

# BRAGANTIA

Boletim Científico do Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo

Vol. 27

Campinas, janeiro de 1968

N.º 2

## COMPARAÇÃO ELECTRONO-MICROSCÓPICA DOS TECIDOS DE PLANTAS INFETADAS POR DIFERENTES ESTIRPES DO VÍRUS Y DA BATATA QUE OCORREM NO ESTADO DE SÃO PAULO (1)

MARIA JOSÉ MONTENEGRO (2), *biologista*, E. W. KITAJIMA, *engenheiro-agrônomo*, I. J. B. CAMARGO (2), *biologista*, e A. S. COSTA, *engenheiro-agrônomo*, *Seção de Virologia, Instituto Agrônomo*

### SINOPSE

Exames, ao microscópio electrónico, de secções ultrafinas de tecidos, principalmente foliar, de plantas de diversas espécies, infetadas por uma das 17 estirpes do vírus Y da batata que ocorrem no Estado de São Paulo, mostraram: a) Ocorrência de inclusões citoplasmáticas, lamelares, do tipo descrito por Edwardson, e ocasional presença, no citoplasma, de partículas similares àquelas encontradas *in vitro* e em tecidos de plantas infetadas por qualquer uma das estirpes estudadas; b) aparecimento esporádico de agregados de partículas filamentosas e grossas (ca. 50-60 m $\mu$  de diâmetro), no citoplasma de tecidos de plantas infetadas pelas estirpes Y<sup>c</sup> e Y<sup>e1</sup>; c) ocorrência sistemática de inclusões citoplasmáticas, constituídas por membranas, empilhadas ou dispostas concêntricamente, consideradas como estrutura de Golgi hipertrofiada, em tecidos de plantas infetadas pelas estirpes Y<sup>p</sup> e Y<sup>ut</sup>.

### 1 — INTRODUÇÃO

Existem várias estirpes do vírus Y da batata (*Solanum tuberosum* L.) que causam moléstias em várias solanáceas de interesse econômico, tais como o tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), o pimentão (*Capsicum annuum* L.), o fumo (*Nicotiana tabacum* L.) e a batata, no Estado de São Paulo (4, 5, 6, 11). Entretanto os sintomas apresentados pelas plantas infetadas com as diferentes estirpes são bastante variáveis e vão desde a quase latência até necrose e deformação das folhas, ou, de outro lado, induzindo acúmulo de antocianina, resultando em plantas arroxeadas (4). Desconhece-se ainda a causa dessa dife-

(1) Trabalho parcialmente financiado pela FAPESP (C. Agron. 66/107) e pelo CNPq (TC 4827) e apresentado na 1.ª Reunião da Soc. Brasileira de Fitopatologia, em fevereiro de 1967, em Piracicaba, S.P. Recebido para publicação em 26 de julho de 1967.

(2) Bolsistas de aperfeiçoamento da FAPESP.

rença de comportamento, e que deve estar intimamente ligada aos genômios do vírus e da hospedeira.

Uma das possibilidades de elucidar, ainda que parcialmente, êsse problema, seria através da microscopia electrônica. Utilizando-se dessa técnica, poder-se-ia saber como os vírus estão associados às organelas celulares e quais as modificações que se processam nelas e a sua relação com os sintomas externos.

O presente trabalho relata os resultados dos exames, ao microscópio electrônico, de secções ultra-finas de tecidos de diversas plantas hospedeiras infetadas com diferentes estirpes do vírus Y da batata (VYB) que ocorrem no Estado de São Paulo e adjacências.

## 2 — MATERIAL E MÉTODOS

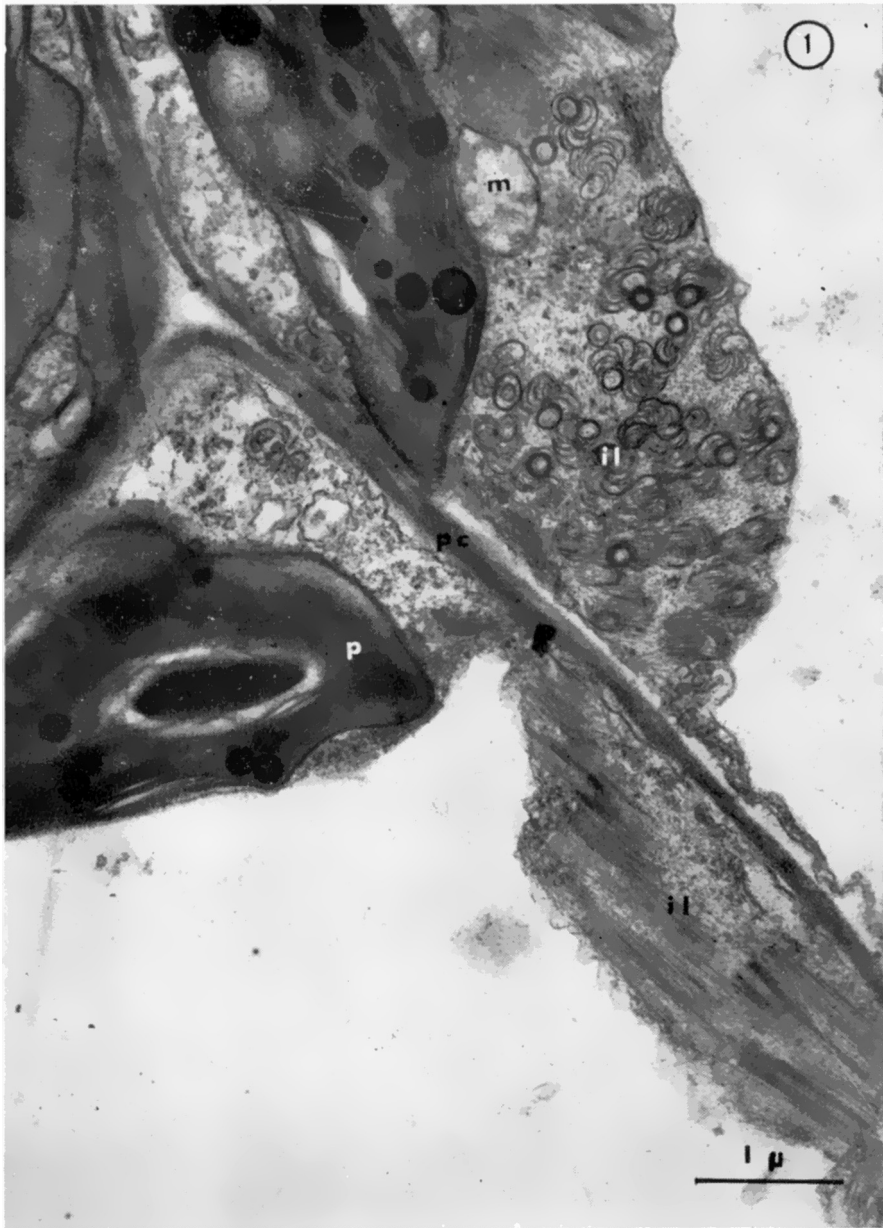
**a) Plantas utilizadas:** — Tomateiro, fumo, pimentão e *Nicandra physaloides* Gaertn. Destas espécies foi utilizado para exames histológicos ao microscópio electrônico o tecido foliar. Algumas amostras de tecido radicular de tomateiro e órgãos florais de *N. physaloides* também foram incluídos no exame.

**b) Vírus:** — As estirpes utilizadas para inoculação das plantas fazem parte da coleção mantida pela Seção de Virologia do Instituto Agrônomo, das quais foram usadas as seguintes: Y<sup>c</sup>, Y<sup>s</sup>, Y<sup>f</sup>, Y<sup>p</sup>, Y<sup>n</sup>, Y<sup>nt</sup>, Y<sup>el</sup>, Y<sup>e2</sup>, Y<sup>eRio</sup>, Y<sup>ga</sup>, Y<sup>wn</sup>, Y<sup>etch-like</sup>, Y<sup>AR</sup>, Y<sup>nb</sup>, «Solanum Minas Gerais» e «Solanum Monte Alegre» (3).

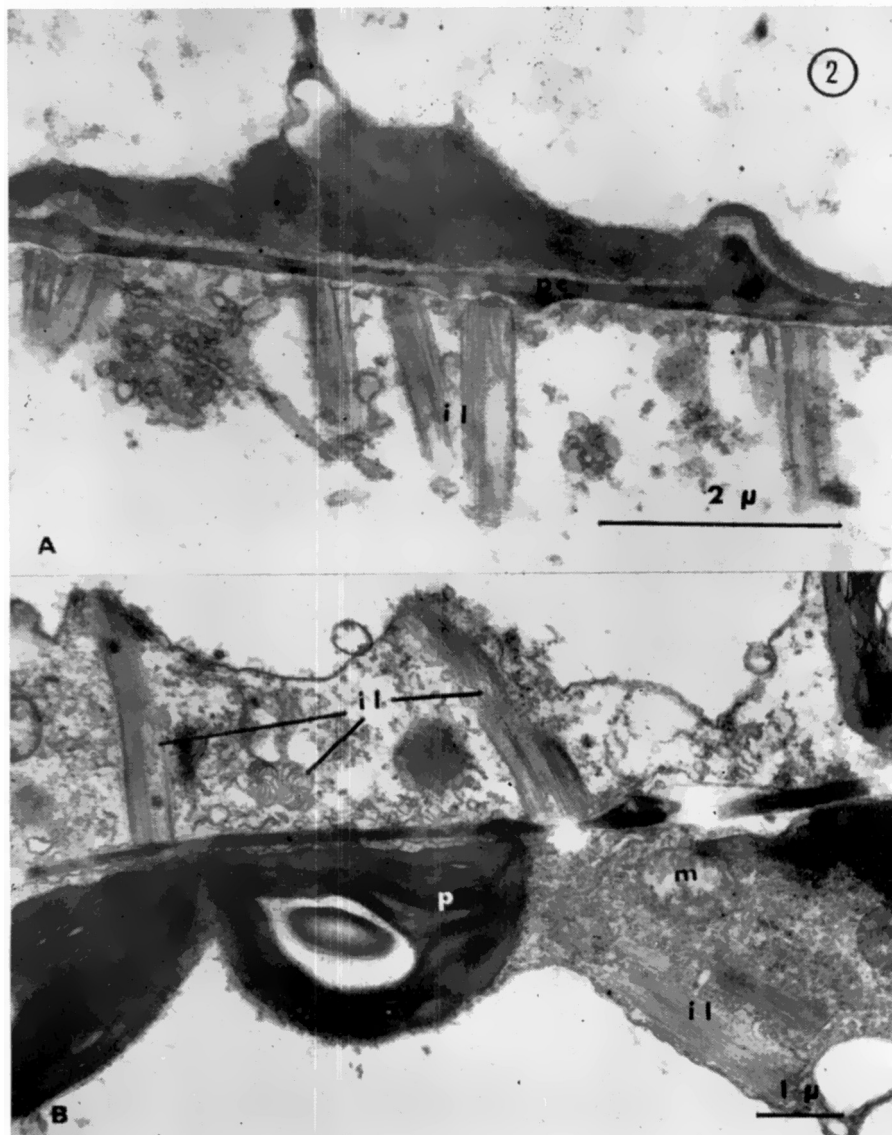
**c) Técnicas de microscopia electrônica:** — Amostras de tecidos de plantas mostrando sintomas evidentes de infecção sistêmica foram fixadas em tetróxido de ósmio 1-2% em tampão fosfato de sódio 0.2M, a 0-4°C, durante 18 horas (15). Após a fixação o material foi desidratado em acetona e incluído em Epon 812 (13). Algumas amostras também foram fixadas em glutaraldeído a 3%, durante 3 horas, seguida ou não de uma post-fixação em tetróxido de ósmio. Os blocos foram seccionados em um ultramicrotomo Porter-Blum, modelo MT-1, utilizando navalhas de vidro. As secções foram montadas em retículos de cobre, cobertas com membrana de colódio, contrastadas com nitrato de chumbo (17) e examinadas em um microscópio electrônico Siemens Elmiskop I (4).

(3) Notações e nomenclatura utilizadas na Seção de Virologia do Instituto Agrônomo, em Campinas.

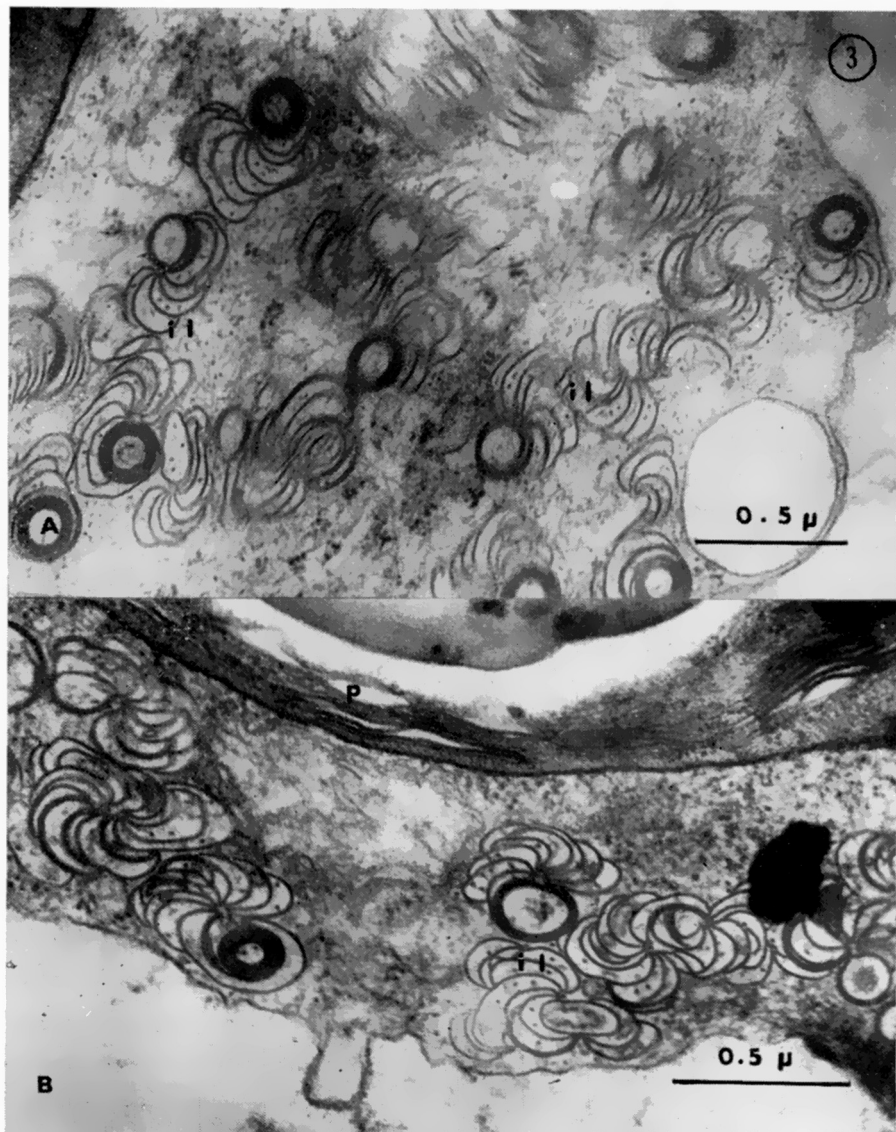
(4) Doação conjunta do Conselho Nacional de Pesquisas e da Fundação Rockefeller.



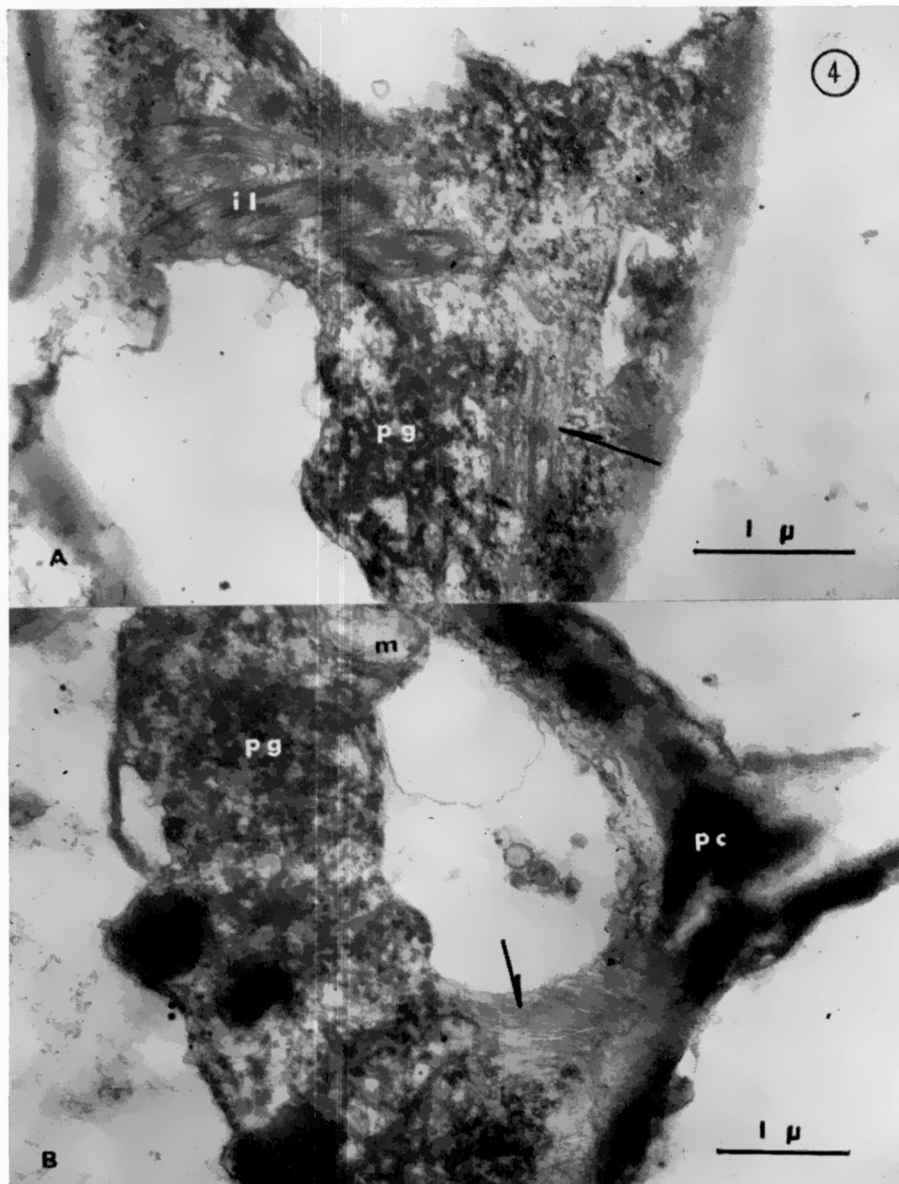
Parte de célula do parênquima paliádico de fôlha de fumo, infetado pela estirpe Y<sup>wn</sup> do VYB. Nota-se numa das células as inclusões lamelares (*il*) em forma de cata-vento e de anéis concêntricos, enquanto noutra, de elementos lineares, dispostos paralela-mente. Ambas representam secções diferentes de uma mesma estrutura, em forma de lâminas arqueadas ou cilíndricas. *m* — mitocôndrio; *p* — plastídio; *pc* — parede celular.



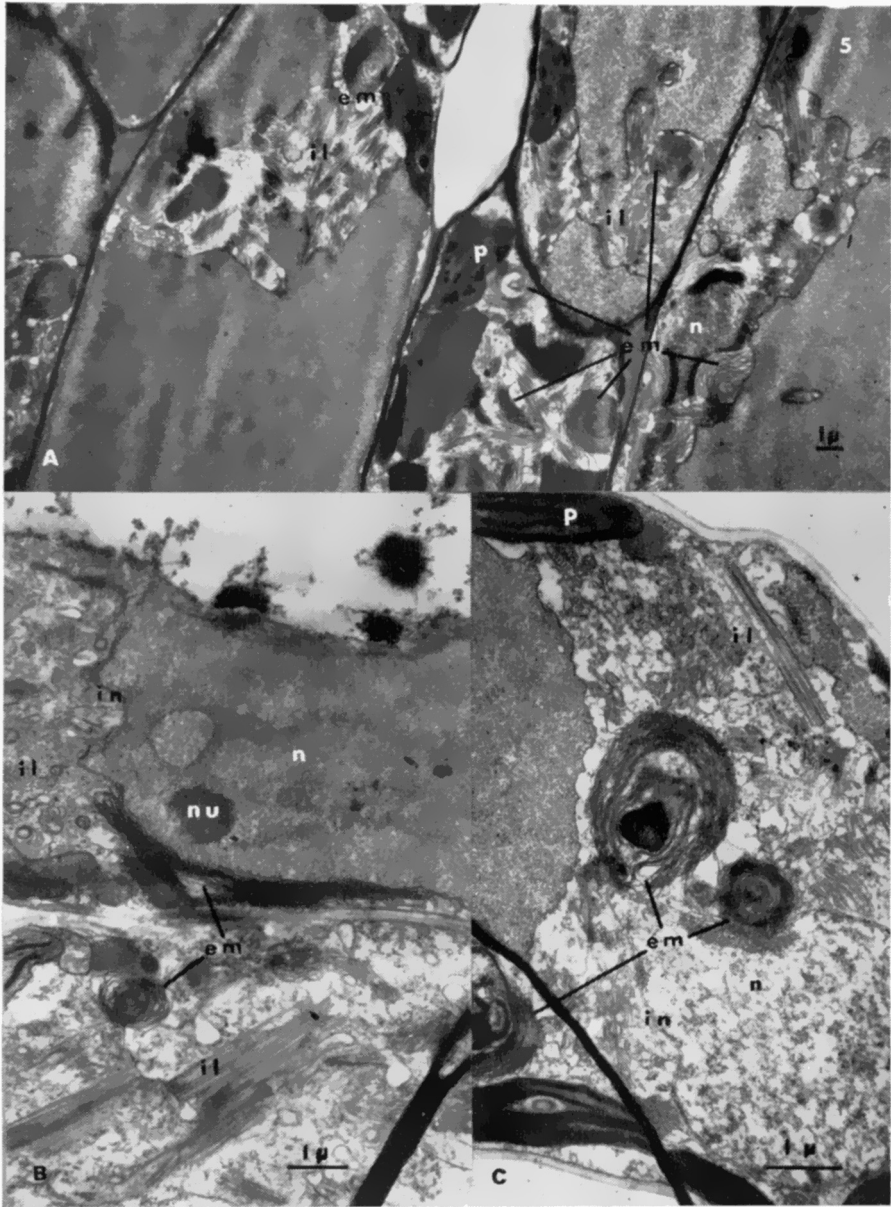
Detalhes das inclusões lamelares (*il*), quando dispostas perpendicularmente à parede celular (*pc*), em folha de fumo infetado: *A* — pela estirpe *Y<sup>el</sup>*; *B* — pela estirpe *Y<sup>w</sup>*. *m* — mitocôndrio; *p* — plastídio.



Detalhes das secções das inclusões lamelares (*il*), em forma de catavento ou anéis concêntricos, em fôlha de fumo infectado: *A* — pela estirpe Y<sup>g</sup>; *B* — pela estirpe Y<sup>f</sup>. Notar em *A* as partículas do vírus dispersas no citoplasma. Os pontos densos que aparecem entre as lâminas das inclusões parecem ser secções de partículas alongadas, provavelmente do vírus. *p* — plastídio.



Grupos de partículas alongadas e grossas (*pg*), aparentemente enveladas, encontradas ocasionalmente em tecido foliar, de fumo, infetado pelas estirpes: *A* — *Y<sup>el</sup>* e *B* — *Y<sup>c</sup>*. Nas suas proximidades podem ser observados grupos de partículas filamentosas, provávelmente do vírus (setas). *il* — inclusão lamelar; *pc* — parede celular; *m* — mitocôndrio.



Estruturas membranas (*em*) que surgem em tecidos de plantas infetadas pelas estirpes *Y<sup>p</sup>* e *Y<sup>nt</sup>*. *A* — Vista geral de células do parênquima paliádico de fôlha de *Nicandra physaloides* infetado pela estirpe *Y<sup>p</sup>*; *B* — Duas células adjacentes, em fôlha de fumo infetada pela estirpe *Y<sup>nt</sup>*. Uma enorme estrutura membransa acha-se aposta ao invólucro nuclear (*in*); *C* — Detalhe de uma célula de fôlha de fumo infetada pela estirpe *Y<sup>p</sup>*. Duas estruturas membranas podem ser observadas nas proximidades do núcleo (*n*). *il* — inclusão lamelar; *nu* — nucléolo; *p* — plastídio.

## 3 — RESULTADOS

Nos tecidos de tôdas as plantas infetadas, independentes da estirpe do VYB utilizada para a infecção, notou-se a ocorrência de inclusões características no citoplasma (estampas 1-3, 5). A quantidade destas inclusões variava numa mesma planta de célula para célula, possivelmente correlacionada com a severidade dos sintomas apresentados pela planta infetada, e sua ausência era total nas plantas não inoculadas. Cada inclusão se constituía de um conjunto de elementos lineares, de cerca de 6-7  $m\mu$  de espessura e comprimento variável, e suas dimensões gerais variavam de 0,5-1  $m\mu$  de largura por 2-4  $m\mu$  de comprimento. A disposição destes elementos lineares nas inclusões era basicamente de dois tipos: a) Elementos lineares retilíneos e dispostos lado a lado. Em geral uma das extremidades destes conjuntos ficava no mesmo plano, enquanto a outra era irregular. Em muitas ocasiões, quando estas inclusões se achavam em zonas estreitas do citoplasma, entre o vacúolo e a parede celular, elas se dispunham, em geral, perpendicularmente a esta última. A extremidade plana ficava em contato com a parede da célula, e a irregular, como que projetada para o vacúolo (estampa 2); b) Elementos lineares curvos, em forma de anéis concêntricos, ou vários elementos curvados no mesmo sentido, partindo estas linhas curvas de um ponto comum, formando figuras que lembram cataventos, podendo a outra extremidade estar livre ou em contato com o braço seguinte desse «catavento» (estampa 3). Muitas vezes, entre dois braços do «catavento», podiam-se notar granulações densas (ca. 10  $m\mu$  de diâmetro) entre as lamelas.

Embora não muito freqüentemente, notavam-se elementos filamentosos no citoplasma, dispostos ao acaso (estampas 3A, 4B) ou paralelamente (estampa 4A), com cerca de 10  $m\mu$  de diâmetro e comprimento indeterminado.

No caso da combinação estirpe-planta hospedeira, que induz necroses, como é o caso da estirpe Y# (5) em tomateiro, não se pôde determinar a seqüência do processo necrótico. As células em vias de se necrosarem apresentavam todavia citoplasma bastante adensado, plastídios em degeneração, pouca ou quase nenhuma estrutura citoplasmática reconhecível, e o núcleo tornava-se também adensado, mas apresentando várias zonas, possivelmente onde estaria o material cromático, bem



ralas. A célula no seu todo contraía-se, e, freqüentemente, o tonoplasto achava-se rompido.

Embora não houvessem sido encontradas diferenças marcantes nas células infetadas pelas diferentes estirpes, pelo menos duas características foram associadas à infecção com um pequeno grupo de estirpes.

Em células de plantas infetadas pelas estirpes  $Y^c$  e  $Y^{et}$  ocasionalmente foram encontrados no citoplasma agregados de partículas grossas, de cerca de 50-60  $m\mu$  de diâmetro, enoveladas e relativamente densas (estampa 4).

Por outro lado, em células infetadas com as estirpes  $Y^p$  e  $Y^{nt}$ , apareciam freqüentemente estruturas membranosas, formando lamelas concêntricas ou pilhas de membranas, que podiam atingir dimensões bastante avantajadas, em certos casos, equivalentes às do núcleo (estampa 5). Sua ocorrência era no citoplasma, livre, sem contato com outras estruturas celulares, ou ocasionalmente aposta ao invólucro nuclear (estampa 5C). Quando em forma de pilhas de lamelas, percebia-se que na extremidade livre as membranas se fundiam aos pares (estampa 5B). Assim, na realidade essas estruturas seriam uma pilha de cisternas achatadas, como se fôsem um gigantesco complexo de Golgi. No outro tipo de configuração, nem sempre era possível verificar se as lamelas eram concêntricas ou espiraladas; contudo, em secções favoráveis notava-se claramente a disposição concêntrica dessas lamelas. Na região central dessa estrutura freqüentemente se achavam presentes gotículas densas de natureza provavelmente lipídica (estampa 5B).

#### 4 — DISCUSSÃO

O exame ao microscópio eletrônico de tecidos de diferentes plantas infetadas por diferentes estirpes do VYB não trouxe novas luzes para explicar as razões da diferença nos sintomas por elas induzidas. Além de características comuns a tôdas as estirpes pôde-se todavia notar alguns padrões típicos a determinados grupos de hospedeiros, pelo menos intracelularmente. Num dos casos houve mesmo coincidência entre as alterações externas severas das plantas infetadas por duas das estirpes estudadas, com a ocorrência intracelular de certas formações.

As inclusões observadas invariavelmente no citoplasma de células infetadas com o VYB, seja qual fôr a estirpe considerada, parecem repre-

sentar secções diferentes de formações cilíndricas, conforme sugerido por Edwardson (7). Em secção transversal elas dariam origem às formações de linhas curvas, e em secção longitudinal, às de linhas retilíneas, embora nesta última disposição pudesse sugerir um feixe de partículas filamentosas.

A sua origem e a sua associação com as partículas do vírus ainda não estão perfeitamente compreendidas, ocorrendo em tecidos de plantas infetadas por praticamente todos os vírus do grupo morfológico do vírus Y da batata até aqui examinados (3, 8, 9, 10, 12, 14, 19, 20).

Ocasionalmente nas adjacências destas inclusões ocorriam dispersos no citoplasma partículas filamentosas que pareciam representar o VYB *in situ*, dada a sua semelhança morfológica com as partículas vistas *in vitro* (1, 11). É possível que as granulações densas entre as lamelas representem secções transversais destas partículas, que estariam dispostas paralelamente às formações lamelares.

Embora, de maneira geral, fôsse difícil distingüir uma estirpe da outra em secções, certos tipos de inclusões foram caracteristicamente associados a determinadas estirpes: agregados de partículas de diâmetro 50-60 m $\mu$  que apareceram nos tecidos infetados pelas estirpes Y<sup>c</sup> e Y<sup>el</sup> e as formações lamelares associadas às estirpes Y<sup>p</sup> e Y<sup>nt</sup>.

A natureza destas partículas grossas não se acha ainda estabelecida. Algumas hipóteses poderiam ser formuladas, tais como: a) formas semelhantes a certas partículas grossas que aparecem em tecidos de plantas infetadas pelo vírus do mosaico comum do fumo (VMCF) e interpretadas como uma forma intermediária, altamente hidratada, da formação dêste vírus (18). Esta hipótese se acha, todavia, um tanto prejudicada pela sua presença, associada a apenas duas das dezessete estirpes examinadas, tornando difícil explicar sua ausência nas outras estirpes. Mesmo no caso do VMCF, Milne (16) objeta a sugestão de Shalla (18), embora não exclua a sua possível associação com a infecção; b) produtos de degeneração de alguma organela celular. Esta hipótese não é muito convincente, pois em dezenas de outras plantas hospedeiras infetadas não só com outras estirpes do VYB, mas também com vários outros vírus que induzem uma enorme variedade de reações às células infetadas, em nenhum caso observou-se organela celular degenerada, de forma similar; c) produto da reação celular formada especificamente sob a ação da infecção com as estirpes Y<sup>c</sup> e Y<sup>el</sup>, e, possivelmente, de algumas outras ainda não investigadas.

Quanto às inclusões membranosas, associadas à infecção com as estirpes Y<sup>p</sup> e Y<sup>nt</sup>, é provável que representem estruturas de Golgi hipertrofiadas. A variedade de forma com que elas aparecem, ou como pilhas de vesículas achatadas e extensas, ou como um sistema de membranas concêntricas, parece decorrer de secções diferentes de uma estrutura formada por uma pilha de cisternas com pronunciado arqueamento. A semelhança morfológica, salvo pelas dimensões, com as estruturas de Golgi normalmente presentes nas células não infetadas foi considerada para esta suposição, pois o sistema de pilhas de cisternas, com seus bordos dilatados, é característico a esta estrutura. A associação com o invólucro nuclear parece ser meramente casual e resultante dos movimentos citoplasmáticos. Durante o processo que leva à hipertrofia, é possível que a estrutura de Golgi se apusesse ao invólucro nuclear, e aí permanecesse. Um certo desenvolvimento da estrutura de Golgi já foi descrito nos «Haustórios de Cuscuta» (2), mas no presente caso as razões desse gigantismo do dictiosoma ainda não são conhecidas.

A existência de certas formações características, em células infetadas por determinados grupos de estirpes do VYB, faz com que elas tenham também valor diagnóstico. Algumas dessas formações são visíveis mesmo ao microscópio comum, o que torna possível esta diagnose mesmo sem contar com o microscópio eletrônico.

#### ELECTRON MICROSCOPICAL COMPARISON OF TISSUES OF PLANTS INFECTED WITH DIFFERENT STRAINS OF POTATO VIRUS Y WHICH OCCUR IN SÃO PAULO

##### SUMMARY

Comparative electron microscopy of tissue sections of different plants, infected with one of the 17 different strains of potato virus Y (PVY) found in São Paulo state was carried out.

Infection of plants, with any of the strains utilized, was always followed by the appearance of characteristic inclusions in the cytoplasm. These inclusions appeared as linear elements (6-7 m $\mu$  thick) arranged in a loose parallel array, or forming curled, ring- or pin-wheel-like structures. Similar inclusions are described in tissues infected with other viruses morphologically similar to PVY. The role of these structures in the virus infection is still not known.

Occasionally, particles resembling those found *in vitro* appeared scattered randomly in the cytoplasm or sometimes associated with the cylindrical inclusions.

Infection with strains Y<sup>c</sup> and Y<sup>el</sup> resulted in occasional appearance of aggregates of thick and elongated particles, abt. 50-60 m $\mu$  in diameter. On the other hand, in

tissues infected with strains Y<sup>p</sup> and Y<sup>nt</sup>, membranous structures were found conspicuously in the cytoplasm, which consisted of a pile of flat cisternae. It seems that these structures might represent hypertrophied Golgi elements.

### LITERATURA CITADA

1. BODE, O. & PAUL, H. L. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Kartoffel-Viren. III. Vermessungen an Teilchen des Kartoffel-Y-Virus. *Phytopath. Z.* 27:107-112, 1956.
2. BONNEVILLE, M. A. & VOELLER, B. R. A new cytoplasmic component of plant cells. *J. Cell Biol.* 18:703-708, 1963.
3. CAMARGO, I. J.; KITAJIMA, E. W. & COSTA, A. S. Microscopia electrónica comparativa dos tecidos de plantas infetadas pelos vírus do mosaico comum e amarelo do feijoeiro. (Em preparo)
4. COSTA, A. S.; CARVALHO, A. M. B. & KITAJIMA, E. W. Risca do tomateiro em S. Paulo, causada por uma estirpe do vírus Y. *Bragantia*, 19: [1111]-1128, 1960.
5. ——— & NAGAI, H. Estirpes do vírus Y da batata afetando culturas de solanáceas no Estado de S. Paulo. (Dados não publicados)
6. ———; ——— & KITAJIMA, E. W. Estirpe do vírus Y de valor experimental. Reunião Anual da Soc. Bras. Olericultura, Rio de Janeiro, 1967.
7. EDWARDSON, J. R. Cylindrical inclusions in the cytoplasm of leaf cells infected with tobacco etch virus. *Science*, 153:883-884, 1966.
8. ———. Electron microscopy of cytoplasmic inclusions in cells infected with tobacco etch virus. *Science*, 153:359-364, 1966.
9. HAYASHI, T.; MATSUI, C. & YAMAGUCHI, A. Electron microscopy of intracellular turnip mosaic virus. *Phytopathology*, 55:458-461, 1965.
10. KITAJIMA, E. W.; CARVALHO, A. M. B. & COSTA, A. S. Microscopia electrónica de estirpes do vírus Y da batata que ocorrem em São Paulo. *Bragantia*, 21:[755]-763, 1962.
11. ——— & COSTA, A. S. Celery yellow mosaic virus: particle morphology and intracellular behaviour. (Submetido a publicação em *Virology*)
12. LEE, P. E. Electron microscopy of inclusions associated with wheat streak mosaic virus. *J. Ultrast. Res.* 13:359-366, 1966.
13. LUFT, J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9:409-414, 1961.
14. MATSUI, C. & YAMAGUCHI, A. Electron microscopy of host cell infected with tobacco etch virus. I. Fine structure of leaf cells at later stages of infection. *Virology*, 22:40-77, 1964.
15. MILLONIG, G. Studio sui fattori che determinano la preservazione della ultrastruttura. In: From molecule to cell — Symposium on Electron Microscopy. Buffa, P., ed. Roma, 1964. p. 347-362.
16. MILNE, R. G. Multiplication of tobacco mosaic virus in tobacco leaf palisade cells. *Virology*, 28:78-89, 1966.
17. REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17:208-211, 1963.
18. SHALLA, T. A. Assembly and aggregation of tobacco mosaic virus in tomato leaflets. *J. Cell Biol.* 21:253-264, 1964.
19. WEINTRAUB, M. & RAGETIL, H. W. Fine structure of inclusions and organelles in *Vicia faba* infected with bean yellow mosaic. *Virology*, 28: 290-302, 1966.
20. YAMAGUCHI, A.; KIKUMOTO, T. & MATSUI, C. Electronmicroscopy of elongated particles associated with tulip mosaic. *Virology*, 20:143-146, 1963.