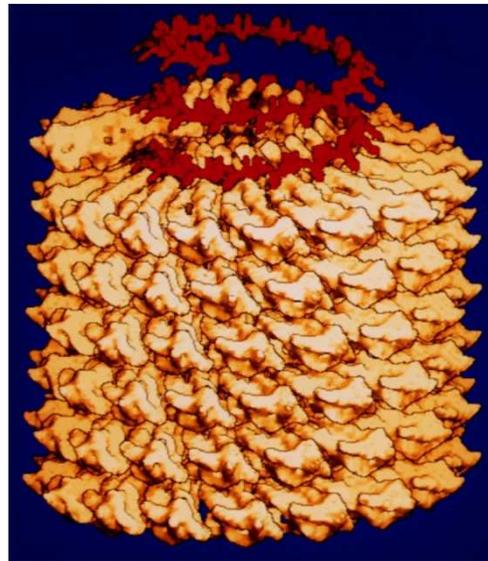


# Protecção das Plantas

## UD2 - Vírus fitopatogénicos



## Porque estudar os vírus, nomeadamente os fitopatogénicos?

- 1 - vírus são patogénios de diversos grupos de organismos, incluindo plantas
- 2 - várias centenas de vírus são patogénios de plantas (1/4 dos vírus conhecidos)
- 3 - diferentes partículas sub-virais são igualmente patogénios de plantas
- 4 - provocam estragos em praticamente todos os ecossistemas
- 5 - são organismos modelo para estudos em várias áreas da Ciência
- 6 - são de difícil combate
- 7 - sofrem permanentemente alterações genéticas, o que dificulta ainda mais as tentativas de os combater

Algumas doenças causadas por vírus ou por partículas sub-virais		
Tristeza	África, América	Severas epidemias: África, América do Sul, ...
Nanismo amarelo da cevada	Todo o mundo	Severas epidemias
"Cadang-cadang" do coqueiro	Possibilidade de dispersão a partir das Filipinas	
Doença das estrias do milho	Dispersão a partir da África, infectando milho, cana do açúcar, trigo ...	

## 1.1 - Marcos no estudo dos vírus das plantas

- 752, poema japonês descrevendo sintomas que são hoje atribuídos a um vírus
- 1637, transmissão por enxertia do raiado das túlipas
- 1880, reconhecimento da doença do mosaico do tabaco (Mayer)
- 1886, prova de carácter contagioso do mosaico do tabaco (Mayer)
- 1892, filtrabilidade do agente causador do mosaico do tabaco (Iwanowski)
- 1897-8, confirmação da filtrabilidade e teoria do 'contagium vivum fluidum' = vírus (Beijerinick)
- 1918, demonstração da existência de plantas porta vírus sem sintomas (Nishimura)
- 1926, hipótese de o agente causador do mosaico do tabaco ser uma proteína (Mulvanía)

## 1.1 - Marcos no estudo dos vírus das plantas

1931, uso da serologia na classificação dos vírus (Birkeland)

1936, demonstração de que os vírus são nucleoproteínas (Bawden & Pirie)

1939, primeiras observações de vírus ao microscópio electrónico (Kausche et al.)

1950, primeiras observações de vírus nas células hospedeiras (Black et al.)

1954, separação da proteína e do ácido nucleico; reconstituição dos vírus (Fraenkel-Conrat *et al.*)

1956, demonstração da infecciosidade do ácido nucleico (Gierer & Schramm)

1967, purificação do vírus do enrolamento da batateira a partir de *Myzus persicae* (Peters)

1967, reconhecimento de que doenças supostamente causadas por vírus podiam ter outra causa - fitoplasma (Doi *et al.*)

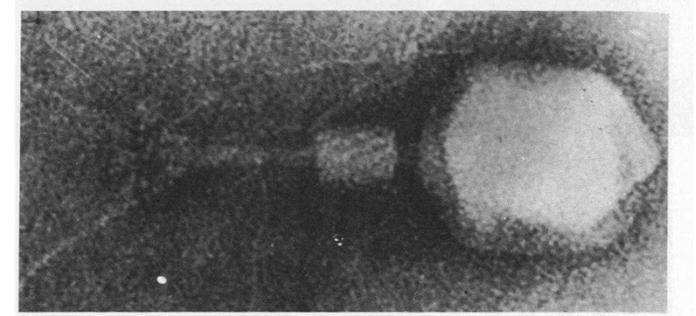
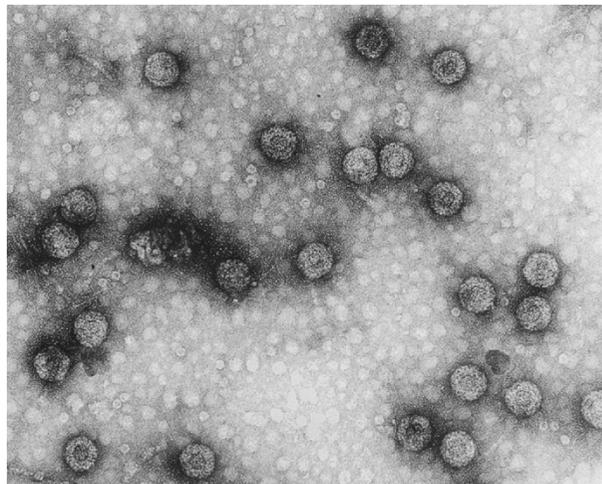
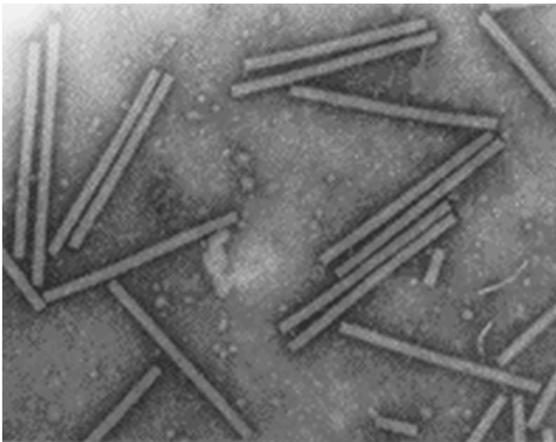
1969, demonstração da passagem dos vírus através dos plasmodesmata (Kitajima & Lauritis)

1969, identificação de um novo grupo de agentes fitopatogénicos - viróides (Diener & Raymer)

## 1.2. - Algumas características gerais dos vírus (definição de vírus)

Vírus são parasitas (patogénios) não celulares que possuem um genoma de natureza oligonucleotídica que codifica pelo menos uma proteína implicada na sua multiplicação e que, uma vez na célula hospedeira, pode induzir a sua própria multiplicação

- cerca de  $\frac{1}{4}$  dos vírus conhecidos atacam as plantas
- são nucleoproteínas com capacidade para originar doença
- usualmente são bastonetes ou poliédricos, ou variantes destas duas estruturas



## 1.2. - Algumas características gerais dos vírus

- não são visíveis ao microscópio óptico  
(Nanovírus: 17-22 nm)  
(TMV: 300 x 18 nm)  
(célula animal: 10  $\mu\text{m}$ )  
(célula vegetal: 100  $\mu\text{m}$ )
- são parasitas obrigatórios
- interferem com o metabolismo celular
- podem ser específicos ou polífagos

## 2 - Os componentes da partícula viral (virião)

### 2.1 - virião

o virião é formado por:

1 - ácido nucleico (5 a 40 % da massa do vírus)

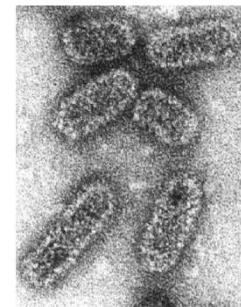
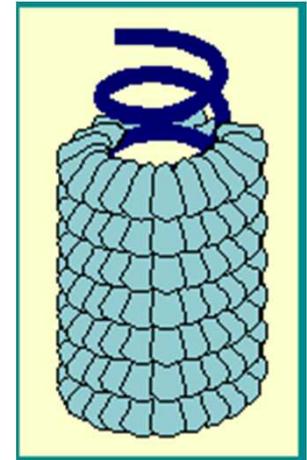
2 - capsídeo (60 a 95% da massa do vírus)

em alguns vírus

3 - membrana lipídica

4 - enzimas

5 - hidratos de carbono



A massa dos vírus (virião) varia entre 4,6 e  $73 \times 10^6$  Da

A massa do ácido nucleico varia normalmente entre 1 e  $3 \times 10^6$  Da

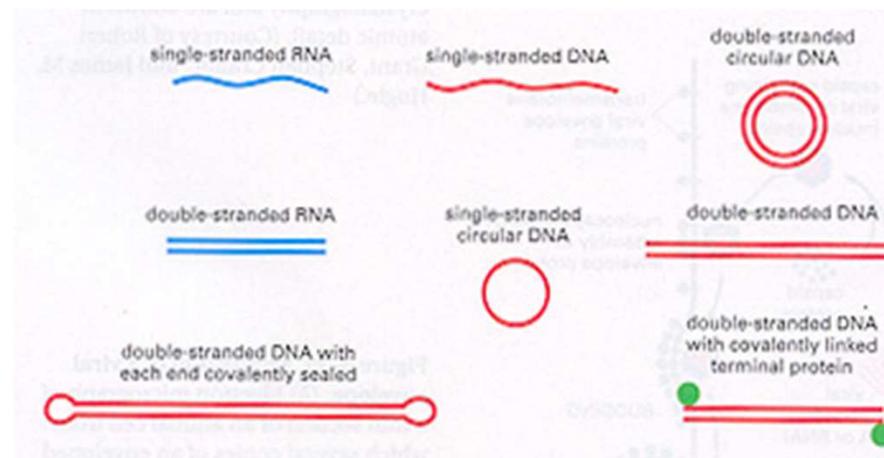
## 2 - Os componentes da partícula viral (virião)

### O ácido nucleico

- A massa molecular do ácido nucleico varia entre 1 e  $3 \times 10^6$  Da

Pode ser:

- RNA de cadeia simples + : ssRNA (+)
- RNA de cadeia simples - : ssRNA (-)
- RNA de cadeia dupla : dsRNA (> 40 vírus fitopatogénicos)
- DNA de cadeia simples : ssDNA (> 50 vírus fitopatogénicos)
- DNA de cadeia dupla : dsDNA (> 30 vírus fitopatogénicos)



Função biológica do ácido nucleico: **infeciosidade**

## 2 - Os componentes da partícula viral (virião)

### O ácido nucleico

- ✓ Nos vírus o número de genes varia de 4 a 7 até cerca de 250\*  
(nos vírus vegetais de 4 a 12 genes)
- ✓ As proteínas codificadas pelo ácido nucleico são de dois tipos:

Estruturais: são necessárias à sobrevivência do vírus e têm funções de protecção, disseminação, reconhecimento do hospedeiro,...

Não estruturais: frequentemente enzimas que são utilizados no decurso da replicação e que ficam na célula hospedeira depois da saída do vírus

- ✓ A grande maioria dos vírus possui um ou mais genes que codificam para a sua polimerase (nos gemnívirus e nos nanovírus o gene necessário para a sua multiplicação não tem função de polimerase)

\* Nota: são necessários 500 genes para a síntese proteica

Fitoplasmas: ~625 genes; Escherichia coli: ~2800 genes;

Levedura: ~7000 genes; Humano: > 30000 genes

## 2 - Os componentes da partícula viral (virião)

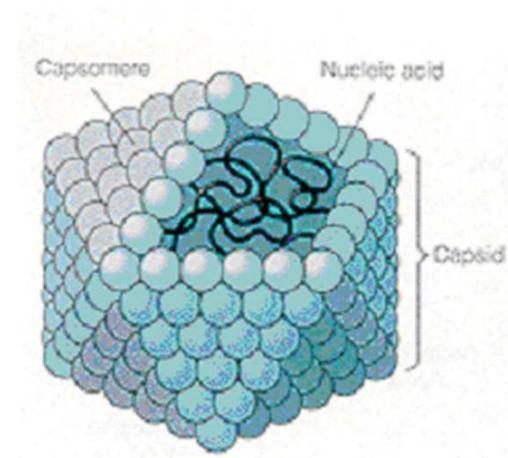
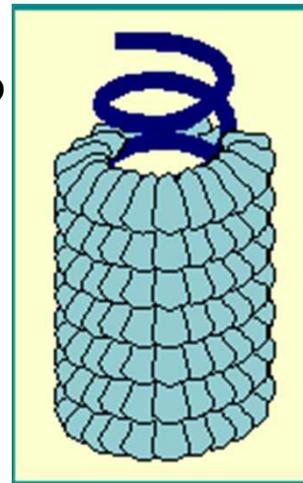
### O capsídeo (capa proteica)

- o capsídeo é formado por sub-unidades proteicas ou capsómeros
- cada sub-unidade tem 150 a 400 aminoácidos

No VMT o capsídeo tem de massa  $2 \times 10^6$  Da e o capsómero  $1,76 \times 10^4$  Da

Nos vírus mais simples o capsídeo é formado por apenas um tipo de proteínas

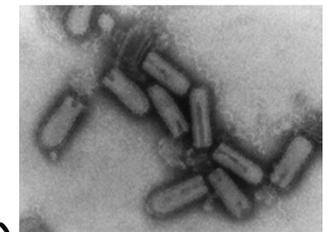
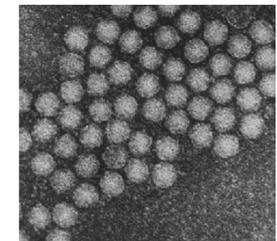
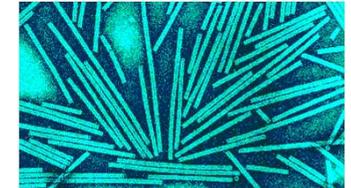
Nos mais complexos existem vários tipos de proteínas



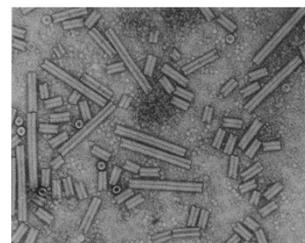
- Funções biológicas do capsídeo:
- ✓ protecção do ácido nucleico
  - ✓ determinação da transmissibilidade por vectores
  - ✓ tipo de sintomas causados
  - ✓ aumento de infecciosidade ...

### 3 - Morfologia do virião

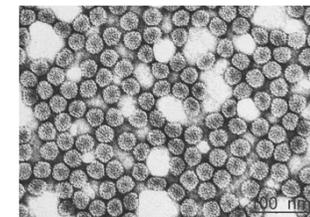
- bastonetes alongados (rígidos e flexuosos)  
**10 - 18 nm x 300 - 2200 nm**
- esféricos (poliédricos ou isodiamétricos)  
apresentam uma ou mais proteínas diferentes no capsídeo  
**17 a 60 nm**
- baciliformes com invólucro lipo-proteico (rabdovírus)  
**52 - 75 nm x 300 - 380 nm**
- esféricos, rodeados por membrana (Tomato spotted wilt virus)  
**100 nm**



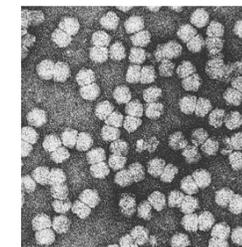
- genoma dividido
  - **Tobravirus**
  - **Geminiviridae**
  - **Comoviridae**
  - **Bromoviridae**



Tobravirus



Bromovirus



Geminivirus

## 4 - Replicação dos vírus

Adsorção dos vírus (virus de bactérias, animais, ... → receptores celulares)

### Penetração nas células

- ❖ através de lesões (mecânicas ou por acção de vectores)

### Libertação do ácido nucleico (descapsidação)

### Síntese de proteínas

- ❖ enzimas (transcriptase, polimerase ...)
- ❖ proteínas estruturais do capsídeo

Funções das proteínas:

- ✓ replicação
- ✓ movimento
- ✓ transmissão
- ✓ protecção ...

### Replicação do ácido nucleico

### Encapsidação (montagem)

### Acumulação e movimento de viriões

## 5. RNA patogénico sub-viral

### 5.1 - Satélites

dependem estreitamente de um vírus (assistente) para se replicarem e caracterizam-se por:

- não serem necessários para o ciclo desse vírus (assistente)
- não terem homologia de sequência com o vírus assistente, à excepção de regiões muito limitadas (terminais)
- possuírem RNA de cadeia simples com 200 a 1400 nucleótidos
- poderem modificar os sintomas causados pelo vírus assistente

#### 5.1.1 - Vírus satélite

- não têm polimerase mas codificam o seu capsídeo
- são icosaédricos, com cerca de 17 nm de diâmetro

#### 5.1.2 - RNA satélite com função mensageira

- codifica uma proteína com função não bem definida; são, no entanto, encapsidados pelo capsómero do vírus assistente

#### 5.1.3 - RNA satélite linear sem função mensageira

- molécula linear (sem função mensageira)

#### 5.1.4 - Virusóide

- molécula circular (sem função mensageira)

### 5.2 - Viróides

- multiplicam-se sem recurso a um vírus assistente
- desprovidos de capsídeo
- RNA de cadeia simples e circular (246 a 399 nucleótidos)
- RNA sem actividade mensageira

## 6 - Modo de transmissão dos vírus fitopatogénicos na Natureza

- ❖ **propagação vegetativa**
- ❖ transmissão mecânica (contacto)
- ❖ através de semente (> 100 vírus)
- ❖ pólen
- ❖ **vectores biológicos**
  - fungos e pseudofungos (*Olpidium*, *Polymyxa* e *Spongospora*)
  - ácaros
  - nemátodes (*Longidorus*, *Xiphinema*, *Trichodorus*, ...)
  - insectos
- ❖ água
- ❖ cúscuta

## 7 - Relação entre os vírus e os insectos vectores

Aquisição

Persistência no vector

Acumulação e passagem através de órgãos internos

Período de incubação

Especificidade

Transmissão à descendência

## 7 - Relação entre os vírus e os insectos vectores

	Não persistente	Semi persistente	Persistente*
Aquisição	segundos a minutos	vários minutos	vários minutos a várias horas
Persistência no vector	horas	1 a 4 dias	vários dias ou permanentemente
Acumulação e passagem através de órgãos internos	-	-	+
Período de incubação	-	-	+
Especificidade	±	+	+
Transmissão à descendência	-	-	-/+ *

\* caso dos vírus replicativos ou propagativos

## 8- Características físico-químicas dos vírus

9.1 - adsorção selectiva (caulino, safranina, fosfato de cálcio, ...)

9.2 - carga eléctrica

9.3 - limite de diluição (1:1000000, 1:100000, 1:10000)

9.4 - temperatura letal (90, 66, 52°C)

9.5 - longevidade

9.6 - resistência a substâncias químicas

## 8 - Sintomas causados pelos vírus fitopatogénicos\*

- redução de crescimento e da produção



\* Caso de planta porta vírus sem sintomas

## 8 - Sintomas causados pelos vírus fitopatogénicos

- mosaico e manchas em anéis



## 8 - Sintomas causados pelos vírus fitopatogénicos

- amarelecimento



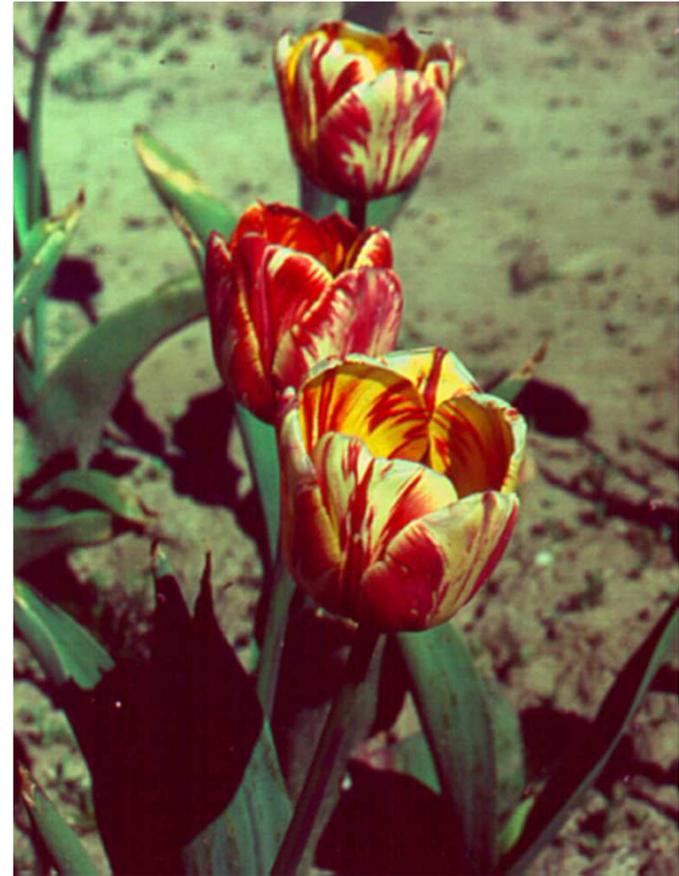
## 8 - Sintomas causados pelos vírus fitopatogénicos

➤ **necrose**



## 8 - Sintomas causados pelos vírus fitopatogénicos

- raiado



## 9 - Reacção de defesa das da planta infectada

### 9.1 - O silenciamento dos genes

A planta dispõe ao nível da célula de uma estratégia de defesa que funciona para qualquer vírus (à semelhança do interferão que é activado nas células animais por RNA de cadeia dupla), embora a protecção seja limitada a estirpes próximas de um dado vírus

#### **PTGS versus VIGS**

**PTGS (post transcriptional gene silencing)**

**VIGS (virus induced gene silencing)**

(pequenas cadeias de ARN antisense com cerca de 25 nucleótidos)

**Três fases:**

- **iniciação do silenciamento**
- **propagação à distância dum sinal específico**
- **manutenção do silenciamento**

**Supressão do silenciamento**

## 9 - Reacção de defesa das da planta infectada

### 9.2 - Resistência com reacção de hipersensibilidade e resistência extrema

hipersensibilidade - quando há necrosamento

resistência extrema - sem aparecimento de necrose

resistência adquirida localizada (LAR)

resistência adquirida sistémica (SAR)

#### R/Avr

- genes de especificidade para a espécie hospedeira (SSP) - resistência básica
- genes de avirulência (Avr) - síntese de moléculas, eliciadores, que reconhecidas especificamente por moléculas codificadas pelos genes de resistência, os receptores, conduzem ao desencadear da síntese de moléculas responsáveis pela resistência
  - resistência constitutiva/ resistência induzida
  - durabilidade da resistência específica

## **10 - Evolução e classificação dos vírus**

### **10.1 - Origem dos vírus e dos genes virais**

11.2.1 - vestígios de um mundo pré-celular ?

11.2.2 - a partir de microorganismos mais complexo por evolução regressiva ?

11.2.3 - a partir de elementos genéticos provenientes de material celular ?

### **10.2 - Causas da variabilidade dos vírus**

11.2.1 - Mutação (ARN viral com mutações  $10^5$  a  $10^6$  vezes mais frequentes do que o ácido nucleico das células eucariotas que o alberga)

11.2.2 - Recombinação

11.2.2.1 - entre estirpes da mesma espécie

11.2.2.2 - entre diferentes espécies

11.2.2.3 - entre diferentes géneros

11.2.2.4 - com o ácido nucleico da célula hospedeira

## 10.3. - Classificação dos vírus

Enquadramento dos vírus (filogenia)

Phylum ? Virus

Ordem ( ... virales)

Família ( ... viridae) (e.g. Potyviridae)

Subfamília ( ... virinae) (e.g. Potyviridae)

Género ( ... virus) (e.g. Potyvirus )

Espécie - (e.g. potato virus Y - PVY)

Isolado (amostra retirada de uma planta infectada)

Estirpe (conjunto de isolados naturais que partilham uma ou mais propriedades)

Patótipo

Serótipo

Em 1999 o Comité Internacional de Taxonomia de Virus (ICTV) definiu, para o conjunto dos vírus conhecidos (1550 espécies):

204 géneros agrupados em 56 famílias

29 géneros não agrupados em famílias

Para os vírus fitopatogénicos

47 géneros agrupados em 13 famílias

24 géneros não agrupados em famílias

# 11. Meios de luta

## 11.1 - Medidas legislativas

- ✓ regulamentos técnicos
- ✓ erradicação

## 11.2 - Medidas preventivas e culturais

- ✓ impedir ou reduzir a disseminação de vírus no ambiente, a partir de:
  - plantas adventícia
  - culturas vizinhas
- ✓ perturbar a eficácia dos vectores
  - tratamentos fitossanitários contra os vectores aéreos
  - tratamento de sementes  
(e.g. imidaclopride/BYDV)

# 11. Meios de luta

## 11.2 - Medidas preventivas e culturais (cont)

- ✓ perturbar a eficácia dos vectores (cont)
  - tratamento fitossanitário contra os vectores do solo
  - desinfecção de instrumentos (vírus muito infecciosos) (e.g. fostato trisódico a 3%)
  - tipo de plástico (cobertura e solo)
- ✓ fuga à doença (realização da cultura em condições desfavoráveis aos vectores)
- ✓ rotação cultural

## 11.3 - Uso de material de propagação são

- ✓ termoterapia de plantas (40°C)
- ✓ microenxertia

# 11. Meios de luta

## 11.4 - Luta biológica

### ✓ cultivares resistentes

- recurso genético ou banco de genes
- diversidade dos mecanismos de resistência
  - ❖ resistência à inoculação do vírus pelo insecto (antibiose ?)
  - ❖ localização e permanência do vírus perto do ponto de inoculação
  - ❖ redução da probabilidade de infecção
  - ❖ resistência de migração do vírus na planta
  - ❖ menor replicação do vírus

# 11. Meios de luta

## 11.4 - Luta biológica (cont)

- ✓ protecção cruzada (pré-imunização)
  - estirpe pouco virulenta do vírus (natural ou mutante)
  - ácido nucleico do vírus + ARN satélite
- ✓ plantas transgénicas (manipulação genética)
  - resistência mediada por proteínas virais
  - resistência mediada por ácidos nucleicos (habitualmente satélite)
  - resistência mediada por ribozimas (actividade equivalente a ribonucleases)

## **12 - Técnicas de identificação de vírus**

**Sintomas**

**Ensaio biológico**

**Técnicas serológicas**

**Técnicas biomoleculares**

**Microscopia electrónica**

## Sintomas



## Aplicação:

- diagnóstico de campo

## Limitações:

- pouco preciso em muitas viroses por sintomas semelhantes em doenças de diferente etiologia
- necessidade de elevada experiência



# Ensaio biológico

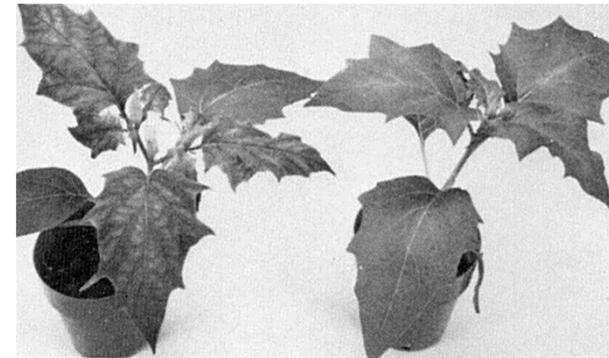
Inoculação de plantas indicadoras (*Nicotiana* spp.,  
*Chenopodium quinoa*, *Datura stramonium*,...)

## Aplicação:

- confirmação de uma etiologia parasitária
- multiplicação de vírus
- manutenção de vírus
- distinção de estirpes

## Limitações:

- lento
- trabalhoso
- não aplicável em rotina



*Datura stramonium*

# Técnicas serológicas

Reacção ao nível do capsídeo (proteína, determinantes)

## Vantagens:

- simples
- baixo custo
- rápido
- aplicável a um grande volume de material (sementes ou material de propagação vegetativa)

## Limitações:

- pressupõe a existência de anticorpos específicos
  - policlonais
  - monoclonais

# Técnicas biomoleculares

## Detecção do ácido nucleico (DNA ou RNA)

### Vantagens:

- elevada sensibilidade
- rápido

### Limitações:

- elevado custo
- necessidade de equipamento caro e sensível
- necessidade de pessoal especializado

### Aplicadas a:

- Vírus e partículas subvirais com capsídeo
- Estirpes defectivas de vírus
- viróides

Electroforese

Hibridação molecular

Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR)