7. Os dados da tese sugerem que embora alguma síntese do RNA ou ácidos nucléicos devidos a presença do VAP possa ocorrer no núcleo da célula infectada, o nucléolo é o local principal da biossíntese do RNA do VAP.

8. As auto-radiografias revelaram também que a translocação do RNA marcado do VAP já pode ser observada nas proximidades do mitocôndrio no período de 5 horas de tratamento com U-5-³H.

2. INTRODUÇÃO

Após a purificação do vírus do mosaico comum do fumo realizado por STANLEY (1935), um período de conhecimentos mais concretos a respeito da natureza dos vírus, muitos problemas de natureza biológica, física e química começaram a ser abordados. A replicação dos componentes dos vírus *in vivo* ou *in vitro*, não podia pois ser esquecida nos programas de pesquisa visando conhecer pormenores da biossíntese desses agentes patogênicos.

Assim, os processos replicativos do RNA viral envolvendo RNA com simples ou diversos genomas vem sendo intensivamente pesquisados. Paralelamente ao interesse pelo mecanismo de síntese intracelular de vírus em células de plantas desenvolveram-se diferentes métodos de estudo, destacando-se os de espectrofotometria, imunomicroscopia, fracionamento celular, citoquímica, incluindo entre eles os de auto-radiografia. Este último foi escolhido para realização deste trabalho, incorporando-se "*in vivo*" uridina tritiada (U-5-³H) no RNA do vírus do Anel do Pimentão (VAP) afetando células de tecido foliar de *Nicotiana tabacum* L., variedade Turkish.

Interessados em descobrir o local da síntese de RNA do VAP cujas partículas se encontram frequentemente associadas aos mitocôndrios, fomos levados a execução da presente tese.

A programação seguida se constituiu primeiro das investigações seguidas das melhores condições metodológicas, como o tempo ótimo ao bloqueio da síntese do RNA celular normal, pela actinomicina D (AMD) e os intervalos de tratamento com U-5-³H. Estabelecidas estas condições, iniciaram-se os estudos para detectar o local de síntese do RNA do VAP.

A produção de grãos de prata reduzida devido a incorporação de U-5-³H no RNA permitiu contagens que, analisadas quantitativamente, serviram para identificar o local de replicação do RNA viral.

Em resumo, as etapas e o objetivo desta tese foram os seguintes:

1. Verificar se a AMD teria a desejada ação seletiva sobre o RNA celular normal sem afetar consideravelmente a replicação do VAP.
2. Uma vez constatada a seletividade da ação do AMD investigou-se, pelas técnicas de microscopia eletrônica associada às de radioisótopos, o local de incorporação intracelular da U-5-³H.
3. Obtidas as auto-radiografias foi selecionado o período de incorporação de U-5-³H mais adequado às análises quantitativas.

4. Finalmente, pela análise dos números de grãos de prata por unidade de área das organelas de uma célula procurou-se estabelecer o provável local de replicação do RNA do VAP.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Considerações gerais sobre o vírus do anel do pimentão

O VAP foi encontrado no Brasil, no município de São Carlos - São Paulo, afetando pimentão. As características biológicas, determinações da morfologia e relações serológicas do VAP, estudadas por COSTA et alii (dados não publicados), mostraram ser ele integrante do grupo "rattle" do fumo.

O VAP foi purificado e estudado por SILVA (1965), KITAJIMA (1967), OLIVEIRA (1967) sob diversos ângulos destacando-se os seus aspectos bioquímicos, morfológicos e serológicos.

Deve-se a VAN DER WANT e ROSENDAAL (1948) as primeiras descrições sobre as partículas de vírus do "rattle". Estes autores realizaram suas observações em plantas infetadas com vírus de "rattle" do fumo e do mosqueado do caule da batata, descrevendo e dimensionando partículas em forma de bastonete, com dois diferentes tamanhos, (130 e 300 nm de comprimento). DE ZOETEN e SHALLA (1966), ALLEN (1963), KITAJIMA et alii (1969) trabalhando com variantes do mesmo vírus, encontra-

ram resultados idênticos quanto a forma e pequenas variações quanto ao comprimento e espessura das partículas infecciosas.

HARRISON e ROBERTS (1968) observaram que os vírus do grupo "rattle" apresentavam-se geralmente associados aos mitocôndrios das células hospedeiras.

Os dados referentes a aspectos patológicos e comprimentos normais (CN) das partículas curtas e longas do VAP respectivamente 54 e 199 nm foram determinados por COSTA et alii (dados não publicados) e KITAJIMA (1967) sendo a infectividade associada apenas às partículas longas, segundo SILVA (1965) e OLIVEIRA (1967). KITAJIMA (1967) observou que o diâmetro das partículas é da ordem de 20 - 25 nm e a proporção entre longas e curtas é de 20:1.

Análises químicas feitas com preparações purificadas do VAP, segundo SILVA (1965), revelaram que as partículas do VAP têm 95% de proteína e 5% de ácido ribonucléico e que este pode ser separado da parte protéica mantendo ainda sua infectividade. Segundo este autor, os aminoácidos das proteínas da partícula grande e pequena são idênticas e as cadeias polipeptídicas apresentam o mesmo C terminal. Os testes serológicos das referidas partículas realizados por SILVA (1965) e OLIVEIRA (1967), não permitiram distinção entre as mesmas.

SILVA (1965) verificou que o tratamento das preparações purificadas com sulfato de amônio a 0,2 da saturação, produziram formações tipo cristalino alongadas.

Exames de cortes ultrafinos feitos ao microscópio eletrôni

co por KITAJIMA (1967) revelaram a associação das partículas de VAP com os mitocôndrios da célula hospedeira.

As partículas curtas foram detectadas por CAMARGO et alii, (1969) nos cortes de pólen das plantas de tomate infectadas e em tecido foliar por SILVA e NOGUEIRA (dados não publicados).

3.2. Métodos utilizados para investigações dos locais de síntese intracelular dos vírus e seus constituintes

Diversos são os métodos utilizados para estudar locais de síntese de RNA, proteína e de vírus em células de plantas.

3.2.1. Microespectrofotométricos

Tem sido utilizado na microespectrofotometria, o espectro de absorção de proteína e ácido nucléico para acompanhar as mudanças na composição das áreas específicas das células durante a multiplicação do vírus. Estes estudos são feitos com porções de células vivas comparando densidades ópticas das diferentes partes da célula a 265 nm (ácido nucléico) e 280 nm (proteína). Este método apresenta as suas limitações. Contudo a primeira evidência dos locais de síntese de vírus foi obtida por ZECH (1961) através desta metodologia.

3.2.2. Citológicos

Através dos microscópios óptico e eletrônico têm sido feito estudo sobre anormalidades, inclusões e estruturas celulares.

Poucas investigações têm sido feitas correlacionando as mudanças citológicas e a multiplicação do vírus principalmente devido a dificuldades em determinar o estágio de infecção de células individuais. SMITH e SCHLEGEL (1964) estudaram a distribuição de vírus em ponta de raiz e postularam que células em diversos estágios de desenvolvimento seriam responsáveis pela maior ou menor concentração de vírus, extrapolando essa hipótese para a ausência de vírus nas células meristemáticas. Nesse trabalho ressaltam a necessidade de estudos mais precisos sobre os estágios das células.

Anteriormente estudos citológicos ao microscópio óptico se dedicavam principalmente ao estudo dos processos patológicos devido aos vírus. BALD e SOLBERG (1961) e (1964, 1966) fizeram estudos citológicos colorindo especificamente RNA e proteínas do vírus. MC WHORTER (1965), através de semelhante técnica estudou a natureza das inclusões de vírus em plantas infectadas.

O microscópio eletrônico nos últimos anos vem substituindo o microscópio óptico com maiores possibilidades permitindo o estudo do tamanho e forma das partículas no interior da célula.

BLACK et alii (1950) realizaram um estudo ao microscópio eletrônico sobre a ocorrência do vírus do mosaico do fumo em células in-

fectadas, que se tornou clássico. A partir daí muitos trabalhos sobre vírus purificados e intracelular foram efetuados.

3.2.3. Fracionamento celular

Nas técnicas de fracionamento, tecidos doentes são homogeneizados e diferentes organelas são separadas através de centrifugações diferenciais ou em gradientes de densidade para localizar o sítio intracelular de replicação do vírus. Por esse meio tem sido estabelecida por LAFLECHE et alii (1972) a associação entre vírus marcados e determinadas frações celulares. Este método apresenta o problema da contaminação devido a compostos e estruturas absorvidas na superfície das organelas isoladas.

3.2.4. Imunomicroscópicos

Anticorpos conjugados com várias substâncias são aplicados nos cortes contendo antígeno. O complexo resultante, anticorpo conjugado com antígeno, pode ser identificado ao microscópio. COONS (1958) usou corantes fluorescentes ligados a anticorpos, para estudos ao microscópio óptico. STERNBEGER et alii (1963) utilizaram metais pesados e SINGER (1959) usou ferritina para marcar compostos e estudá-los através da microscopia eletrônica.

Para se obter bons resultados neste método é necessário usar técnicas de fixação que preservem a arquitetura celular e retenham a antigenicidade, evitando a redistribuição do antígeno.

DUDMAN (1966), LANGENBERGER e SCHLEGEL (1967) usaram gelatina para fixação dos vírus do mosaico do fumo evitando o movimento do vírus durante o processamento sem prejuízo de sua antigenicidade. Posteriormente, através da associação de imunomicroscopia com técnicas de autoradiografias, LANGENBERG e SCHLEGEL (1967) puderam localizar o TMV com anticorpos marcados pelo ^{125}I .

3.2.5. Citoquímicos e auto-radiográficos

Nos métodos auto-radiográficos quantidades muito pequenas de material radioativo nos cortes de tecidos são detectados por meio de emulsões fotográficas. A quantidade de radioatividade presente e sua localização são registradas com a exposição dos grãos de prata na emulsão fotográfica. Medidas quantitativas dos níveis de radioatividade podem ser obtidas pelas contagens dos grãos de prata, dados esses que servirão para a análise estatística.

A auto-radiografia tem sido um ótimo meio de estudar síntese de vírus. Por intermédio de precursores, inibidores metabólicos específicos, digestões enzimáticas, etc. são demonstrados os locais de síntese de vírus. Há certas limitações na aplicação dos métodos autoradiográficos para estudos dos locais de síntese de vírus. Uma das principais

é ter certeza que os precursores de vírus usados estão realmente incorporados no vírus. Há também o perigo do precursor ser utilizado pela célula e converter em outras substâncias que serão metabolizadas.

Há algumas fontes de erro que podem afetar seriamente a interpretação dos dados auto-radiográficos aplicados às pesquisas com vírus. Desta forma a infecção causada por vírus pode afetar a permeabilidade celular ao isótopo e outros materiais tais como os inibidores metabólicos. Outro fator importante é a diferença do tamanho do "pool" metabólico dos precursores entre as células sadias e as doentes.

Recentemente BACHMAN e SALPETER (1965) e NADLER (1971) vem desenvolvendo modelos matemáticos para estudos quantitativos das radioautografias.

3.3. Uso de AMD no estudo dos processos de replicação do vírus de plantas

A demonstração por SANGER e KNIGHT (1963) de que a AMD inibe a incorporação de uracil - $2-C^{14}$ no ácido ribonucléico normal de células de fumo, mas não interfere com a incorporação no ácido ribonucléico do fumo infectado com vírus do mosaico comum abriu um grande campo para o estudo da síntese de RNA de vírus em plantas com muito mais segurança.

Diversos trabalhos têm demonstrado que a síntese de RNA dos vírus é independente do DNA da célula hospedeira e que a AMD combi-

nando com o DNA da célula impossibilita a utilização deste DNA como matriz para a síntese do RNA normal. Através de um estudo auto-radiográfico tais autores utilizando diferentes combinações vírus-hospedeira puderam visualizar os locais de multiplicação dos diversos vírus da planta usando a AMD como bloqueador da síntese do RNA celular normal.

A concentração AMD utilizada pelos autores tem variado dentro de uma faixa razoável. Assim SMITH e SCHLEGEL (1964) usaram AMD na concentração de 50 µg/ml e verificaram que o inibidor evitou a incorporação de U-5-³H nas organelas celulares sadias de fumo. Resultados semelhantes foram obtidos com raízes de *Vicia faba* por SMITH e SCHLEGEL (1965) quando usaram 65 µg/ml de AMD. Em trevo e *Vicia faba* DE ZOETEN e SCHLEGEL (1967) utilizaram AMD na concentração 62,5 µg/ml de água e verificaram que este antibiótico causou uma redução de 70 - 80% de incorporação de U-5-³H. WOLANSKI e CHAMBERS (1971) usaram uma concentração maior de AMD ou seja 100 µg/ml em tecidos foliares de *Nicotiana glutinosa* obtendo ótimos resultados no bloqueio da síntese do RNA celular.

FACCIOLI e RUBIES - AUTONEL (1975) utilizaram em *Chenopodium amaranticolor*, quantidades crescentes de AMD ou seja, 50, 100, 250 e 500 µg/ml para inibição de síntese de RNA celular normal e verificaram um decréscimo progressivo na incorporação de U-5-³H à medida que aumentava a concentração de AMD; portanto escolheram para os seus experimentos a concentração de 500 µg/ml.

A AMD também pode funcionar como inibidor da multiplicação de vírus em certas combinações vírus-hospedeira. Segundo LOCKHART e SEMANCIK (1968) a AMD inibiu a multiplicação de "cowpea mosaic virus" em

tecidos de hipocótilo de caupi. Esta inibição foi completa quando os tecidos foram tratados com AMD imediatamente após inoculação; mas o grau de inibição decresceu com o tempo entre a inoculação e o tratamento com AMD; após 18 - 20 horas o antibiótico não afetou a multiplicação do vírus.

A inibição da multiplicação do vírus do mosaico do fumo (TMV) em tecidos foliares de fumo pela incubação com AMD foi relatada por SEMAL (1967).

Com o TMV e "cowpea chlorotic mottle virus" em tecidos estiolados de hipocótilo de caupi o mesmo tipo de inibição da multiplicação foi observada por LOCKHART e SEMANCIK (1969) quando trataram os mesmos com AMD. Um efeito semelhante foi verificado por estes autores com referência a multiplicação de "cowpea mosaic virus" em tecido de hipocótilo de "cherokee wax". Quando os mesmos experimentos foram feitos com "bean pod mottle virus" em tecido de hipocótilo de "cherokee wax" a AMD estimulou a multiplicação de vírus. Segundo os autores o efeito da AMD na multiplicação de vírus parece ser dependente da hospedeira e do tipo do ácido nucléico do vírus.

A AMD, dependendo do hospedeiro, pode estimular o aumento do tamanho das lesões locais além da multiplicação do vírus.

LOEBENSTEIN et alii (1969) verificaram que o tamanho das lesões locais causadas pelo TMV em folhas de *Phaseolus vulgaris* L. var. Pinto e a multiplicação do TMV nos cotilédones de *Cucumis sativus* L. aumentaram significativamente na presença de AMD.

Quando as folhas de feijão eram injetadas com AMD antes de

inoculação do TMV o diâmetro das lesões eram 2,5 vezes maior que os controles e em cotilédones de pepino; a concentração do vírus aumentou 4 ou 11 vezes quando os cotilédones foram injetados com concentração de 5 µg/ml ou 10 µg/ml respectivamente um dia após inoculação.

NACHMANN et alii (1971) demonstraram que o tratamento com AMD em um cultivar de pepino resistente ao vírus do mosaico do pepino apresentaram uma concentração elevada de vírus. Estes autores supõem que o antibiótico impediu a expressão de um mecanismo de repressão da multiplicação viral comandada pela DNA do hospedeiro. MARROW et alii (1973) verificaram que o comportamento do vírus do mosaico do pepino em folhas de fumo não foi modificado pelo tratamento com AMD, dando indicação de ser independente dos mecanismos dirigidos pelo DNA hospedeiro e está provavelmente ligado a natureza deste vírus.

O período de incubação dos tecidos foliares em AMD tem variado de 12 a 24 horas. Assim SMITH e SCHLEGEL (1964) incubam folhas de fumo em AMD durante 24 horas. Os mesmos autores em 1965 repetindo o mesmo experimento utilizaram 16 horas. LAFLECHE e BOVÉ (1968) incubaram *Brassica chinensis* durante 16,30 horas; WOLANSKY e CHAMBERS (1971) utilizaram 21 horas para *Nicotiana glutinosa*. FACCIOLI e RUBIES-AUTONEL (1975) 12 horas para *Chenopodium amaranticolor*. DE ZOETEN e SCHLEGEL (1967) incubaram em AMD durante 6,5 horas pontas de raízes de *Vicia faba* e obtiveram uma notável inibição de síntese do RNA normal.

O mecanismo de bloqueio causado pelo AMD não está bem esclarecido mas há boas indicações de que, pela complexação do inibidor com certos setores de DNA onde ocorre a desoxiguanidina poderia explicar gran

de parte do seu efeito.

A estrutura química da Actinomicina D é apresentada na Figura 1.

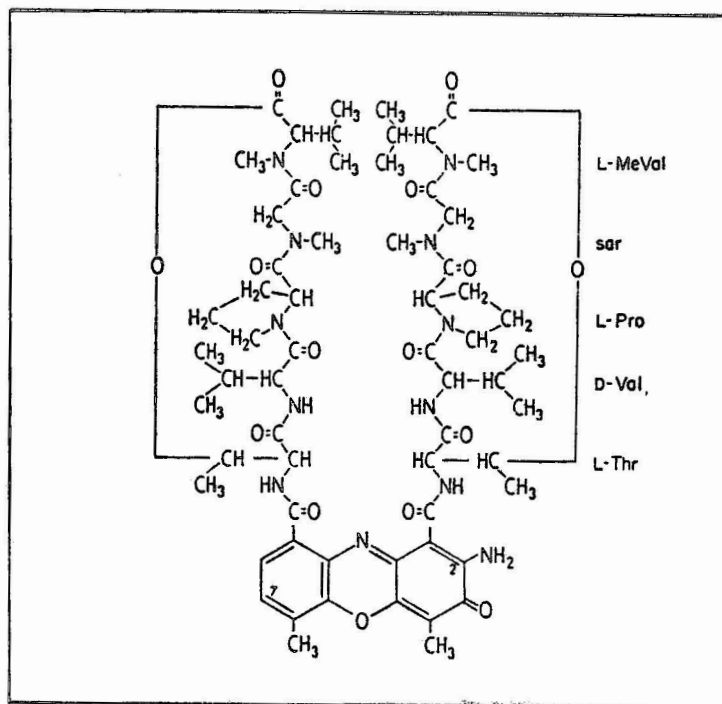


Figura 1 - Estrutura química da actinomicina D. Meval, metil valina; Sar, sarconina; pro, prolina, val, valina; Thr-treonina.

E a justaposição entre AMD e desoxiguanosina segundo SOBELL e JAIN (1972) se daria da seguinte maneira:

1. Os anéis heterocíclicos do resíduo guanina tornam-se pa ralelos aos anéis da fenoxazona do AMD e duas ligações de hidrogênio permite o ajuste específico para a guanina. Sendo o grupo NH_2 da posição 2 da guanina essencial.

2. O resíduo do açúcar (desoxirribose) da molécula da desoxiguanosina se justapõe hidrofobicamente aos grupos isopropílico dos resíduos de L metilvalina da cadeia oligopeptídica do AMD (Figura 2).

Pelo modelo estereoquímico proposto por JAIN e SOBELL(1972) a actinomicina D complexa-se eficientemente com os segmentos do DNA de dupla fita que contém desoxiguanosina através de ligações de hidrogênio e outras ligações secundárias. Este complexo pela cobertura do AMD e alterações estruturais do DNA bloqueará a ação da polimerase ou transcriptase. Esse mecanismo de bloqueio se assemelha ao mecanismo proposto para o bloqueio do operador genético pelas moléculas repressoras.

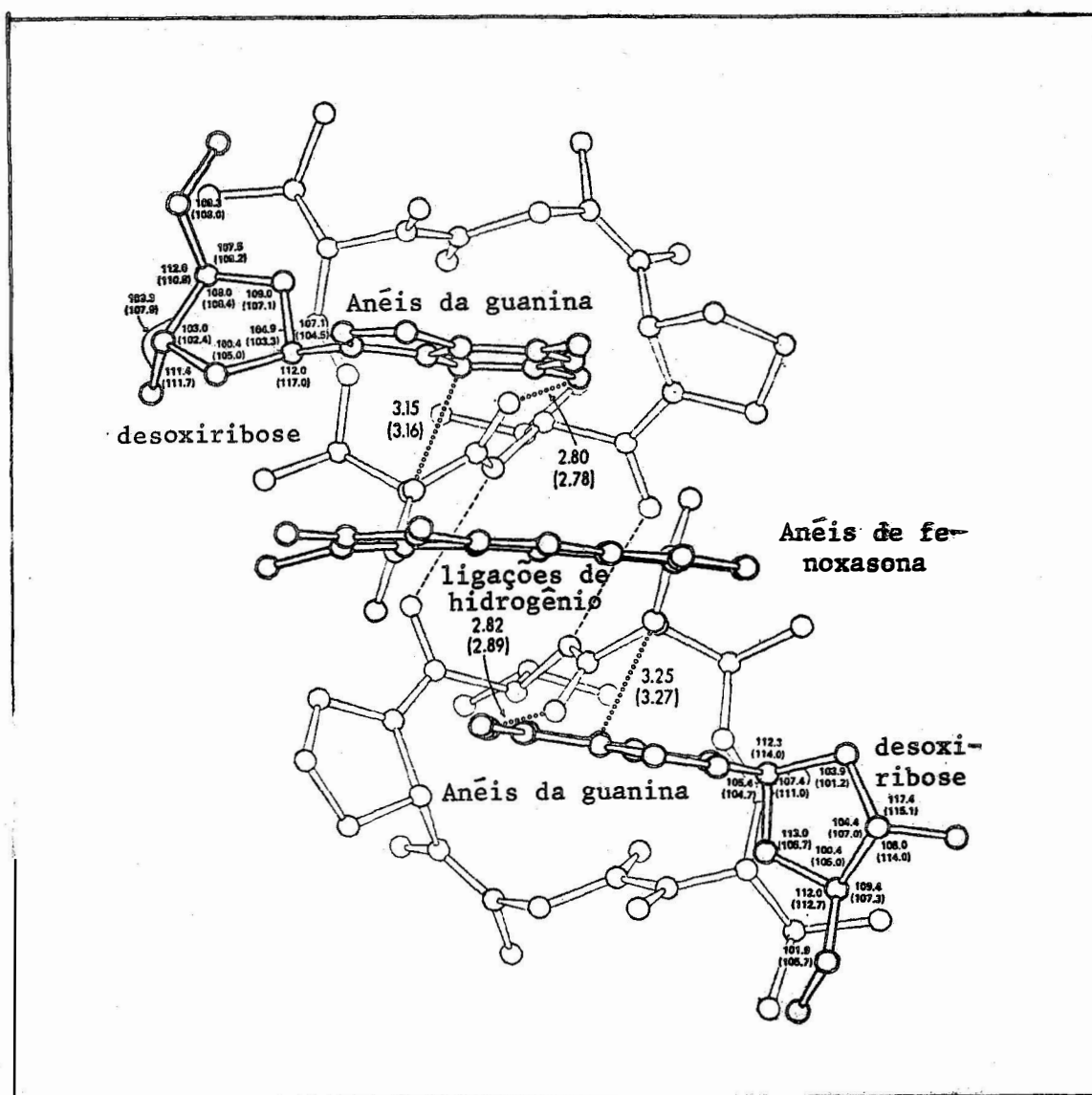


Figura 2 - Ilustração da molécula de actinomicina. As duas linhas pontilhadas indicam ligações de hidrogênio conectando as cadeias penta peptídicas da actinomicina com as moléculas de desoxiguanosina (Modelo de JAIN et SOBELL, 1972, modificado).

3.4. Características do traçador

O isótopo mais geralmente usado em auto-radiografia a nível de microscopia eletrônica é o trítio que é um emissor de radiação beta negativo. Somente os emissores de partículas beta com baixa energia são altamente ionizantes e apresentam um poder de penetração adequada para a alta resolução do trabalho.

O trítio tem as seguintes características: número atômico igual a 1, massa atômica 3, meia vida 12 anos, radiação beta puro com uma energia de 0,017 a 0,019 MEV.

As características dos isótopos mais interessantes para as auto-radiografias são a meia vida física, atividade específica e o nível de energia. O trítio tem sido escolhido por apresentar meia vida longa conveniente para realização dos experimentos; atividade específica suficiente para sensibilizar a emulsão fotográfica num período de tempo relativamente curto; baixa energia que permite maior poder de resolução em auto-radiografia.

Trabalhos realizados por PELC (1963) tem demonstrado que praticamente cada radiação do trítio afeta apenas um cristal de cloreto ou brometo de prata. Assim o trítio, segundo PEASE (1964), um radioisótopo especialmente adequado para sensibilizar os cristais de halogenetos de prata numa monocamada da emulsão colocada sobre o corte ultrafino, o que recomenda para trabalhos quantitativos.

A U-5-³H quando incorporada metabolicamente no RNA, tor-

na-lo-ã marcado. Entretanto, quando a U-5-³H é utilizada metabolicamente na síntese do DNA, o trítio que está na posição 5 será deslocado para dar entrada a um grupamento metil e o DNA assim formado não será marcado. A Figura 3 ilustra a incorporação do U-5-³H no RNA e no DNA.

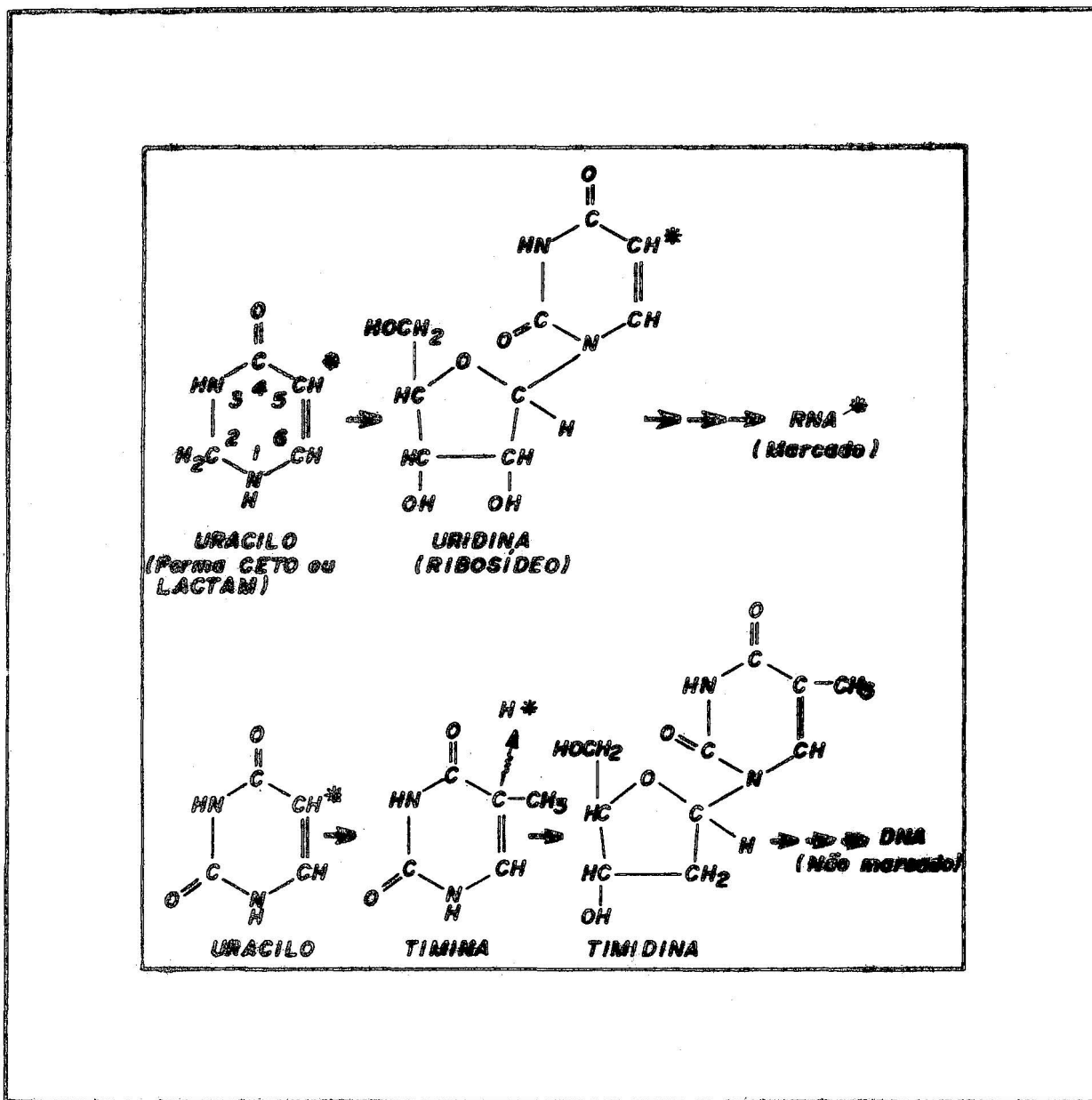


Figura 3 - Ilustração da principal etapa de incorporação de U-5-³H em RNA ou DNA.

3.5. Locais de síntese do RNA de vírus de planta

Recentemente o interesse pelo mecanismo de síntese de vírus em células de planta tem aumentado e numerosas tentativas têm sido feitas no sentido de identificar os locais de síntese intracelular do vírus.

Os métodos de estudo para identificar locais são vários, mas nesta tese pretendemos focalizar os resultados obtidos pelo método auto-radiográfico descrito adiante. Através dele quantidades mínimas de material radioativo podem servir para localização de síntese de macromoléculas desde que sejam observados os requisitos estudados por CARO e VAN TUBERGEN (1962).

A quantidade de radioatividade e sua localização são registradas com precisão pelos grãos de prata da emulsão fotográfica. As medidas da quantidade de radioatividade podem ser obtidas pelas contagens do número de grãos de prata e os dados obtidos podem ser estatisticamente analisados segundo BLACKETT e PARRY (1973).

Diversos autores, nestes últimos anos têm estudado o local de síntese de vírus através de histoauto-radiografia e microscopia eletrônica, após incorporação *in vivo* de uridina tritiada no RNA de célula de tecidos infectados.

Os locais de síntese de RNA dos vírus variam de acordo com a planta hospedeira e o vírus. O lugar no qual o RNA adquire a capa protéica para a partícula completa de vírus também é variável e diversas são

as teorias propostas pelos autores.

SMITH e SCHLEGEL (1964) foram os primeiros a verificar a incorporação de uridina tritiada no núcleo e nucléolo de folha de fumo com mosaico comum (TMV) tratada com actinomicina D. Tal incorporação não foi encontrada em folha sadia tratada com AMD, sendo que as folhas não tratadas, infectadas ou sadias, incorporaram mais uridina tritiada.

Segundo SMITH e SCHLEGEL (1965) os RNA precursores estão localizados inicialmente no núcleo e nucléolo, de folhas de fumo infectadas com vírus do mosaico comum do fumo (TMV) e é de particular importância o fato que no sistema fumo infectado com TMV a marcação seguiu do nucléolo para o citoplasma onde parte desta apareceu como inclusão do vírus. Quando os experimentos foram feitos com raízes de *Vicia faba* infectadas com "clover yellow mosaic virus" o período de incorporação foi menor e restringiu a incorporação do precursor radioativo quase que inteiramente no nucléolo. Tanto neste caso, como no TMV o traçador se deslocou do núcleo para o citoplasma com o progresso da infecção.

A possibilidade de uma relação entre a forma do vírus e seu local de síntese foi considerada por DE ZOETEN e SCHLEGEL (1967). Os autores realizaram estudos auto-radiográficos de incorporação de U-5-³H em plantas sadias e infectadas com vírus esférico: "broad bean mottle virus", "tomato spotted wilt virus" e "tomato ringspot virus" e alongados: "tobacco mosaic virus", "clover yellow mosaic virus" e "sugar cane mosaic virus". Nos sistemas vírus esféricos-hospedeira examinados observam-se incorporação do traçador na região citoplasmática. Havia pequena quantidade de incorporação no núcleo e praticamente nenhuma marcação no nucléolo.

lo ao passo que nos sistemas vírus alongados-hospedeira **observaram** incorporação alta de U-5-³H no nucléolo.

LAFLECHE e BOVÉ (1968) verificaram que os locais de incorporação de U-5-³H nas células de couve da China infectadas pelo vírus do mosaico amarelo do nabo e tratadas pelo AMD eram o nucléolo e bolsas citoplasmáticas situadas entre os cloroplastos. LAFLECHE e BOVÉ (1971) e LAFLECHE et alii (1972) complementando o estudo anterior investigaram a cinética de incorporação de U-5-³H e verificaram que o sistema plastidial participa da replicação do RNA do "turnip yellow mosaic virus"(TYMV).

Os resultados obtidos parecem mostrar que o RNA viral é sintetizado no sistema externo da membrana plastidial e move-se, mais tarde, para o citoplasma ou bolsa citoplasmática na forma de vírus completo.

A interpretação dos autores para este fato é que a alta marcação das cavidades citoplasmáticas no interior dos poliplastos não é a consequência da síntese do RNA viral naquela local, mas indica que estas cavidades fazem papel de alçapão onde os RNAs marcados do TYMV podem ser acumulados em vez de serem liberados para o citoplasma.

WOLANSKI e CHAMBERS (1971) estudando a síntese do RNA do "Lettuce necrotic yellow virus" (LNYV) em tecidos foliares de *Nicotiana glutinosa* L. verificaram que a Uridina - 5-³H estava localizada no núcleo durante o início da infecção sugerindo que o RNA viral é sintetizado e acumulado no núcleo e que a união de RNA com o núcleo-proteína toma lugar nos espaços perinucleares durante o 5º e 6º dia e no 7º dia avança para o citoplasma diminuindo portanto a radioatividade nuclear. Do 7º ao 10º dia aumentou a quantidade de vírus maduros no citoplasma. O mecanismo pelo

qual partículas de vírus incompletas adquirem seus envoltórios protéicos nos espaços perinucleares, é obscuro. Como os vírus completos estão presentes nos espaços perinucleares é possível que partículas incompletas sejam envolvidas por membranas sintetizadas especialmente para este propósito. Se for correta essa interpretação, os ribossomos associados com espaços perinucleares podem participar deste processo.

BASSI e FAVALI (1972) estudando síntese de "maize rough dwarf virus" (MRDV) em tumores de folha de milho, verificaram que a U-5-³H foi incorporada quase que exclusivamente no viroplasma contendo partículas, enquanto nenhuma incorporação foi detectada nas regiões viroplasmáticas livres de partículas de vírus e nas partículas de vírus maduros do citoplasma. A fim de verificar se não somente a reunião mas também a replicação de tal vírus também toma lugar no viroplasma, ou se o núcleo da célula hospedeira está envolvido no estágio inicial do processo, FAVALI et alii (1974) fizeram um estudo auto-radiográfico com tumores de nervuras de folhas e tumores de raízes de milho verificando que as duas amostras apresentaram os mesmos resultados. As regiões viroplasmáticas contendo vírus incompletos estavam marcadas enquanto que nenhuma marcação foi verificado na maioria dos núcleos. As partículas de vírus completas vista fora do viroplasma apresentavam-se sempre sem marcação. Segundo os autores o RNA do MRV é sintetizado no viroplasma e partículas são completadas nesse local para depois passarem vagarosamente para outras partes do citoplasma.

FACIOLI e AUTONEL, (1975) verificaram que em *Chenopodium amaranticolor* infectada com "tobacco necrosis virus" o núcleo, nucléolo e

citoplasma estão envolvidos na síntese de RNA do vírus. Pelas observações os autores sugerem que há possibilidade das partículas de vírus formadas primeiramente no núcleo migrarem para o citoplasma. Os autores deixam bem claro que os cloroplastos não estão envolvidos na síntese deste vírus.

NOGUEIRA e SILVA (1976 e 1976a) no setor de microscopia eletrônica do CENA, obtiveram as primeiras indicações de que a síntese do RNA do VAP ocorria na região núcleo-nucléolo da célula de *Nicotiana tabacum* L., enquanto o RNA "vírus do vira-cabeça" do tomateiro parecia se dar na região citoplasmática, conforme trabalho de NOGUEIRA et alii (1972).

Como se pode verificar, diferentes organelas estão envolvidas na replicação dos vírus vegetais, tornando-se interessante o estudo dos locais de síntese com um grande número de vírus para que se possa ter uma idéia mais completa do assunto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Hospedeira utilizada

No presente estudo, as plantas utilizadas foram as de fumo, *Nicotiana tabacum* L. var. Turkish NN, mantidas em estufas de vidro do Centro de Energia Nuclear na Agricultura.

As plantas escolhidas para inoculação tinham altura de aproximadamente 15 cm e esta foi feita mecanicamente, friccionando-se com o inóculo as folhas novas previamente polvilhadas com carborundum.

Plantas-controle sadias da mesma espécie e no mesmo estágio de desenvolvimento também receberam o mesmo tratamento mecânico, sem o vírus.

O inóculo consistiu de suco obtido pela trituração em almofariz de porcelana, de folhas doentes da mesma espécie anteriormente inoculadas com o VAP tendo-se adicionado àquele suco, solução de tampão fosfato 0,2 M pH 7,2 com sulfito de sódio 0,01 M.

4.2. Preparo de espécime

a) Amostragem

Foram retirados com auxílio de lâmina de barbear pequenos fragmentos de aproximadamente 1 x 2 mm das folhas de fumo sadias e com VAP. Escolheu-se folhas doentes novas com sintomas sistêmicos e folhas sadias também novas para servirem como controle.

b) Prê-tratamento

Fragmentos foliares de fumo sadio e com VAP foram colocados em solução aquosa de AMD (S + AMD; VAP + AMD) com concentração de 75 µg/ml durante 16 horas. Paralelamente fragmentos foliares nas mesmas condições foram tratados durante o mesmo período de tempo, apenas com água bidestilada para servirem como controle (S + H₂O; VAP + H₂O).

A seguir todas as peças foliares foram tratadas com 0,25ml de uma solução de uridina tritiada (atividade específica 29,2 curies/mmol), durante três intervalos de tempo, 3, 5 e 9 horas. Após estes intervalos as amostras foram lavadas três vezes com tampão fosfato 0,15M pH 7,2 durante 1 hora e mantidas a 4°C nesse período.

c) Tratamento usual para microscopia eletrônica

1. Fixação - Após as lavagens foi feita a fixação dos espécimes com glutaraldeído 3% em tampão fosfato 0,05 M

pH 7,2 durante 2 horas a 4°C.

2. Lavagens - Após fixadas, as amostras foram lavadas com tampão fosfato 0,15 pH 7,2, quatro vezes durante 1 hora.
3. Pós-fixação - O material foi pós-fixado em solução de tetróxido de osmio a 1% em tampão fosfato 0,15 M.
4. Lavagens - Decorrido o período de pós-fixação as amostras sofreram três lavagens com o tampão fosfato 0,15 M pH 7,2 num total de trinta minutos.
5. Desidratação - As peças foram desidratadas em gradientes de concentrações crescentes de acetona: água(30-50-70-90-100%), permanecendo em cada etapa dez minutos. A seguir foram submetidas a 3 banhos de vinte minutos cada um em acetona pura.
6. Infiltração - A infiltração das peças com a resina Epon 912 (Luft 1961) obedeceu três etapas que representam gradientes de resina em acetona conforme abaixo esquematizado:
 - 1a. etapa: 50% resina + 50% acetona - 2 horas.
 - 2a. etapa: 75% resina + 25% acetona - 2 horas.
 - 3a. etapa: resina pura = 24 horas no refrigerador.

7. Inclusão - As peças foliares foram colocadas em moldes de borracha apropriados e preenchidos com resina a fim de obter os blocos. Estes foram levados às estufas de 38, 45 e 60°C durante 8 horas, 16 horas e 24 horas, respectivamente.

4.3. Microtomia

Os cortes semifinos e ultrafinos foram obtidos utilizando-se um ultramicrotomo Porter-Blum modelo MT-1, do Setor de Microscopia Eletrônica do CENA. Em ambos os casos operou-se com navalhas de vidro de 6 mm de espessura; as secções semifinas de 0,5 micra foram transferidas para lâminas de vidro previamente limpas com detergentes e solução éter-álcool. A posição dos cortes foi marcada com um círculo do lado oposto da lâmina e a preparação foi secada numa chapa quente (BIENZ, 1977).

Os cortes ultrafinos, de espessura variável entre 60-90 nm foram colocados em grades de cobre de 200 mesh previamente cobertas com películas de colódio e carvão.

4.4. Auto-radiografia

a) Preparo do espécime para microscopia óptica

As lâminas contendo os cortes semifinos foram cobertas com emulsão fotográfica Ilford L4 da seguinte forma: 2 ou 3 gotas de emulsão

liquefeita a 42°C e diluída 1:1 água, foram colocadas com auxílio de uma pipeta de Pasteur ao lado dos cortes e a seguir, com o auxílio da mesma pipeta espalhadas rapidamente sobre a preparação. Imediatamente após a cobertura dos cortes as lâminas foram colocadas verticalmente em caixas pretas vedadas com fita isolante preta e mantidas a 4°C e amostradas durante 7 dias. A auto-radiografia para a microscopia óptica foi usada para estimar o período de exposição da auto-radiografia para a microscopia eletrônica. O tempo em dias necessários para se obter um número de grãos de prata adequado foi multiplicado por 10 para se obter o período de exposição de auto-radiografia para microscopia eletrônica.

b) Preparo do espécime para microscopia eletrônica

Foi utilizado o método da alça. CARO e VAN TUBERGEN (1962) modificado por STEVENS (1966) para fazer a cobertura dos cortes ultrafinos.

As grades cobertas contendo os cortes ultrafinos foram fixadas no topo de pequenos bastonetes de vidro com auxílio de uma cola de borracha apropriada. Toda vidraria que teria contacto com a emulsão fotográfica foi previamente limpa com solução fervente de 15% de H₂O₂ e então lavada com uma boa quantidade de água bidestilada. A cobertura com emulsão foi então feita da seguinte forma: uma alça de aço de 12 mm de diâmetro foi mergulhada na emulsão diluída 1:1 em água bidestilada e mantida a 33°C. O excesso de emulsão foi retirada da alça com um papel absorvente. Esperou-se a gelatina solidificar e então uma monocamada de

emulsão foi aplicada sobre os cortes colocando a alça sobre a grade. As grades cobertas foram mantidas a 4°C numa atmosfera seca em ausência de luz durante 2 meses aproximadamente.

4.5. Técnicas fotográficas

a) Para microscopia óptica

As lâminas contendo os cortes semifinos foram colocadas em caixas de vidro apropriadas e a seguir foram cobertas com o revelador Dektol da Kodak à 22°C durante quatro minutos. Após esse processamento a solução foi descartada e então foi usado o fixador comercial durante 5 minutos, a 22°C.

Após fixação as lâminas foram lavadas com água corrente à mesma temperatura e depois repassadas em água destilada e colocadas para secagem a 37°C.

Após revelação e fixação, os cortes semifinos foram corados com azul de metileno. Gotas de corante foram colocadas sobre os cortes na lâmina e aquecidas durante 1 minuto; após esse tempo as lâminas foram lavadas com água corrente e postas para secagem à temperatura de 37°C.

b) Para microscopia eletrônica

Revelação - As grades contendo os cortes foram colocados

em contacto com o revelador Microdol X da Kodak durante 5 minutos, a 22°C.

Após uma lavagem de poucos segundos as grades contendo os cortes foram colocadas no fixador tiosulfato de sódio 3% em água a 22°C, durante 2 minutos e 45 segundos. Após fixação seguiu-se o seguinte esquema de tratamento:

- 3 lavagens de 10 minutos com água bidestilada.
- 1 lavagem com água bidestilada durante 30 minutos com temperatura controlada a 37°C.
- 1 lavagem com ácido acético 4% em água a 37°C.
- 3 lavagens de 5 minutos cada com água bidestilada a temperatura ambiente.

Após a remoção da gelatina pela técnica anterior os cortes foram coloridos com acetato de uranila 2,5% em água durante 6 minutos, lavados 60 vezes com água bidestilada, e coloridos com citrato de chumbo, segundo REINOLDS (1962), durante 4 minutos e novamente lavados com água bidestilada.

Microscopia eletrônica - Os cortes foram examinados com o microscópio eletrônico Elmiskop IA da Siemens operando a 80.000 volts.

As fotomicrografias em negativo foram obtidas utilizando-se no aparelho chapas fotográficas tipo Projeter Slide Plates da Kodak de 6,5 x 9 cm.

4.6. Determinação das áreas celulares e seus componentes e análises quantitativas dos grãos de prata

1. Foram preparados diversos quadrados em plásticos transparente subdivididos em quadrados unitários, cujos lados correspondiam a $0,3 \mu$ das eletrofotomicrografias obtidas com diversos aumentos. Estes quadrados foram utilizados para as medidas das áreas das células e seus componentes bem como para amostragem do número de grãos de prata reduzida.
2. O número de quadrados contidos nas células ou nas organelas foi multiplicado por $0,09 \mu^2$.
3. A fim de proceder a contagem do número de grãos de prata os quadrados foram colocados sobre a eletrofotomicrografias contando-se os grãos de prata reduzida coincidentes com os pontos de cruzamento.
4. Anotou-se o número de grãos de prata para os diversos componentes celulares de cada tratamento e obteve-se o número médio por componente.
5. Foram feitas medidas de áreas de secções de setenta células correspondentes aos tratamentos S + H₂O, S + AMD, VAP + H₂O e VAP + AMD. Destas, quarenta foram tomadas

ao acaso sendo dez para cada um dos quatro tratamentos. Em seguida esses dados foram submetidos ao teste F para verificar o efeito dos tratamentos sobre as áreas celulares.

6. Posteriormente obteve-se a área representativa de todas as células, calculando-se a média daquelas quarenta células.

7. Para determinar as áreas médias das organelas, seis células de cada tratamento foram tomadas ao acaso, e as áreas de suas respectivas organelas foram medidas. A seguir aplicou-se o teste F, com a finalidade de analisar o efeito dos tratamentos sobre a área das organelas. A média das áreas das organelas dos quatro tratamentos foi tomada como representativa dessas organelas.

8. O número médio de mitocôndrios e cloroplastos por célula representa a média dessas organelas em cinquenta células

9. O número médio de grãos de prata existente em cada organela dividido pelas suas respectivas áreas médias forneceu o número médio de grãos de prata por unidade de área (densidade).

5. RESULTADOS

A análise estatística das fotomicrografias das áreas das secções das células dos quatro tratamentos mostrou não haver diferença significativa pelo teste F, a nível de 1% de probabilidade.

Assim, independente dos tratamentos, foi obtida a média das áreas de secções de quarenta células escolhidas ao acaso (Tabela 1) considerada como representativa das áreas celulares.

Tabela 1 - Análise do efeito dos tratamentos sobre as áreas das células foliares de fumo sadio (S) e doente (VAP) pelo teste F.

Área das células (em μ^2)			
S + H ₂ O	S + AMD	VAP + H ₂ O	VAP + AMD
22,01	25,40	26,14	20,88
24,43	34,88	26,94	28,30
25,36	59,73	38,11	30,19
49,44	66,89	42,73	35,85
67,65	238,99	59,15	50,05
83,84	242,14	86,79	87,42
172,95	488,05	91,19	96,33
350,18	544,65	224,53	122,64
472,30	551,57	276,42	231,49
599,80	572,95	365,41	349,06

Soma total = 6.982,83

Média = 174,57

Teste F = 2,04 não significativo a 1% de probabilidade.

As médias das áreas das organelas de seis células de cada tratamento tomadas ao acaso e os respectivos testes F se encontram na Tabela 2. Não tendo sido encontrada diferença estatística a nível de 1%, admitiu-se que a média das áreas era representativa de cada organela para todos os tratamentos.

Tabela 2 - Análise do efeito dos tratamentos sobre as áreas médias das organelas das células foliares de fumo pelo teste F.

Tratamento	Núcleo área (μ^2)	Nucléolo área(μ^2)	Mitocôndrio área (μ^2)	Cloroplasto área (μ^2)
S + H ₂ O	8,70	2,84	0,31	6,30
	6,39	3,28	0,42	3,40
	19,58	3,23	0,36	1,40
	25,32	3,55	0,39	4,64
	17,83	4,73	0,72	5,86
	5,36	2,57	0,40	7,68
S + AMD	30,01	0,68	0,63	2,56
	24,65	5,22	0,34	7,79
	3,99	3,58	0,53	6,83
	7,44	2,45	0,19	7,58
	14,17	4,23	0,31	7,80
	12,37	4,64	0,32	5,94
VAP + H ₂ O	22,01	2,03	0,60	2,76
	33,63	2,32	0,59	6,07
	18,92	1,58	0,38	4,55
	10,32	1,73	0,22	4,73
	31,31	7,25	0,31	2,13
	24,47	0,87	0,66	7,14
VAP + AMD	17,20	0,77	0,24	6,08
	14,69	0,80	0,22	5,75
	16,80	6,63	0,36	5,33
	14,96	3,11	0,46	5,56
	11,37	4,64	0,31	5,65
	17,69	4,95	0,28	3,70
Total	409,18	77,68	9,55	127,23
Média	17,05	3,24	0,40	5,30
Teste F	1,83 ns	0,28 ns	1,16 ns	1,17 ns

O número médio de mitocôndrios e cloroplastos encontrado por célula foi 5,5 e 9,16, respectivamente.

Na Tabela 3 encontram-se os resultados das áreas médias de cada organela, número médio de organela por célula e área total da célula e organelas.

Tabela 3 - Áreas e quantidade de organelas da célula foliar padrão de *Nicotiana tabacum* L. var. Turkish NN.

Célula e seus constituintes	Área média (μ^2)	Nº médio de or- ganelas/célula	Área total da célula e orga- nelas (μ^2)
Célula	174,57	-	174,57
Nucléolo	3,24	1,00	3,24
Núcleo + Nucléolo	17,05	1,00	17,05
Núcleo	13,81	1,00	13,81
Citoplasma ^{a/}	124,71	1,00	124,71
Mitocôndrio	0,40	9,16	3,66
Cloroplasto	5,30	5,50	29,15

^{a/} Na categoria de citoplasma foram incluídas as demais organelas.

As contagens dos grãos de prata de aproximadamente 3.200 estruturas celulares dos quatro tratamentos, nos três períodos de incubação com U-5-³H assim como o número de grãos de prata por estrutura estão nas Tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4 - Médias das contagens dos grãos de prata em células foliares de fumo tratadas com uridina tritiada durante 3 horas.

Tratamento	Médias dos grãos de prata por organelas					Número de organelas examinadas
	Núcleo	Núcleo-lo	Cloro-plasto	Mitocôndrio	Cito-plasma	
Sadio com H ₂ O	55,32	21,08	2,21	0,49	9,45	330
Sadio com AMD	6,99	0,33	0,28	0,10	1,04	72
VAP com H ₂ O	73,27	20,30	2,06	0,58	4,68	224
VAP com AMD	12,75	0,50	0,12	0,13	1,00	58

Tabela 5 - Médias das contagens dos grãos de prata em células foliares de fumo tratadas com uridina tritiada durante 5 horas.

Tratamento	Médias dos grãos de prata por organelas					Número de organelas examinadas
	Núcleo	Núcleo-lo	Cloro-plasto	Mitocôndrio	Cito-plasma	
Sadio com H ₂ O	25,63	28,81	1,85	0,21	8,06	360
Sadio com AMD	0,33	0,00	0,13	0,00	0,09	441
VAP com H ₂ O	30,65	12,11	1,67	0,04	4,48	666
VAP com AMD	14,88	6,22	1,32	0,20	3,37	524

Tabela 6 - Médias das contagens dos grãos de prata em células foliares de fumo tratada com uridina tritiada durante 9 horas.

Tratamento	Médias dos grãos de prata por organelas					Número de organelas examinadas
	Núcleo	Núcleo-lo	Cloro-plasto	Mitocôndrio	Cito-plasma	
Sadio com H ₂ O	19,47	25,54	1,87	0,05	4,63	160
Sadio com AMD	1,70	0,10	0,23	0,00	0,40	124
VAP com H ₂ O	19,62	11,25	0,68	0,12	3,16	145
VAP com AMD	12,58	2,25	0,77	0,15	2,50	92

O número médio de grãos de prata por unidade de área (densidade) para os quatro tratamentos nos três períodos de incubação com U-5-³H, encontram-se nas Tabelas 7, 8 e 9.

Tabela 7 - Número médio de grãos de prata por unidade de área das organelas de células foliares de fumo tratadas com uridina tritiada durante 3 horas.

Tratamento	Média dos grãos de prata/ μ^2				
	Núcleo	Nucléolo	Cloroplasto	Mitocôndrio	Citoplasma
Sadio com H ₂ O	4,00	6,51	0,42	1,22	0,07
Sadio com AMD	0,51	0,10	0,05	0,25	0,00
VAP com H ₂ O	5,30	6,26	0,39	1,45	0,04
VAP com AMD	0,92	0,15	0,02	0,32	0,00

Tabela 8 - Número médio de grãos de prata por unidade de área das organelas de células foliares de fumo tratadas com uridina tritiada durante 5 horas.

Tratamento	Média dos grãos de prata/ μ^2				
	Núcleo	Nucléolo	Cloroplasto	Mitocôndrio	Citoplasma
Sadio com H ₂ O	1,85	8,89	0,35	0,52	0,06
Sadio com AMD	0,02	0,00	0,02	0,01	0,72 x 10 ⁻³
VAP com H ₂ O	2,22	3,74	0,31	1,00	0,03
VAP com AMD	1,08	1,92	0,25	0,50	0,03

Tabela 9 - Número médio de grãos de prata por unidade de área das organelas de células foliares de fumo tratadas com uridina tritiada durante 9 horas.

Tratamento	Média dos grãos de prata/ μ^2				
	Núcleo	Nucléolo	Cloroplasto	Mitocôndrio	Citoplasma
Sadio com H ₂ O	1,41	7,88	0,35	0,10	0,04
Sadio com AMD	0,12	0,05	0,04	0,01	0,30 x 10 ⁻²
VAP com H ₂ O	1,42	3,47	0,13	0,30	0,02
VAP com AMD	0,91	0,69	0,14	0,37	0,02

A Figura 4 foi construída com a soma dos valores das densidades de todas as organelas para os tratamentos S + H₂O e VAP + H₂O durante 3, 5 e 9 horas de incubação com U-5-³H.

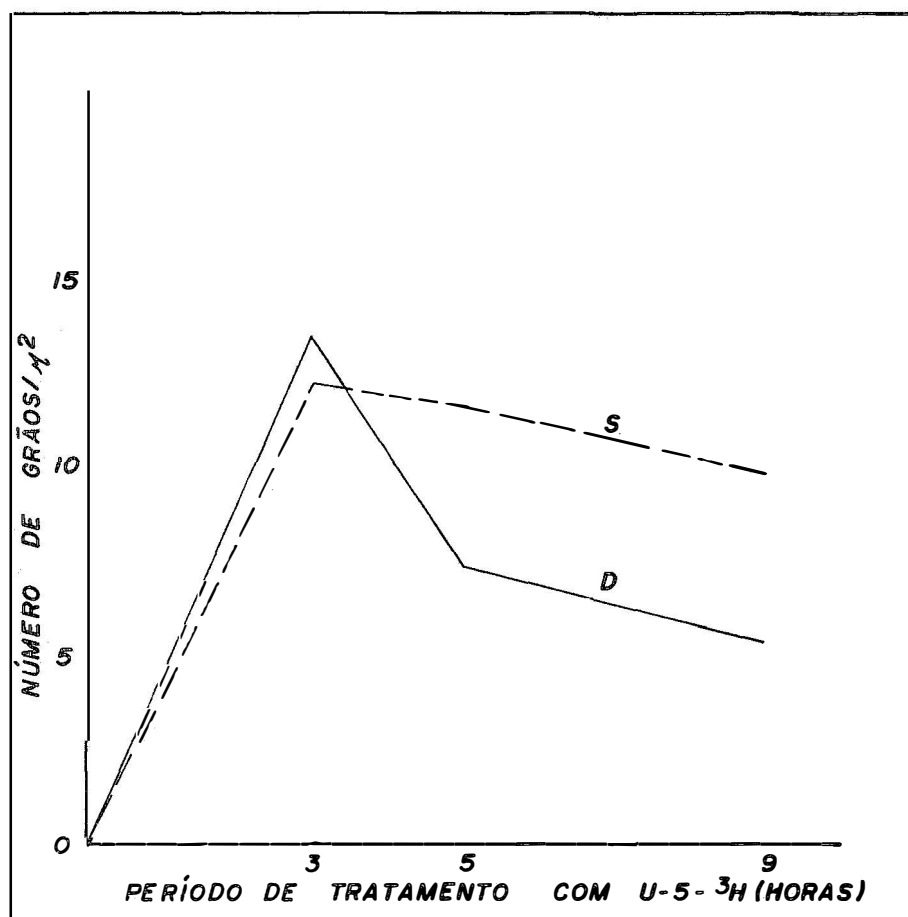


Figura 4 - Curvas das densidades de grãos de prata obtidas em fotomicrografias de células de fumo sadias (S) e afetadas pelo VAP (D) pré-tratadas com água (16 horas) e U-5-³H (3, 5 e 9 horas).

A Figura 5 foi construída de maneira semelhante à figura anterior para estudar a síntese de RNA das células sadias (S) e afetadas pelo VAP (D) tratadas com AMD.

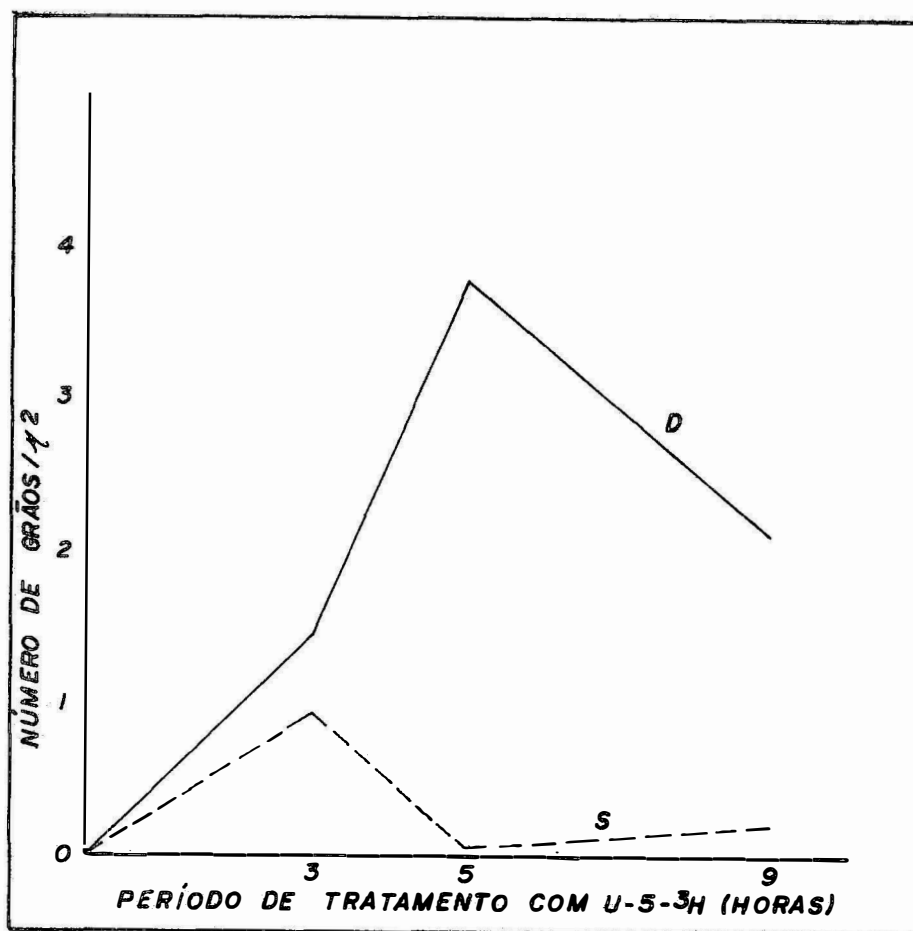


Figura 5 - Curvas das densidades dos grãos de prata obtidas em fotomicrografias de células de fumo sadias e afetadas pelo VAP, pré-tratadas com AMD (16 horas) e U-5- 3 H (3, 5 e 9 horas).

Para se poder examinar a síntese de RNA no núcleo, nucléolo e citoplasma com maior detalhe, foram construídas as Figuras 6 e 7 com os valores das densidades (Tabelas 7, 8 e 9) das organelas referentes as células sadias e doentes, tratadas com AMD. A fim de simplificar a análise foram colocados na categoria de citoplasma os valores das densidades encontradas no citoplasma, nos cloroplastos e mitocôndrios.

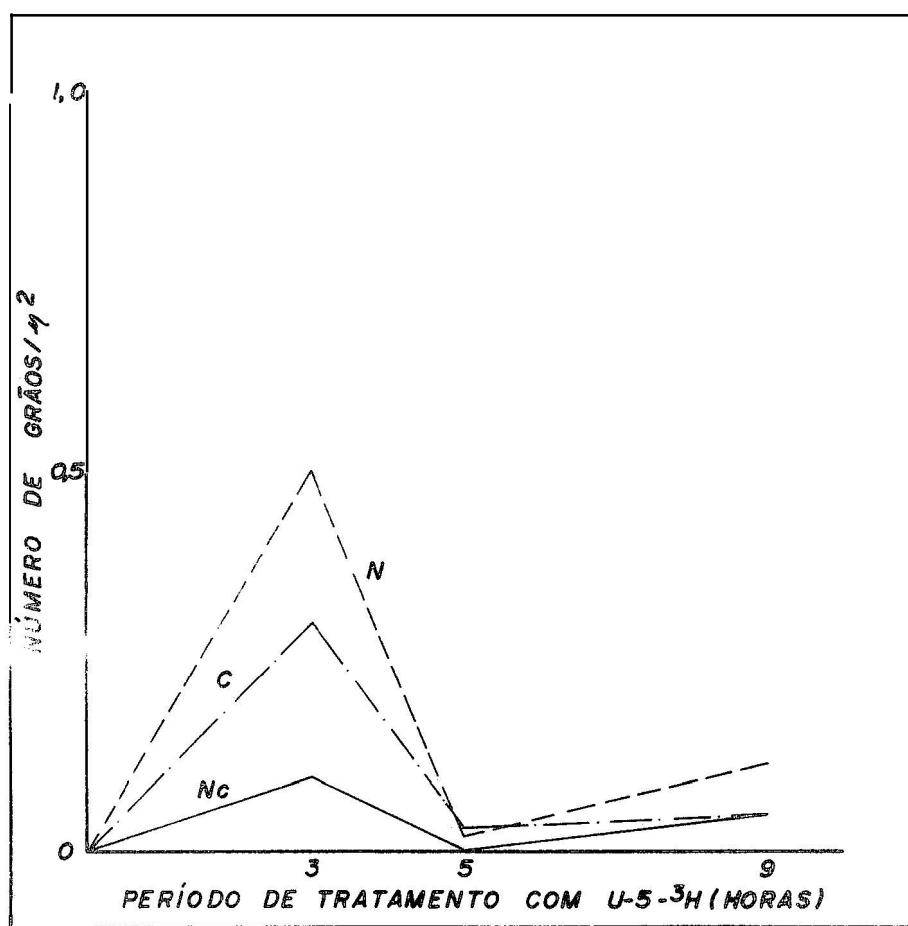


Figura 6 - Curvas das densidades dos grãos de prata do núcleo (N), nucléolo (Nc) e citoplasma (C) obtidas em fotomicrografias de tecido foliar de fumo sadio pré-tratado com AMD (16 horas) e U-5-³H (3, 5 e 9 horas).

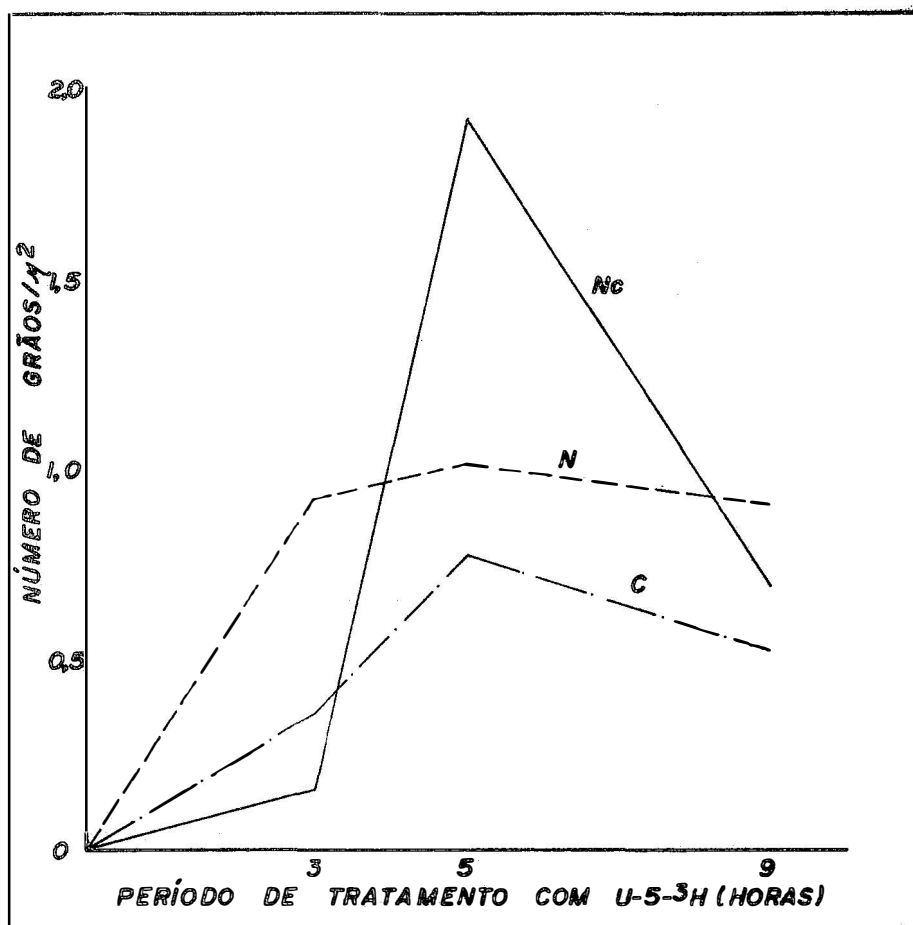


Figura 7 - Curvas das densidades dos grãos de prata do núcleo (N), nucléolo (Nc) e citoplasma (C) obtidas em fotomicrografias de células foliares de fumo afetadas pelo VAP pré-tratadas com AMD (16 horas) e U-5-³H (3, 5 e 9 horas).

A fim de evitar o efeito dos eventuais grãos de prata das células sadias tratadas com AMD nas contagens dos grãos de prata do RNA viral do núcleo, nucléolo e citoplasma foi construída a Figura 8 com as devidas correções. Os valores utilizados para construção da Figura 8 representam a diferença entre os obtidos nas organelas de células afetadas pelo VAP (VAP + H₂O) e os das respectivas organelas de células sadias tratadas com AMD (S + AMD).

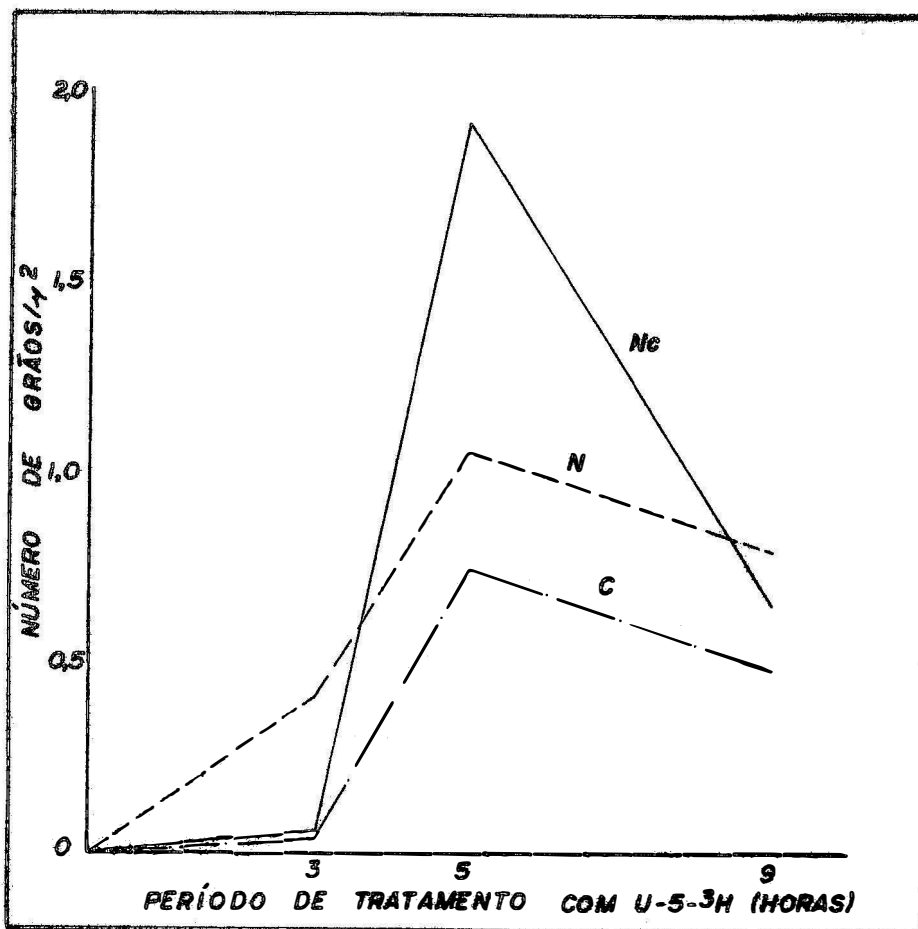


Figura 8 - Curvas das densidades dos grãos de prata de fotomicrografias do núcleo (N), nucléolo (Nc) e citoplasma (C) de células foliares de fumo afetadas pelo VAP, corrigidas com os valores correspondentes das organelas das células sadias pré-tratadas com AMD (16 horas) e U-5-³H (3, 5 e 9 horas).

A Figura 9 mostra as porcentagens de grãos do núcleo, nucléolo e citoplasma em relação ao número total dos grãos das células tratadas e controle. O histograma foi construído com dados da Tabela 5.

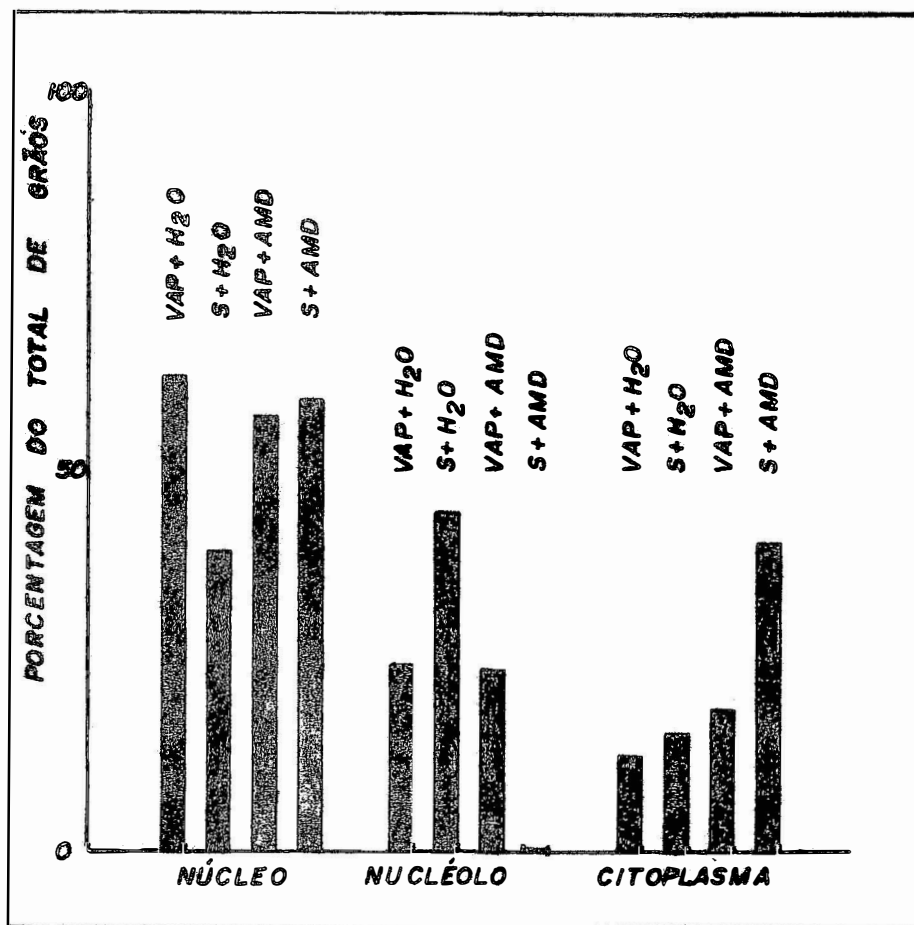


Figura 9 - Histograma mostrando as porcentagens dos grãos de prata do núcleo (N), nucléolo (Nc) e citoplasma (C) em relação ao número total de grãos da célula para cada tratamento (Porcentagens obtidas com os dados da Tabela 5).

Nas Figuras 10, 11 e 12 encontram-se eletrofotomicrografias ilustrando a associação das partículas com o mitocôndrio e eletrofotomicrografias representativas da densidade de grãos de prata em células foliares de fumo submetidas aos tratamentos S + H₂O, S + AMD, VAP + H₂O e VAP + AMD.

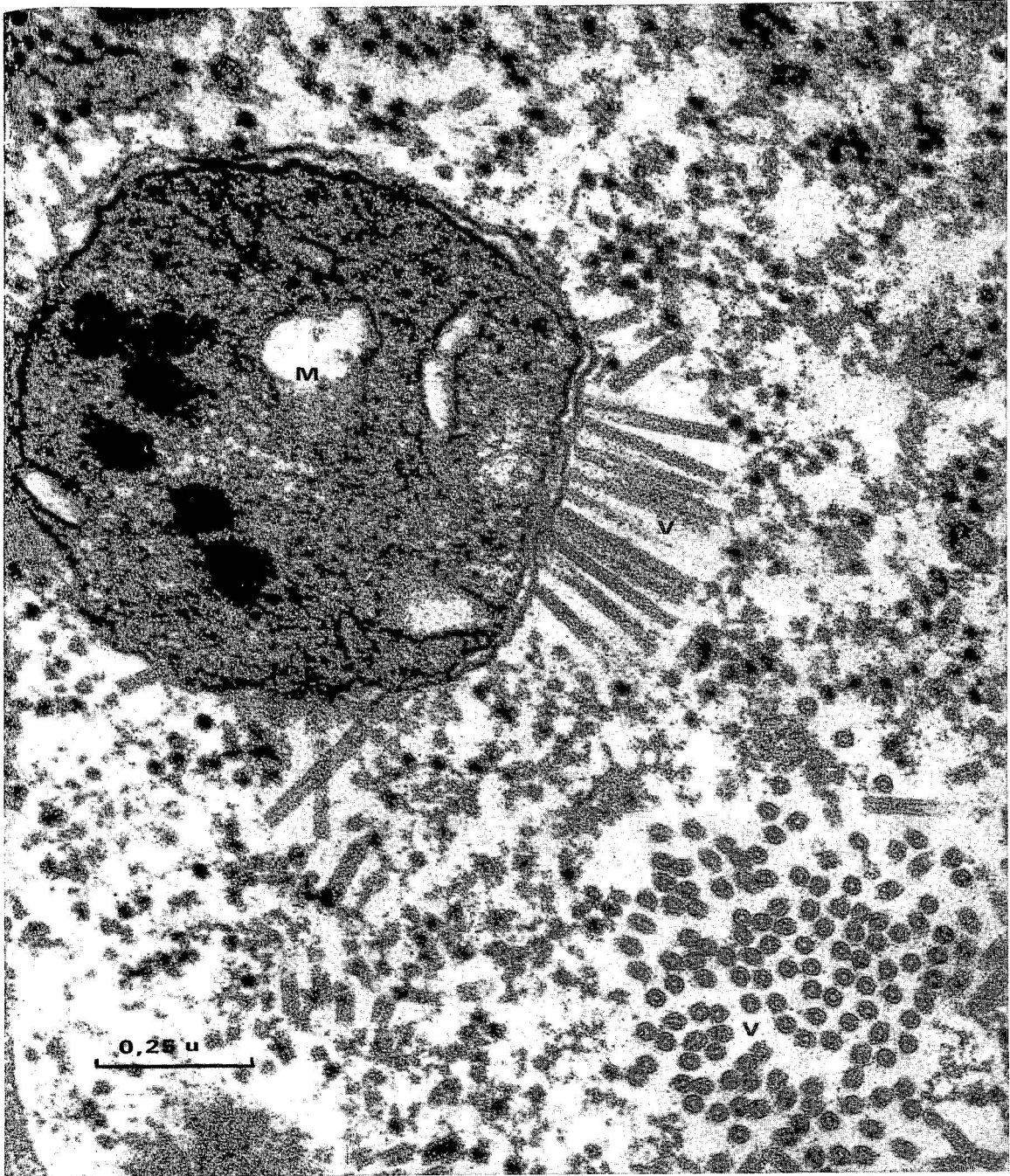


Figura 10 - Dois aspectos da associação das partículas de vírus do anel do pimentão com mitocôndrios de células de folha de fumo. Chave para abreviações das Figuras 10 a 12: M - Mitocôndrio; V - Vírus; N - Núcleo; Nc - Nucléolo; Cl - Cloroplasto; gp - grãos de prata.

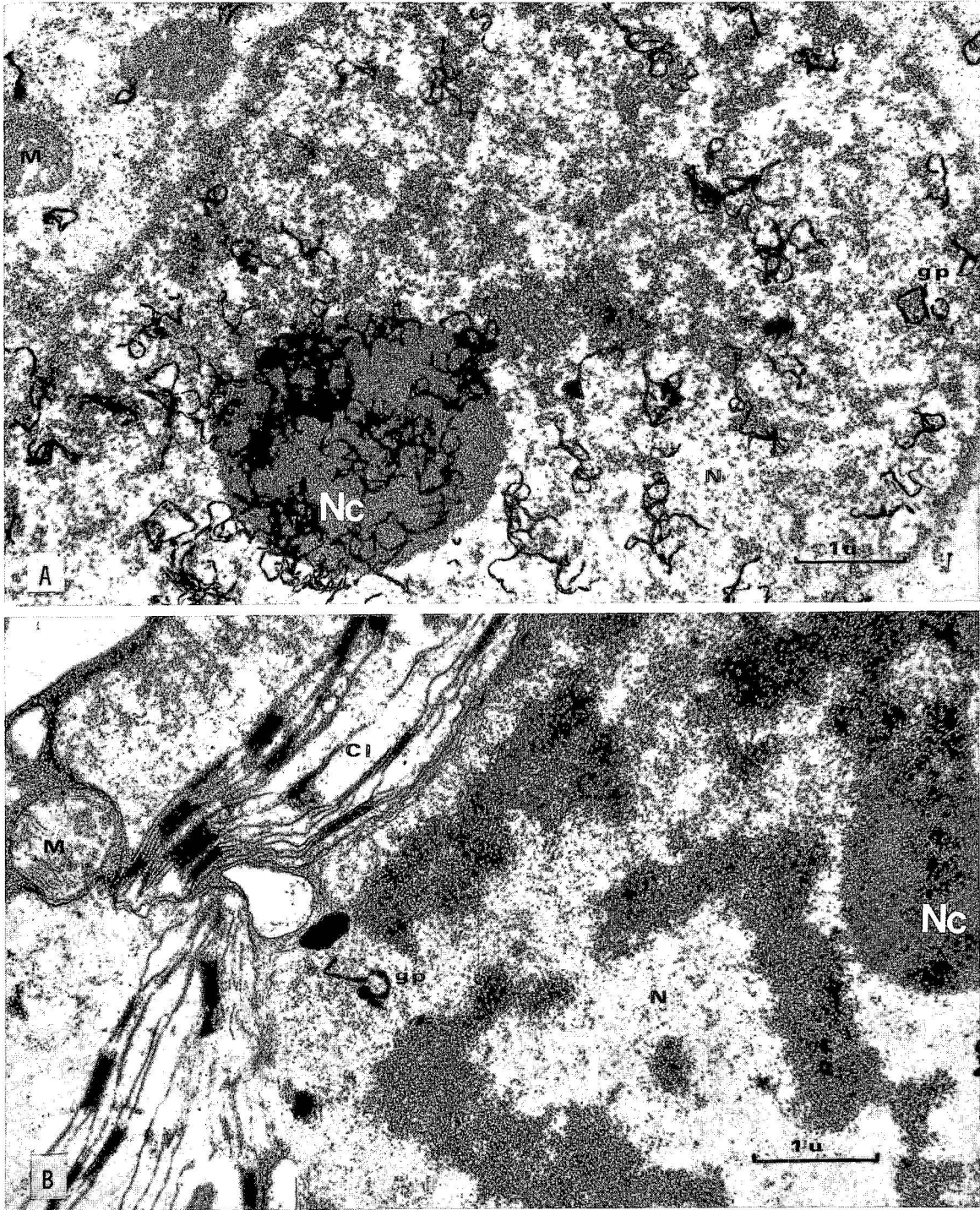


Figura 11 - Grãos de prata obtidos no tratamento de célula sadia de folha de fumo pré-tratada com água (A) ou actinomocina D(B) durante 16 horas e uridina tritiada durante 5 horas.

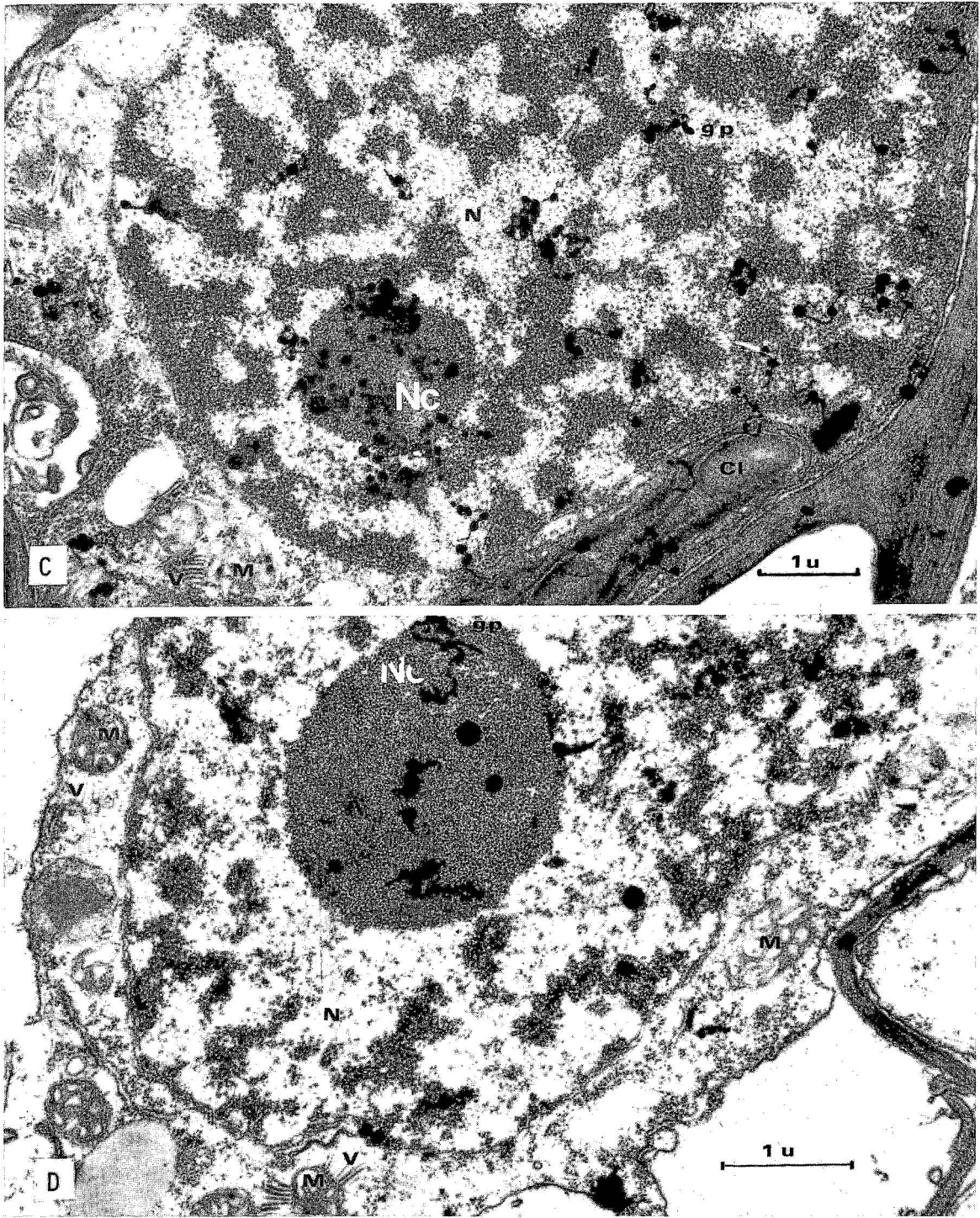


Figura 12 - Grãos de prata obtidos no tratamento de célula de folha de fumo afetada pelo vírus do anel do pimentão pré-tratada com água (C) ou actinomicina D (D) durante 16 horas e uridina - 5-³H durante 5 horas.

6. DISCUSSÃO

As pesquisas no sentido de conhecer o local e a forma de replicação do RNA dos vírus utilizando marcação com radioisótopos são relativamente recentes. Por esse motivo menos do que uma dezena de vírus de planta tem o seu mecanismo de replicação conhecido. Ao que parece os trabalhos dentro desse campo até agora assinalaram cerca de cinco locais intracelulares de síntese de RNA de vírus de planta.

Na presente tese foi investigado o sítio de multiplicação do RNA do VAP através da associação de técnicas auto-radiográficas e microscopia eletrônica, com o propósito de contribuir para o conhecimento dos locais de síntese de RNA dos vírus de planta. Ao que tudo indica esses conhecimentos tornam-se extremamente interessantes para estudos de natureza bioquímica relacionados com o sistema de enzimas envolvido no processo de síntese viral e possivelmente um enfoque mais racional de controle desses agentes patogênicos.

Com respeito aos resultados, o princípio adotado foi o de correlação entre o número de grãos de prata e a concentração de $U-5-^3H$

nas moléculas dos RNAs das células estudadas, princípio esse admitido de de uma maneira geral pelos pesquisadores que trabalham com essas técnicas.

Para a quantificação foi escolhido o método direto de contagens dos grãos de prata por unidade de área após um levantamento prévio das áreas das células, e das organelas de material sadio e doente, tratado ou não com AMD e posteriormente incubado com U-5-³H durante 3, 5 e 9 horas.

Os valores das áreas das células e seus componentes foram submetidos a teste estatístico F para verificar possíveis influências dos tratamentos sobre as áreas encontradas. Não tendo sido observado diferenças significativas entre os valores das áreas analisadas estatisticamente a nível de 1% de probabilidade, admitiu-se que as áreas médias das células e seus constituintes podiam ser tomadas como representativas para a determinação da densidade de grãos de prata.

As médias das contagens dos grãos de prata por célula indicam que de uma maneira geral a inibição do AMD sobre a síntese dos RNAs da célula hospedeira é bastante pronunciada das nossas condições experimentais e que seu maior efeito é detectado quando as células são incubadas com U-5-³H durante 5 horas.

Com a finalidade de se fazer comparações mais precisas, foram calculadas as densidades de grãos de prata [contendo as médias dos grãos de prata por μ^2 (densidade)] para os constituintes celulares e através do exame das mesmas pode-se notar que os sítios celulares com densidades de grãos mais elevados são o núcleo e o nucléolo. As densidades dos

grãos nos mitocôndrios das células doentes, parecem menos expressivas e refletem, em geral, o teor de grãos existentes no núcleo e nucléolo.

Focalizando assim apenas as densidades dos grãos no núcleo e nucléolo das células doentes observa-se que as mesmas tem uma tendência comum de diminuir com o período de 3, 5 e 9 horas de incubação em U-5-³H na ausência de AMD. Contudo sob ação da AMD, pode-se notar que enquanto as variações das densidades no núcleo das células com VAP é relativamente constante nos três períodos de incubação, as densidades do nucléolo apresentam um máximo no período de 5 horas. Neste período de incubação é possível que o suprimento do substrato para a replicase do VAP ou a atividade da replicase ou ambos, sejam maiores.

Estes resultados sugerem que os RNAs do VAP encontram no nucléolo o seu provável local de biossíntese, aspecto esse em que diferem dos RNAs do "broad bean mottle virus" DE ZOETEN e SCHLEGEL (1967); "turnip yellow mosaic virus" LAFLECHE e BOVÉ (1971); "lettuce necrotic yellow virus" WOLANSK e CHAPMANS (1971); "maize rough dwarf virus" FAVALI et alii (1973) que se multiplicam no citoplasma, membrana plastidial, núcleo e viroplasma, respectivamente. É interessante lembrar que o RNA do "tobacco mosaic virus" SMITH e SCHLEGEL (1964) e (1965) e o "clover yellow mosaic virus" SMITH e SCHLEGEL (1965) e DE ZOETEN e SCHLEGEL (1967) se replicam também no nucléolo.

Do outro lado esses resultados vêm ressaltar a eficiência do AMD aplicado nas concentrações e condições dos experimentos levados a efeito nesta tese. Especialmente no intervalo de 5 horas pós-tratamento com AMD, o bloqueio de síntese de RNAs normais parece próximo de 100%.

Das indicações encontradas na literatura acredita-se que a AMD é um antibiótico que pela sua configuração espacial e distribuição de cargas se ajusta com os segmentos do DNA que contêm desoxiguanina. Os anéis de fenoxasona do AMD parecem se dispor paralelamente aos anéis planares do mencionado desoxinucleotídeo e as forças complementares que mantêm fixo o AMD no DNA são principalmente as pontes de hidrogênio.

Nestas condições a polimerase dependente do DNA não pode exercer sua atividade de produzir ácidos nucléicos pela polimerização de nucleotídeos. TAMAOKI e MUELLER (1962); MERITS (1963).

O princípio seletivo da AMD se deve ao fato que enquanto a AMD age pelo bloqueio das polimerases da célula hospedeira não afeta diretamente a replicase do ácido nucléico viral por não encontrar condições de ajuste molecular como no DNA.

É interessante lembrar que dependendo das condições, a AMD pode atuar indiretamente sobre a atividade das replicases, pois o RNA mensageiro pode ser um dos fatores para a redução de síntese de proteínas, provocando distúrbios que favorecem mais o catabolismo que o anabolismo celular.

SOBELL e JAIN (1972) tecendo comentários sobre o efeito ressalta a semelhança entre a ação do AMD e os inibidores regulatórios dos procariotas que, pelo acoplamento sobre uma região do DNA, podem controlar a síntese de uma cadeia de genes adjacentes ou não.

Embora a eficiência de bloqueio da AMD tenha sido constatada em altas porcentagens para outros vírus, segundo SANGER e KNIGHT(1963);

SMITH e SCHLEGEL (1964) e (1965); LAFLÈCHE e BOVÉ (1968) e (1971); WOLANSKI e CHAMBERS (1971); FACIOLI e RUBIES-AUTONEL (1975), já tem sido observadas porcentagens mais modestas explicadas de diversas maneiras mas que em parte pode ser devido à capacidade da célula em produzir compostos complexantes com o antibiótico e até mesmo destruição ou desnaturação da molécula do AMD.

Pode-se então observar pelas tabelas 7, 8 e 9 que o período de 5 horas com U-5-³H foi que revelou maior inibição para o tratamento "sadio com água" e maiores valores para o tratamento "VAP com AMD". Por esse motivo os dados do experimento com 5 horas de tratamento com U-5-³H foram considerados os mais representativos.

Para observar o comportamento da incorporação de U-5-³H pelas células de tecidos sadios e doentes pré-tratados em água nos períodos de 3, 5 e 9 horas foram projetadas em coordenadas cartesianas as densidades dos grãos daquelas células somando-se as densidades das organelas versus os tempos de tratamento. Os dados da figura 4 parecem indicar que a célula doente incorporou U-5-³H com maior velocidade no período inicial. Nos períodos seguintes a densidade parece sofrer redução em relação à sadia. Essa situação no entanto não está bem esclarecida e só um teste estatístico com um número razoável de repetições poderia tornar mais segura a afirmação de que há uma diferença real na incorporação de U-5-³H pelas células sadias e doentes.

O curso dos processos de incorporação de U-5-³H durante 3, 5 e 9 horas pelas células sadias e doentes (Figura 5) submetidas a tratamento com AMD parece indicar uma defasagem entre elas que pode estar re-

fletindo diferenças entre a permeabilidade celular ao AMD observada por LAFLECHE e BOVÉ (1968). Contudo a densidade de grãos nos tratamentos VAP + AMD, embora menor que a do tratamento VAP + H₂O mostra que a incorporação de U-5-³H no ácido nucléico do VAP é bem maior do que nos ácidos nucléicos da célula sadia igualmente tratada. Esses resultados sugeriram um exame mais pormenorizado das densidades do núcleo, citoplasma e nucléolo tanto da célula sadia como da doente pré-tratada com AMD.

A Figura 6 revela que em 3 horas de incorporação de U-5-³H quando ocorre um máximo de densidades para as três organelas, o número de grãos/ μ^2 do nucléolo é bem menor que o do núcleo e mesmo que o do citoplasma. No período de 5 horas de incorporação as densidades dessas organelas são extremamente baixas tendo o nucléolo um valor nulo.

O padrão das curvas da Figura 7 para as densidades de grãos das organelas de células doentes pré-tratadas com AMD já se apresenta diferente não só com relação a magnitude das densidades como com respeito a uma incorporação maior no nucléolo, seguida pela do núcleo e citoplasma. É interessante observar que a curva de incorporação de U-5-³H no núcleo apresenta um comportamento aparentemente diferente no período de 3 horas.

Contudo, para aliviar os possíveis efeitos de incorporação de U-5-³H expúrias em outros tipos de ácidos nucléicos foi decidido corrigir as densidades do núcleo, nucléolo e citoplasma através da subtração das densidades correspondentes encontradas para a célula sadia tratada com AMD e construir a Figura 8.

Com esse expediente pode-se observar que a curva do núcleo se apresenta com padrão semelhante as do nucléolo e citoplasma embora com densidades de grãos maior que as do citoplasma e menor que as do nucléolo.

Durante o curso dos experimentos nos três períodos de incubação com U-5-³H notou-se que o período de 5 horas era o que dava maior número de grãos de prata por organelas e a maior inibição de incorporação de U-5-³H.

Por esse motivo maior número de repetições foi feito nesse período a fim de que se pudesse obter densidades de grãos de prata mais representativas, visando assim um melhor critério de discriminação da organela responsável pela síntese de ácido nucléico viral.

Isto posto, foi construído com os dados do período de 5 horas de incubação com U-5-³H um histograma com as porcentagens dos grãos de prata do núcleo, nucléolo e citoplasma em relação ao número total de grãos da célula para cada tratamento. Os resultados deste histograma mostram que o nucléolo das células afetadas pelo VAP e inibidas pela AMD foi a estrutura subcelular que apresentou maior densidade com relação ao nucléolo da célula sadia submetida ao mesmo tratamento. As outras organelas a julgar pelo número de grãos não incorporaram mais U-5-³H que as células sadias parecendo indicar que os grãos encontrados nelas deveriam ter se translocado a partir do nucléolo ao longo do processo de síntese do ácido nucléico do VAP naquela organela. Exceção à essa regra parece ocorrer entre VAP + H₂O e S + H₂O que serviram como controle.

Não tendo sido encontradas pelo método usado nesta tese in-

dicações de biossíntese de ácido nucléico em outra estrutura subcelular parece razoável admitir que os ácidos nucléicos da partícula pequena (55nm) e grande (200 nm) podem ser sintetizados no nucléolo. Esta hipótese que precisaria ser melhor esclarecida é sugerida pelo fato de que em recentes observações ao microscópio eletrônico, têm sido encontradas as partículas pequenas do sistema VAP em células do mesófilo de folha de fumo infectada por esse vírus.

Com finalidade de ilustrar os resultados obtidos ao microscópio eletrônico, apresentamos a Figura 10 mostrando a associação VAP - mitocôndrio.

Na Figura 11 (A) foi apresentada auto-radiografia de um setor da célula sadia sem inibidor (AMD) podendo-se notar que os grãos de prata se concentram no nucléolo, local de síntese de RNA normal.

Na Figura 11 (B) foi apresentado um exemplo em que após diversas tentativas pôde-se encontrar grãos de prata no núcleo de uma célula sadia inibida com AMD. Essa dificuldade de se encontrar grãos de prata em células sadias tratadas com AMD reflete a eficiência do antibiótico em questão em bloquear a síntese dos RNAs normais.

A Figura 12 (C) mostra uma auto-radiografia de uma célula afetada pelo VAP que não tendo sido pré-tratada com AMD apresenta razoável densidade de grãos, especialmente sobre o nucléolo.

Não tendo o poder inibitório do AMD, esta célula devia estar sintetizando ácidos nucléicos normais e ácido nucléico viral. Pelas observações feitas em secções de material deste tratamento no período

de 5 horas em contraposição com as secções de igual tratamento no período de 3 horas parece razoável acreditar que tenha havido translocação de ácido nucleico viral do nucléolo para os mitocôndrios num intervalo de tempo maior que 3 horas.

Em cortes do tratamento VAP + AMD no período de 5 horas foram encontrados nos mitocôndrios associados com partículas de VAP uma densidade de grãos de prata da ordem de 0,5 contra uma densidade de 0,01 dos mitocôndrios do tratamento sadio + AMD (Tabela 8). Supondo que o AMD é capaz de reduzir a incorporação de U-5-³H em ácido nucléico mitocondrial de célula afetada pelo VAP, nas mesmas proporções é razoável acreditar que a maior parte dos grãos sobre os mitocôndrios do VAP + AMD é devido ao ácido nucléico do vírus e não do mitocôndrio, que teria deixado o nucléolo e chegado ao mitocôndrio após 5 horas ou pouco menos.

A Figura 12 (D) ilustra a ocorrência de grãos de prata sobre o nucléolo de uma célula afetada pelo VAP e sob ação da AMD que deve ter bloqueado a síntese dos RNAs normais mas não a do RNA do VAP.

7. CONCLUSÕES

1. O efeito dos tratamentos utilizados sobre as áreas médias das secções das células foliares e as áreas médias de seus constituintes não apresentam diferença estatística significativa a nível de 1% de probabilidade.
2. A densidade dos grãos de prata da célula afetada pelo VAP e tratada com água indica que a síntese de RNA sofre uma redução no período de 3 a 5 horas de incubação com U-5-³H e que a taxa de redução no período de 5 a 9 horas é semelhante entre célula doente e sadia.
3. O tratamento dos tecidos foliares sadios e doentes com AMD revelou que a ação do antibiótico foi seletiva no sentido de inibir a polimerase dependente do DNA e não a replicase do RNA viral, permitindo acompanhar com melhor aproximação o curso da biossíntese do RNA do VAP.

4. O estudo do comportamento individual de três regiões da célula sadia ao tratamento com AMD, mostrou, pela comparação dos números de grãos de prata por unidade de área, que a atividade de síntese do RNA no nucléolo foi a mais inibida pelo antibiótico, seguindo-se a do citoplasma e a do núcleo.

5. As densidades dos grãos de prata das organelas da célula afetada tratada com AMD e corrigidas com respeito às densidades da célula sadia inibida com AMD, mostraram que o curso da biossíntese do ácido nucléico no núcleo (excluindo o nucléolo) e no citoplasma, é bastante semelhante, diferindo do processo biossintético do RNA no nucléolo.

6. Examinando as taxas de síntese do RNA da célula afetada pelo VAP tratada com AMD e corrigida com os respectivos valores da célula sadia nas mesmas condições e no período de 3 a 5 horas, observou-se que a taxa de síntese no nucléolo é aproximadamente três vezes a do citoplasma e a do núcleo sem nucléolo.

7. Os dados da tese sugerem que embora alguma síntese do RNA ou ácidos nucléicos devidos a presença do VAP possa ocorrer no núcleo da célula infectada, o nucléolo é o local principal da biossíntese do RNA do VAP.

8. As auto-radiografias revelaram também que a translocação do RNA marcado do VAP já pode ser observado nas proximidades do mitocôndrio no período de 5 horas de tratamento com U-5-³H.

8. SUMMARY

Location of the replication of the RNA of the Virus Anel do Pimentão (VAP) has been studied using both autoradiograph and electron microscope techniques.

Foliar tissues of *Nicotiana tabacum* L. var. Turkish NN, healthy and infected with VAP, were incubated with Actinomycin D (AMD), or water and then treated with tritiated uridine (specific activity 29.2 Ci/mmol) during three different time intervals - 3, 5 and 9 hours. After being fixed with glutaraldehyde and osmic acid they were dehydrated with 30, 50, 70, 90 and 100% acetone and embeded in Epon resin. The ultra-thin and semi-thin sections were covered with photographic emulsion and after adequate exposure they were developed and examined.

The production of reduced silver grains (grains) due to the incorporation of uridine-5-³H (U-5-³H) in the RNA, made possible countings which, analysed quantitatively, helped in the identification of the location of the replication of the virus RNA.

Results obtained indicated that:

1. The effect of the treatments on the area of the foliar cells and on the area of their constituents presented no significant difference at a level of 1% probability.
2. The silver grain density on VAP infected cell treated with water presented some decrease during 3 - 5 hours incubation with U-5-³H and similar behavior during 5 - 9 hours between healthy and diseased cells.
3. Treatment of healthy and infected foliar tissues with AMD revealed that the action of the antibiotic was selective as far as inhibition of the DNA dependent polymerase and not on the replicase of the virus RNA, allowing to follow with a better approximation, the development of the RNA biosynthesis of the VAP.
4. Study of the response of three regions of a healthy cell to treatment with AMD indicated that the most inhibited activity was the RNA synthesis in the nucleolus, followed by that of the cytoplasm and of the nucleus.
5. The grain density obtained for regions of an infected cell treated with AMD and corrected in relation to the densities of a healthy cell inhibited with AMD, indicated that the biosynthesis of the nucleic acid in the nucleus excluding the nucleolus, and in the

cytoplasm is identical, differing from the biosynthetic process of the RNA in the nucleolus.

6. When studying the rate of the synthesis of the RNA in a cell infected with VAP and treated with AMD and corrected according to the respective values for a healthy cell under same conditions and for a period of 3 - 5 hours, it was observed that the rate of synthesis of the nucleolus is approximately three times that of the cytoplasm and of the nucleus without nucleolus.
7. The data presented suggest that, although some synthesis of the RNA or nucleic acids due to the presence of VAP can occur in the nucleus of an infected cell, the nucleolus is the main place of the biosynthesis of the RNA of the VAP.
8. The autoradiographs revealed that the translocation of the labelled RNA of the VAP can already be noted close to the mitochondria in a period of 5 hours treatment with U-5-³H.

9. LITERATURA CITADA

ALLEN, T.C. Jr. 1963. Electron Microscopy of Tobacco Rattle Type Viruses. *Phytopathology* 53:11-37.

BACHMANN, L. e M.M. SALPETER. 1965. Autoradiograph with the Electron Microscope: A quantitative evaluation. *Lab. invest.* 14:1041-1053.

BALD, J.G. 1964. Cytological Evidence for the Production of Plant Virus Ribonucleic Acid in the Nucleus. *Virology* 22:377-387.

BALD, J.G. 1966. Cytology of Plant Virus Infections. *Advan. Virus Res.* 12:103-125.

BASSI, M. e M.A. FAVALI. 1972. Electron Microscopy of Maize Rough Dwarf Virus Assembly Sites in Maize. Cytochemical and Autoradiographic Observations. *J. Gen. Virol* 16:153-160.

BIENZ, K. 1977. Techniques and Applications of Autoradiography in the Light and Electron Microscope. *Microscopica Acta* 79:1-22.

BLACK, L.M.; C. MORGAN e R.W.G. WYCKOFF. 1950. Visualization of Tobacco Mosaic Virus Within Infected Cells. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 73:119-122.

BLACKETT, N.M. e D.M. PARRY. 1973. A New Method for Analyzing Electron Microscope Autoradiographs Using Hypothetical Grain Distributions. *The Journal of Cell Biol.* 57:9-15.

CAMARGO, I.J., E.W. KITAJIMA e A.S. COSTA. 1969. Vizualization of the Pepper Ringspot in Tomato Pollen. *Phytop. Z.* 64:282-285.

CARO, L.G. e R.P. VAN TUBERGEN. 1962. High Resolution Autoradiography. I. Methods. *J. Cell Biol.* 15:173-188.

COONS, A.H. 1958. Fluorescent Antibody Methods. In: *General Cytochemical Methods*. Ed. Academic Press, New York, 399-422.

COSTA, A.S., KITAJIMA, E.W. e A.R. OLIVEIRA. Virus do Anel do Pimentão: Um Integrante do Grupo do Virus do "Rattle" do Fumo. (Dados não publicados).

DE ZOETEN, G.A. 1966. California Tobacco Rattle Virus, its Intracellular Appearance, and the Cytology of the Infected Cells. *Phytopathology* 56:744-754.

- DE ZOETEN, G.A. e T.A. SHALLA. 1966. Purification and Characterization of California Tobacco Rattle Virus. *Phytopathology* 56:738-743.
- DE ZOETEN, G.A. e D.E. SCHLEGEL. 1967. Nucleolar and Cytoplasmic Uridine-³H Incorporation in Virus Infected Plants. *Virology* 32:416-427.
- DUDMAN, W.F. 1966. Interaction between Gelatin Solutions and Tobacco Mosaic Virus. *Biochim. Biophys. Acta* 120:212-221.
- FACCIOLI, G. e C. RUBIES-AUTONEL. 1975. Incorporation of Uridine-³H into Healthy and Tobacco Necrosis Virus - Infected Mesophyll Cells of *Chenopodium amaranticolor* *Phytopath.* 82:169-174.
- FAVALI, M.A., M.A. BASSI e A. APRIANO. 1974. Synthesis and Migration of Maize Rough Dwarf Virus in the Host Cells: an Autoradiographic Study. *J. Gen. Virol.* 24:263-265.
- HAMILTON, R.I. 1974. Replication of Plant Viruses. In: *Annual Review of Phytopathology* 12:223-245.
- HARRISON, B.D. e I.M. ROBERTS. 1968. Association of Tobacco Rattle Virus with Mitochondria. *J. Gen. Virol.* 3:121-124.
- HAYHDE, F.G.J. e D. QUAGLINO. 1965. Autoradiographic Investigations of RNA and DNA Metabolism of Human Leucocytes Cultured with Phytohemagglutinin; Uridine-5-³H as a Specific Precursor of RNA. *Nature* 205:151-154.
- IE, T.S. 1964. An Electron Microscope Study of Tomato Spotted Wilt Virus in the Plant Cell. *Neth J. Plant Pathol.* 70:114-115.

- JAIN, S.C. e H.M. SOBELL. 1972. Stereochemistry of Actinomycin Binding to DNA. I. Refinement and Further Structural Details of the Actinomycin Deoxyguanosine Crystalline Complex. *J. Mol. Biol.* 68:1-20.
- KITAJIMA, E.W. 1967. Morfologia das Partículas do Vírus do Anel do Pimentão e Ultraestrutura dos Tecidos Infectados. Piracicaba, ESALQ/USP. 54p. (Tese de doutoramento).
- KITAJIMA, E.W.; A.R. OLIVEIRA e A.S. COSTA. 1969. Morfologia das Partículas de Vírus do Anel do Pimentão. *Bragantia* 28:1-22.
- LAFLECHE, D. e J.M. BOVÉ. 1968. Sites d'Incorporation de l'Uridine Tritiée dans les Cellules du Parenchime Foliaire de *Brassica chinensis*, Saines ou Infectées par le Virus de la Mosaïque Jaune du Navet. *C.R. Acad. Sci.* (s.L.) 266:1839-1841.
- LAFLECHE, D. e J.M. BOVÉ. 1971. Virus de la Mosaïque Jaune du Navet: Site Cellulaire de la Replication du RNA Viral. *Physiol. Veg. Paris*, 9:487-503.
- LAFLECHE, D., C. BOVÉ, G. DUPONT, C. MOUCHES, T. ASTIER, M. GARNIER e J.M. BOVÉ. 1972. Site of Viral RNA Replication in the Cells of Higher Plants: TYMV-RNA Synthesis on the Chloroplast Outer Membrane System. In: RNA Viruses. Structure and Function. *FEBS Amsterdam Symp.* 27:43-65.

- LANGENBERG, W.G., SCHLEGEL, D.E. 1967. Autoradiography with ^{135}I -labeled Antibodies as a Means of localizing TMV in Plant Cells. *Virology* 32: 167-171.
- LOCKHART, B.E. e J.S. SEMANCIK. 1968. Inhibition of the Multiplication of a Plant Virus by Actinomycin D. *Virology* 36:504-506.
- LOCKHART, B.E. e J.S. SEMANCIK. 1969. Differential Effect of Actinomycin D on Plant-Virus Multiplication. *Virology* 39:362-365.
- LOEBENSTEIN, G. e B. SELA e T. VAN PRAAGH. 1969. Increase of Tobacco Mosaic Local Lesion Size and Virus Multiplication in Hypersensitive Hosts in the Presence of Actinomycin D. *Virology* 37:42-48.
- LUFT, J.H. 1961. Improvements in Epoxy Resin Embedding Methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9:409-414.
- MARROU, J., G. MARCHOUX e A. MIGLIORI. 1973. Contribution a l'Etude du Virus de la Mosaique du Concombre: Evolution de l'Infection dans des Feuilles de Tabac Traitées par l'Actinomycine D. *Ann Phytopathology* 5:249-253.
- MC WHORTER, F.P. 1965. Plant Virus Inclusions. *Ann. Rev. Phytopathology* 3:287-312.
- MERITS, I. 1963. Actinomycin Inhibition of RNA Synthesis in Rat Liver *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 10:254-259.

- NACHMAN, I., G. LOEBENSTEIN, T. VAN PRAAGH e A. ZELCER. 1971. Increase Multiplication of Cucumber Mosaic Virus in a Resistant Cucumber Cultivar Caused by Actinomycin D. *Physiol. Plant Pathol.* 1:67-71.
- NADLER, N.J. 1971. Interpretation of Grain Counts in Electron Microscope Radioautoradiography. *J. Cell Biol.* 49:877-882.
- NOGUEIRA, N.L., D.M. SILVA e J. MERZEL. 1972. Exame ao Microscópio Eletrônico de Citoradiografias de Folhas de Fumo Afetadas pelos Vírus Vira Cabeça do Tomateiro e do Anel do Pimentão. *Revista da Agricultura XLVII*:197-198.
- NOGUEIRA, N.L. e D.M. SILVA. 1976. Incorporação Intracelular da Uridina no RNA do Vírus do Anel do Pimentão. In: *Rev. do V Colóquio Bras. de Micr. Elet.* CENA/ESALQ/USP. p.72-73.
- NOGUEIRA, N.L. e D.M. SILVA. 1976a. Incorporação de Uridina Tritiada U³H no RNA do Vírus do Anel do Pimentão (VAP). In: *Rev. de Micr. Elect. Santiago - Chile* 3:94-95.
- OLIVEIRA, A.R. 1967. Serologia Aplicada ao Vírus do Anel do Pimentão. Piracicaba, ESALQ/USP. 40p. (Tese de doutoramento).
- PEASE, D.C. 1964. *Histological Techniques for Electron Microscopy.* Academic Press Inc. Ltd. London, 250-256.

- PELC, S.R. 1963. Teory of Electron Autoradiography. *J. Roy Micr. Soc.* 81:131-139.
- RALPH, R.K. e S.J. WOJCIK. 1969. Double Stranded Tobacco Mosaic Virus RNA. *Virology* 37:276-282.
- REYNOLDS, E.S.J. 1963. The use of the Lead Citrate at High pH as an Electron Opaque Stain in Electron Microscopy. *J. Cell Biol.* 17: 208-212.
- SANGER, H.L. e C.A. KNIGHT. 1963. Action of Actinomycin D on RNA Synthesis in the Healthy and Virus Infected Tobacco Leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 13:455-461.
- SCHLEGEL, D.E. e S.H. SMITH e G.A. DE ZOETEN. 1967. Sites of Virus Synthesis Within Cells. In: *Annual Review of Phytopathology* 5:223-246.
- SEMAL, J. 1967. Effects of Actinomycin D in Plant Virology. *Phytopathol. Z.* 59:55-71.
- SILBERSCHMIDT, K., D.R. WEIGL e T.A. SALOMÃO. 1967. Electron Microscopic Observation on the Causal Agent of the Brazilian Tomato Ringspot Disease. *Phytopath. Z.* 60:278-290.
- SILVA, D.M. 1965. Estudos sobre Purificação, Composição e Algumas Propriedades do Vírus do Anel do Pimentão. Piracicaba, ESALQ/USP. 106p. (Tese de Livre-Docência).

- SILVA, D.M. e N.L. NOGUEIRA. Ocorrência de Partículas Pequenas (55 nm) do Vírus do Anel do Pimentão em Células de *Nicotiana tabacum* L. (Dados não publicados).
- SINGER, S.J. 1959. Preparation of an Electron-Dense Antibody Conjugate. *Nature*, 183:1523-1524.
- SMITH, S.H. e D.E. SCHLEGEL. 1964. Incorporation of Uridina-³H into Nuclei of Virus-Infected Tobacco. *Science* 145:1058-1059.
- SMITH, S.H. e D.E. SCHLEGEL. 1964. The Distribution of Clover Yellow Mosaic Virus in *Vicia faba* Root Tips. *Phytopathology* 54:1273-1274.
- SMITH, S.H. e D.E. SCHLEGEL. 1965. The Incorporation of Ribonucleic Acid Precursors in Healthy and Virus Infected Plant Cells. *Virology* 26:180-189.
- STANLEY, W.M. 1935. Isolation of a Crystalline Protein Possessing the Properties of Tobacco Mosaic Virus. *Science* 81:644-645.
- SOBELL, H.M. e S.C. JAIN. 1972. Stereochemistry of Actinomycin Binding to DNA. II Detailed Molecular Model of Actinomycin DNA Complex and its Implications. *J. Mol. Biol.* 68:21-34.

STERBERGER, L.A., E.J. DONATI e C.E. WILSON. 1953. Electron Microscopic Study on Specific Protection of *Bordetella bronchiseptica* Antibody During Exhaustive labeling with Uranium. *J. Histochem. Cytochem.* 11:48-58.

TAMAOKI, T. e G.C. MUELLER. 1962. Synthesis of Nuclear and Cytoplasmic RNA of Hella Cells and the Effect of Actinomycin D. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 9:451-454.

VAN DER WANT e A. ROZENDAAL. 1948. Electronenmicroscopische Onderzoek van Het Virus, dat de Rattelziekten van de Tabak em Het Stengelbont van de Aardapel Veroorzaakt. *Tijdschr. Plziekten* 54:134-141.

WOLANSKI, B.S. e T.C. CHAMBERS. 1971. The Multiplication of Lettuce Necrotic Yellow Virus. *Virology* 44:582-591.

--ooo000||000ooo--