

MICROSCOPIA ELECTRÔNICA DE ESTIRPES DO VÍRUS Y DA BATATINHA QUE OCORREM EM SÃO PAULO (1)

E. W. KITAJIMA, ANA MARIA B. CARVALHO e A. S. COSTA, *engenheiros-agrônomo*s, Seção de Virologia, Instituto Agrônomo

RESUMO

Sete estirpes do vírus Y da batatinha que ocorrem no Estado de São Paulo, assim consideradas em vista de suas características, além da estirpe típica, foram examinadas ao microscópio eletrônico, preparadas pelo método do exsudato ou do "dipping".

Em todas as preparações foram encontradas partículas alongadas e flexíveis, cujos comprimentos normais não variavam significativamente entre si, correspondendo ao CN já descrito para este vírus. Entretanto, notou-se tendência de uma das estirpes ser preferencialmente mais curta e duas outras serem mais longas que o valor médio, que talvez possa ter correlação com seus comportamentos biológicos.

Esta semelhança morfológica é considerada mais uma evidência em favor da hipótese de que essas estirpes possuem realmente relações de parentesco.

1 — INTRODUÇÃO

Entre as moléstias de vírus que afetam as solanáceas cultivadas, o vírus Y da batatinha (*Solanum tuberosum* L.) (PVY) é de considerável importância pela sua larga distribuição geográfica, pela facilidade de transmissão na natureza e pela existência de numerosas estirpes. Sua morfologia tem sido estudada por diversos autores (1, 2, 5, 12), estando mais ou menos estabelecido que as partículas do PVY são filamentosas e flexíveis, tendo 15 μ de diâmetro e 730 μ de comprimento normal (4).

Brandes e Wetter (6) colocaram o PVY no grupo 10 de sua classificação dos vírus de forma alongada.

Além da estirpe típica do PVY, Costa e colaboradores (8, 9) puderam isolar várias outras que ocorrem nos Estados de São

(1) Recebido para publicação em 8 de junho de 1962.

Paulo e Rio de Janeiro. Se bem que se possa isolar tantas estirpes dêste vírus quantas se desejem, êstes isolados representam estirpes de importância econômica ou interesse científico.

Verificou-se que as partículas encontradas em plantas infectadas com vírus, agrupadas como sendo estirpes do PVY pelo seu comportamento biológico, são semelhantes morfológicamente, constituindo mais uma evidência da existência de relações de parentesco entre elas.

2 — MATERIAL E MÉTODOS

As estirpes em questão, além da típica (YC) (2) são: "etch 1" (YE¹) e "etch 2" (YE²); necrótica (YN) e necrótica do Rio (YN^{Rio}); púrpura (YP); risca do tomateiro de São Paulo (YW) e risca do tomateiro do Rio (YWR^{Rio}).

Como hospedeiras foram utilizadas plantas de fumo Turkish (*Nicotiana tabacum* L.), tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), pimentão (*Capsicum annuum* L.), *Nicandra physaloides* Gaertn e *Physalis* sp Rydberg.

As preparações para determinação do comprimento normal (CN) (2, 13) foram feitas pelo método do exsudato (10) ou do "dipping" (3) e metalizadas com paládio ou cromo.

As micrografias eletrônicas foram tomadas a 5 000x e ampliadas ópticamente a 50 000x, quando então foram efetuadas as mensurações (11), tendo sido as partículas medidas agrupadas em classes de 20 m μ de intervalo. Procurou-se obter histogramas de distribuição dos comprimentos das partículas de, pelo menos, 3 plantas de direntes espécies infetadas com uma das estirpes. Isto nem sempre foi possível, dada a baixa concentração de partículas em certas combinações estirpe-hospedeira. Em geral procurou-se medir um mínimo de 100 partículas para a confecção dos histogramas individuais.

Como contrôle foi feita uma medida comparativa do PVY com outros vírus de dimensões conhecidas, como o vírus X da batatinha (PVX) e o vírus do mosaico comum do fumo (TMV). Para êste fim, exsudatos oriundos de plantas de fumo infectadas com PVX, TMV ou PVYW foram examinados e fotografados em seqüência, mantendo-se as condições de exame o mais constante possível.

(2) Notações utilizadas na Seção de Virologia, Instituto Agronômico.

Para melhor determinação do diâmetro e observar possíveis ultraestruturas das partículas, uma pequena quantidade de fô-lhas de fumo infetadas com a estirpe YW, por ser em geral a mais concentrada, foi clarificada, simplesmente com um ciclo de centrifugação diferencial após a extração do suco. Esta preparação foi examinada ao microscópio electrónico utilizando-se o método da coloração negativa (6). Esta foi feita com ácido fosfo-tungstico 2%, cujo pH foi corrigido a 7 com solução de hidróxido de potássio normal, o qual foi misturado na proporção de 1:1 com a suspensão de vírus. Esta mistura foi pulverizada sobre película de carbono após adição de traços de albumina de sôro bovino.

Todos os exames foram feitos num microscópio electrónico Siemens ELMISKOP I (3).

3 — RESULTADOS

Em tôdas as preparações provenientes de plantas infectadas com as estirpes estudadas, foram encontradas partículas filamentosas e flexíveis (figura 1), o que não ocorria em plantas comparáveis sadias. Os resultados gerais das medições podem ser observados no histograma da figura 2, que representa cêrca de 2 800 partículas. Setenta e cinco por cento do total das partículas medidas acham-se confinadas entre as classes 680 a 780 m μ , tendo o CN calculado com estas partículas, dado um valor da ordem de 732 m μ . O CN individual para cada estirpe e cada combinação estirpe-hospedeira pode ser observado no quadro 1.

Notou-se em geral baixa concentraçãõ das partículas nas preparações, principalmente com preparações da estirpe YP.

Uma análise no quadro 1 mostra que o valor do CN, dentro de certos limites, é mais ou menos constante dentro de cada estirpe, independente da hospedeira utilizada. Também, as diferenças entre estirpes não são muito grandes, sendo a diferença entre os valores extremos da ordem de 15 m μ , e portanto menos que uma classe.

Medidas comparativas do PVY contra TMV e PVX podem ser observadas na figura 3, onde o histograma mostra os picos nas classes esperadas, isto é, 300 m μ para o TMV, 500-520 m μ para PVX e 720-740 m μ para PVY.

Preparações examinadas pelo método da coloração negativa não estavam em condições satisfatórias devido às impurezas en-

(3) Doação conjunta do Conselho Nacional de Pesquisas e da Fundação Rockefeller.

contradas, aliadas à baixa concentração das partículas. Porém ocasionalmente conseguia-se observar partículas individualizadas, e nestas o diâmetro médio era de 14-15 $m\mu$, que está em concordância com valores determinados em preparações metalizadas,



Figura 1. — Foto micrografia eletrônica do vírus Y da batatinha (estirpe Yw), em exsudato de *Nicotiana tabacum*.

qualquer que fôsse a estirpe considerada, de 15 m μ tomando-se como padrão o diâmetro do TMV, que é da ordem de 18 m μ

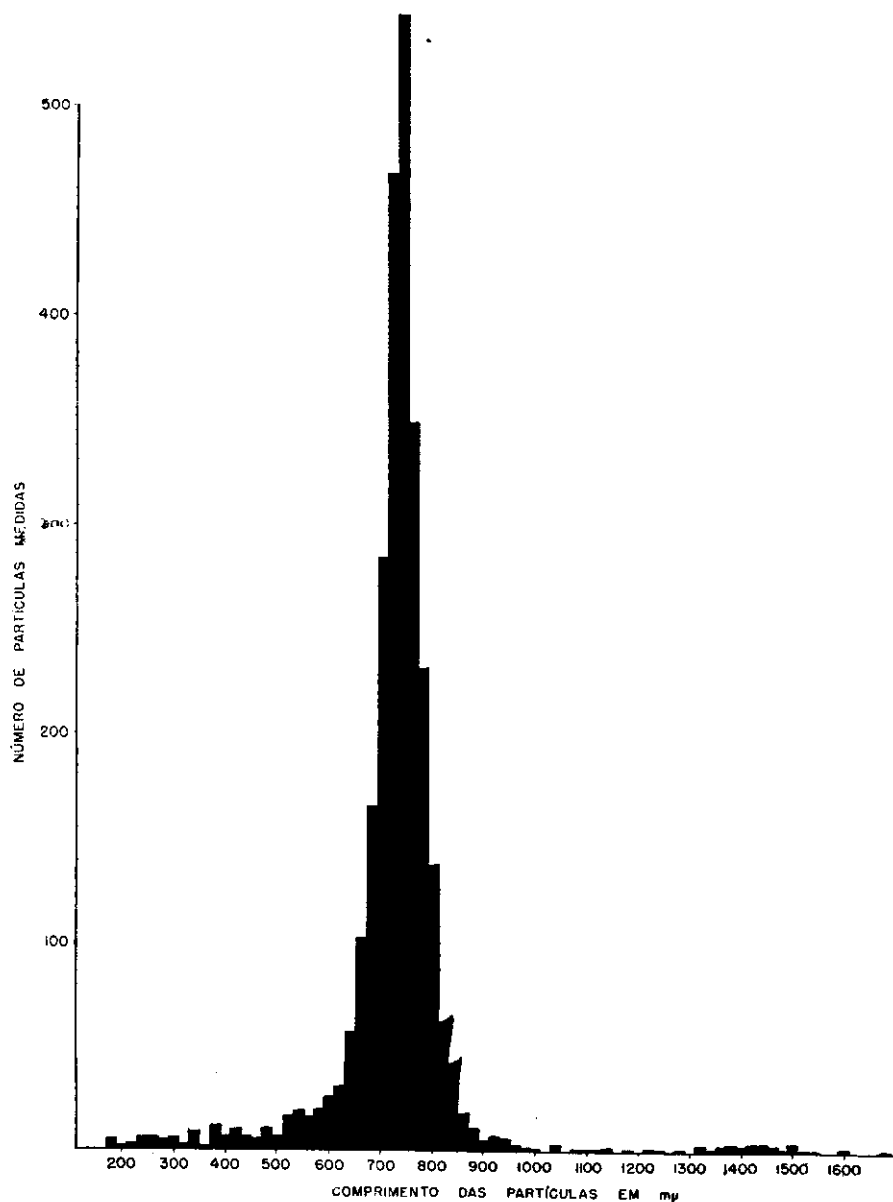


Figura 2. — Distribuição dos comprimentos das partículas do vírus Y da batatinha

(7). Nenhuma estrutura interna foi possível observar, e aparentemente as partículas são filamentos maciços.

QUADRO 1. — Resultados das medições das partículas de diferentes estirpes do vírus Y da batatinha, em diferentes plantas hospedeiras.

Estirpe	Hospedeira	N.º de partículas medidas	CN (1) em μ	
			Na hospedeira indicada	média da estirpe (2)
YC	Nicotiana tabacum	184	734,1	734,1
YE1	Nicotiana tabacum	148	731,8	731,8
YE2	Nicotiana tabacum	119	727,4	728,7
	Nicandra physaloides	175	730,1	
YN	Nicotiana tabacum	231	732,2	731,4
	Nicandra physaloides	219	732,1	
	Capsicum annum	161	730,0	
YNRio	Nicotiana tabacum	171	737,3	735,1
	Nicandra physaloides	92	736,3	
	Physalis sp	174	731,9	
YP	Nicotiana tabacum	80	730,5	723,8
	Nicandra physaloides	96	719,4	
	Lycopersicon esculentum	113	721,5	
YW	Nicotiana tabacum	170	741,6	737,0
	Nicandra physaloides	197	733,3	
	Lycopersicon esculentum	107	736,2	
YWRio	Nicotiana tabacum	124	738,4	737,8
	Nicandra physaloides	156	735,4	
	Physalis sp	81	739,6	
	TOTAL	2 798		732,4

(1) Calculado a partir de partículas compreendidas entre as classes 680 até 780 m.

(2) Média calculada com o total das partículas medidas, por estirpe.

4 — DISCUSSÃO

Conforme seria de se esperar, não houve diferenças significativas na morfologia das partículas das diferentes estirpes do PVY. Todas elas apresentam a mesma conformação e os CN determinados para cada combinação estirpe-hospedeira não diferem marcadamente entre si, correspondendo aos valores descritos na literatura (4, 5). As diferenças que ocorrem podem ser atribuídas a erros experimentais inevitáveis que surgem durante a amostragem, ampliação, mensuração etc., erros estes que poderiam atingir a 5% ou até mais. A maneira mais segura de se

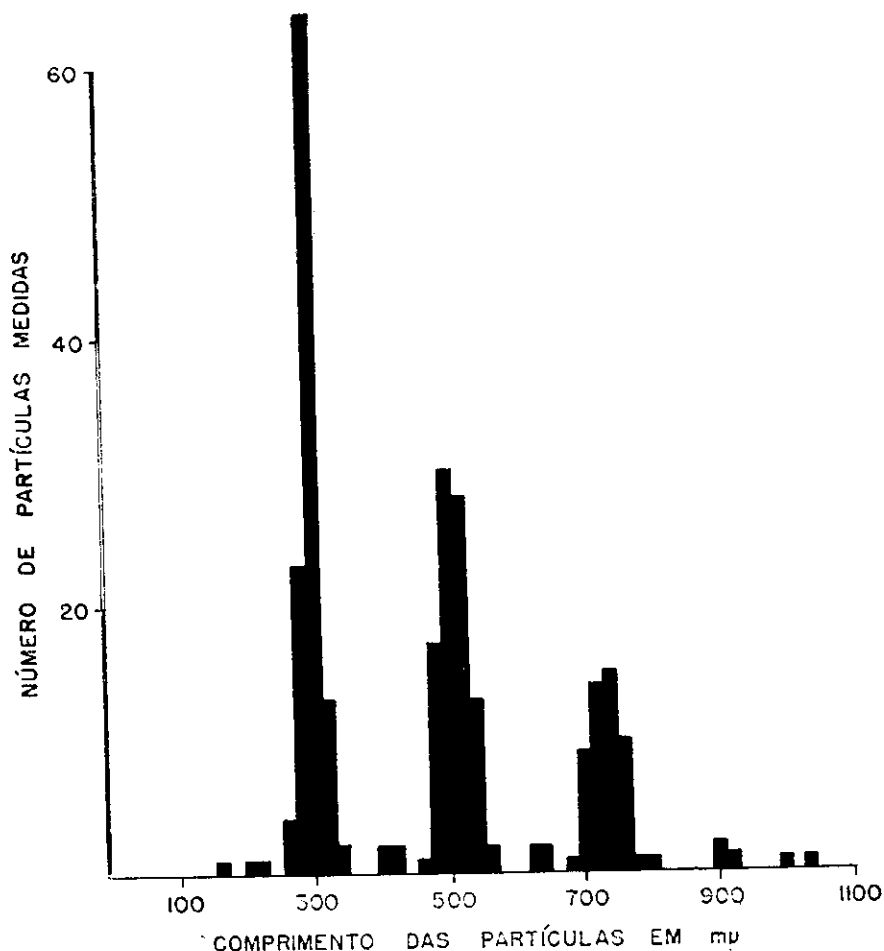


Figura 3 — Distribuição dos comprimentos das partículas do vírus do mosaico comum do fumo, vírus X e vírus Y da batatinha.

efetuarem estas medidas seria fotografar preparações em seqüência e em condições as mais idênticas possíveis. Para o PVY raramente isto é possível, pois em geral apresentam-se com baixa concentração, não permitindo que se fotografem senão algumas partículas por campo examinado.

Entretanto, mesmo considerando esses fatores, que promovem desvios nas medidas, chamaríamos a atenção à tendência da estirpe YP ser sempre preferencialmente mais curta e YW ou YWRio, ao contrário, serem mais longas que o valor médio, independente da hospedeira utilizada. Paralelamente, a sintomatologia mostra que, de fato estas estirpes são mais diferenciadas que as demais com relação à típica, e neste caso estas diferenças no CN, ainda que sutis, poderiam existir, traduzindo estas qualidades.

Pesquisas visando estabelecer afinidades serológicas entre estas estirpes estão em andamento e serão objeto de uma outra publicação.

ELECTRON MICROSCOPY OF POTATO VIRUS Y STRAINS OCCURRING IN SÃO PAULO

SUMMARY

Seven isolates of the potato virus Y collected from various sources in the state of São Paulo, Brazil, were compared in their morphology with the typical potato strain. The preparations were made by the exudate or dipping methods and examined in a Siemens Elmiskop I electron-microscope.

Elongated, flexible virus particles found in the preparations of all isolates did not differ significantly from the normal length, about 730 m μ , reported for the potato Y virus in other places. One of the isolates, designated as YP (normal length 723.8 m μ) showed a tendency to be slightly shorter than the average and two others, YW and YWRio (normal lengths 737 m μ and 737.8 m μ) were slightly longer than this value.

The similarity in the morphology of all isolates is considered as satisfactory evidence that they are all related.

LITERATURA CITADA

1. BAWDEN, F. C. & NIXON, H. L. The application of electron microscopy to the study of plant viruses in impurified plant extracts. *J. gen. Microbiol.* 5:104-109. 1951.
2. BODE, O. & PAUL, H. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Kartoffel Viren. III. Vermessung an Teilchen des Kartoffel-Y-Virus. *Phytopath. Z.* 27:107-112. 1956.

3. BRANDES, J. Eine elektronenmikroskopische Schnellmethode zum Nachweis faden- und stäbchenförmiger Viren, insbesondere in Kartoffeldunkelkeimen. NachrB1. dtsh. PflSchDienst, Braunschweig, 9:151-152. 1957.
4. ————. Einige Bemerkungen über den Nachweis von Kartoffelviren mit Hilfe des Elektronenmikroskops. Proc. 4th Conf. Potato Virus Dis. Braunschweig, 170-175. 1960.
5. ———— & PAUL, H. L. Das Elektronenmikroskop als Hilfsmittel bei der Diagnose pflanzlicher Virosen. Arch. Mikrobiol. 26:358-368. 1957.
6. ———— & WETTER, C. Classification of elongated plant viruses on the basis of particle morphology. Virology 8:99-115. 1959.
7. BRENNER, S. & HORNE, R. W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. Biochim. Biophys. acta 34:103-110. 1959.
8. COSTA, A. S. & CARVALHO, ANA MARIA B. Estirpes do vírus Y da batatinha que ocorrem em São Paulo. (Em preparo).
9. ———— & KITAJIMA, E. W. Risco do tomateiro em São Paulo, causada por estirpe do vírus Y. Bragantia 19:1111-1128. 1960.
10. JOHNSON, J. Virus particles in various plant species and tissues. Phytopathology 41:78-93. 1951.
11. KITAJIMA, E. W., CARVALHO, ANA MARIA B. & COSTA, A. S. Morfologia do vírus do mosaico do picão. Bragantia 20:503-512. 1960.
12. SCHRAMM, G. Über die Grösse und Gestalt des Kartoffel-Y-Virus. Z. Naturforsch. 7:513-518. 1952.
13. WETTER, C. & BRANDES, J. Untersuchungen über das Kartoffel-S-Virus. Phytopath. Z. 26:81-92. 1956.