

BRAGANTIA

Boletim Científico do Instituto Agronômico do Estado de S. Paulo

Vol. 27

Campinas, outubro de 1968

N.º 33

ESTUDO AO MICROSCÓPIO ELECTRÔNICO DE TECIDOS DE PLANTAS INFETADAS PELO VÍRUS DO MOSAICO COMUM E MOSAICO AMARELO DO FEIJOEIRO (1)

I. J. B. DE CAMARGO, *biologista* (2), E. W. KITAJIMA e A. S. COSTA, *engenheiros-agrônomos, Seção de Virologia, Instituto Agronômico*

SINOPSE

Exames ao microscópio eletrônico de tecidos foliares e radiculares de plantas infetadas pelo vírus do mosaico comum ou do mosaico amarelo do feijoeiro, mostraram a presença de dois tipos de inclusões no citoplasma: filamentosas, consideradas como partículas de vírus, e lamelares, típicas dos vírus do grupo Y. Essas inclusões não foram encontradas no pólen ou no óvulo de feijoeiros infetados. Como o vírus do mosaico comum do feijoeiro é transmitido pelo pólen, sugere-se que êle ocorre nestas células em concentração muito baixa, ou mesmo na forma de ácido nucléico.

1 — INTRODUÇÃO

Dois vírus do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) são encontrados no Estado de São Paulo, com relativa frequência. São êles o vírus do mosaico comum (VMCF) e o do mosaico amarelo (VMAF), cujas partículas medem 750 m μ de comprimento normal e 12-15 m μ de diâmetro. Ambos pertencem ao grupo morfológico do vírus Y da batata, na classificação dos vírus de forma alongada (3).

A moléstia provocada por êstes vírus se manifesta de maneira distinta, mas mesmo assim são os VMCF e VMAF considerados como pertencentes ao mesmo complexo, devido à semelhança morfológica das partículas e relações serológicas (1, 2, 4).

(1) Trabalho parcialmente auxiliado pelo CNPq (TC 4827) e pela FAPESP (C. Agron. 66/107). Recebido para publicação em 20 de novembro de 1967.

(2) Bolsista de aperfeiçoamento da FAPESP.

Uma característica diferencial entre êstes vírus é o fato de o vírus do mosaico comum ser transmissível através do pólen e da semente, enquanto o do mosaico amarelo não o é (5, 14, 15).

A fim de investigar a ocorrência das partículas no interior dos tecidos de plantas afetadas, a sua distribuição e os efeitos citopatogênicos, secções histológicas de material infetado foram examinadas ao microscópio electrónico. Os resultados dessas observações são relatados no presente trabalho.

2 — MATERIAL E MÉTODOS

Planta hospedeira e vírus — Utilizaram-se como plantas hospedeiras, feijoeiros das variedades Scotia e Manteiga previamente inoculados mecânicamente com VMCF e VMAF, da coleção da Seção de Virologia, Instituto Agrônomo. Destas plantas infetadas, foram usados tecidos foliares, radiculares e florais. Pólen e ovário de plantas atacadas foram coletados em diferentes estádios de desenvolvimento. Também fôlhas de fava (*Vicia faba* L.) infetada com VMAF foram utilizadas.

Técnicas de microscopia electrónica — A constatação de partículas do VMAF e do VMCF no material a ser preparado para histologia foi verificada previamente, utilizando-se a técnica do “dip”-contrastação negativa (9).

O pólen e o ovário foram fixados em glutaraldeído a 3% em tampão fosfato de sódio 0,2M durante 3 horas a 4°C. A seguir, o material foi fixado em ácido ósmico a 1% durante 10-12 horas a baixa temperatura (17). Fôlha, raiz e flor (sépalas e pétalas) foram fixadas em ácido ósmico a 1% em tampão fosfato de sódio 0,2M a 4°C (13). O material foi desidratado em acetona, incluído em Epon 812 (10). A secção foi feita em ultramicrotomo Porter-Blum com navalhas de vidro. Os cortes foram montados em telinhas de cobre revestidas com uma película de colódion, corados com citrato de chumbo (16) e examinados ao microscópio electrónico Siemens Elmiskop I (3).

3 — RESULTADOS

Preparações rápidas — Nas preparações de “dip”-contrastação negativa, feitas a partir de fôlhas infetadas pelo VMAF e

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

VMCF, foram freqüentemente encontradas partículas de morfologia similar àquelas já descritas na literatura para os dois vírus (4). Em nenhum caso foram encontradas partículas em preparações feitas a partir de plantas sadias. As partículas associadas ao VMCF e VMAF, consideradas como representando o vírus, apareciam como filamentos flexíveis, de comprimento normal (CN) de ca. 750 m μ e de 12-15 m μ de diâmetro.

Secções ultra-finas em feijoeiro — Nas células do tecido foliar e nas do tecido radicular infetados pelo VMAF e VMCF, foram observadas no citoplasma inclusões características, semelhantes àquelas descritas na literatura para o VMAF e outros vírus do grupo (6, 7, 8, 11) (estampas 1A, 1B e 2C). Dois tipos básicos de inclusões podem estar presentes: filamentosas e lamelares.

As inclusões filamentosas foram observadas somente nos tecidos foliar e radicular de feijoeiros infetados com VMCF (estampas 1C e 2C). São formadas por filamentos de diâmetro de ca. 10-12 m μ e aparecem, em algumas micrografias (estampa 2C), dispersas no citoplasma, entre inclusões lamelares, algumas vezes sugerindo uma íntima relação entre elas, como se tais filamentos se desprendessem das lamelas. A natureza fibrilar dessas inclusões era facilmente inferida, quando observadas em corte transversal e longitudinal (estampa 2C).

Quando a secção era longitudinal, filamentos de comprimento uniforme (ca. 700-800) se agrupavam em disposição ordenada, mas não compactamente (estampa 1C).

As secções examinadas mostraram que as inclusões lamelares apareciam com perfis variados, dependendo do plano de secção. As observações feitas sugerem que se trata de secções em planos diferentes de um mesmo tipo de inclusão lamelar e cilíndrica, em concordância com as observações feitas por Edwardson (5). Estas inclusões apareciam em secções como: a) Feixe de elementos lineares, retilíneos, dispostos paralelamente, de maneira frouxa e dimensões variadas (usualmente $0,5 \times 4-5 \mu$), e cada elemento linear com cerca de 5-10 m μ de espessura. Geralmente uma das extremidades de tal formação terminava em um mesmo plano, enquanto a outra era irregular (estampas 1A e 2C); b) Arranjos de elementos lineares curvos, formando anéis concêntricos (estampas 1B e 2C), ou com uma das extremidades partindo de um ponto comum, produzindo figuras que lembram cataventos (estampas 1A, 1B e 2C).

Cêrca de 40 a 50 grãos de pólen, maduros ou em fases precedentes, de diferentes plantas de feijoeiro, infetados por VMCF ou VMAF, foram cuidadosamente examinados ao microscópio electrónico. Em nenhum caso foram notadas quaisquer diferenças em relação aos grãos de pólen de plantas sadias, bem como a presença de partículas de vírus semelhantes àquelas observadas em fôlha e raiz.

Secção ultra-fina em fava — Inclusões filamentosas semelhantes às observadas nas células de feijoeiro infetado com o VMCF, foram encontradas nas fôlhas de fava infetada com o VMAF, mantendo entretanto certas particularidades. Usualmente os filamentos também se apresentavam lado a lado, mas formando uma massa mais compacta do que as observadas em feijoeiro, com comprimento aproximadamente igual ao CN (estampa 2B). Geralmente êstes agrupamentos apareciam aos pares, unidos pelas extremidades, mostrando entre êles uma nítida delimitação formada por uma substância granular e densa. A imagem produzida nessa circunstância assemelha-se às disposições das miofibrilas dos músculos estriados.

Em fava infetada com o VMAF, foram encontradas inclusões lamelares com nítida predominância de elementos lineares dispostos mais compactamente, formando bandas densas (estampa 2A), como aquelas descritas em tecidos infetados pelo vírus do mosaico do nabo (8).

Nas células do tecido foliar de fava infetada pelo VMAF, foram encontradas, ocasionalmente, áreas que continham gotículas densas, de ca. 200-500 m μ de diâmetro, aproximadamente esferoidais, sem possuírem membrana limitante e sem terem relação visível com as organelas celulares (estampa 2A). Sua natureza é aparentemente lipídica, contudo desconhece-se ainda se ela está relacionada diretamente com a infecção pelo VMAF. Grande número de vesículas de tamanho variado, foram usualmente encontradas no citoplasma, em tórno dêsses corpos densos.

Em nenhum caso foram encontrados cristais intranucleares associados à infecção com o VMAF e VMCF.

4 — DISCUSSÃO

As partículas alongadas, de ca. 750 m μ de comprimento normal e 15 m μ de diâmetro, encontradas nas preparações de "dip"-contrastação negativa de amostras de fôlhas infetadas devem

representar as partículas do VMCF e do CMAF. A sua constante associação com o material infetado, a similaridade morfológica com as partículas consideradas como sendo VMCF e VMAF, descritas na literatura (4), e a ocorrência de partículas semelhantes no interior de células infetadas apoiam tal asserção.

De uma maneira geral, há uma certa dificuldade em identificar ao microscópio electrónico partículas de vírus do grupo morfológico do vírus Y da batata, em células infetadas. Todavia, no presente caso, pôde-se observar partículas filamentosas dispersas no citoplasma ou formando arranjos mais ou menos ordenados em tecidos de plantas infetadas pelo VMCF e VMAF, com características morfológicas similares às das partículas *in vitro*, e que devem representar estes vírus *in situ*.

Weintraub e Ragetli investigaram ao microscópio electrónico tecidos foliares de *Vicia faba* infetados pelo VMAF (18) e descreveram apenas um tipo de inclusão no citoplasma constituída de um arranjo frouxo de elementos alongados, associados a uma banda densa, considerados como partículas deste vírus. Essas bandas densas associadas às partículas de vírus, foram também encontradas, no presente trabalho, em fava, tendo sido interpretadas como secções de várias inclusões lamelares dispostas paralela e compactamente.

A natureza das inclusões lamelares e cilíndricas observadas nas hospedeiras não está ainda bem esclarecida. Alguns autores consideram-nas partículas de vírus (8, 11), mas os estudos de Edwardson (5) parecem demonstrar convincentemente a estrutura lamelar e não filamentosa, de tais inclusões. Os três tipos de inclusões que aparecem em secção seriam ângulos diferentes de uma mesma estrutura lamelar. Sua ocorrência é comum em praticamente todos os tecidos infetados com os vírus do grupo morfológico do vírus Y da batata (6). Por outro lado as inclusões lamelares poderiam estar intimamente associadas ao processo sintético das partículas de vírus, como sugere a estampa 2C, ou então representar uma reacção mais ou menos específica da célula à infecção com a maioria dos vírus do grupo Y da batata.

A disposição das inclusões lamelares no interior da célula nas duas hospedeiras estudadas — feijoeiro e fava — não mostrou muita variação, obedecendo o padrão dos vírus do grupo Y da batata.

Não foram observadas inclusões típicas nem partículas de vírus nos grãos de pólen e óvulos, em todos os casos examinados. Entretanto, como o VMCF é transmissível através do pólen, é necessário postular que ele ocorre nessa estrutura em tão baixa concentração, que se torna difícil observá-lo, ou então se encontra na forma de ácido nucléico.

ELECTRON MICROSCOPY OF COMMON AND YELLOW BEAN MOSAIC VIRUSES IN INFECTED TISSUES

SUMMARY

Two types of cytoplasmic inclusions were observed in leaf and root tissues of host plants infected with the common and yellow bean mosaic viruses: (1) filamentous inclusions considered as an aggregate of virus particles and (2) lamellar inclusions which appeared with varied configurations that represent sections at different angles of the same cylindrical structure.

No type of inclusion or virus particle was seen in pollen and ovule from bean plants infected with each of the two viruses. Since, however, the common bean mosaic virus is transmitted through the pollen it is suggested that it occurs in very low concentration in this structure or else as viral nucleic acid.

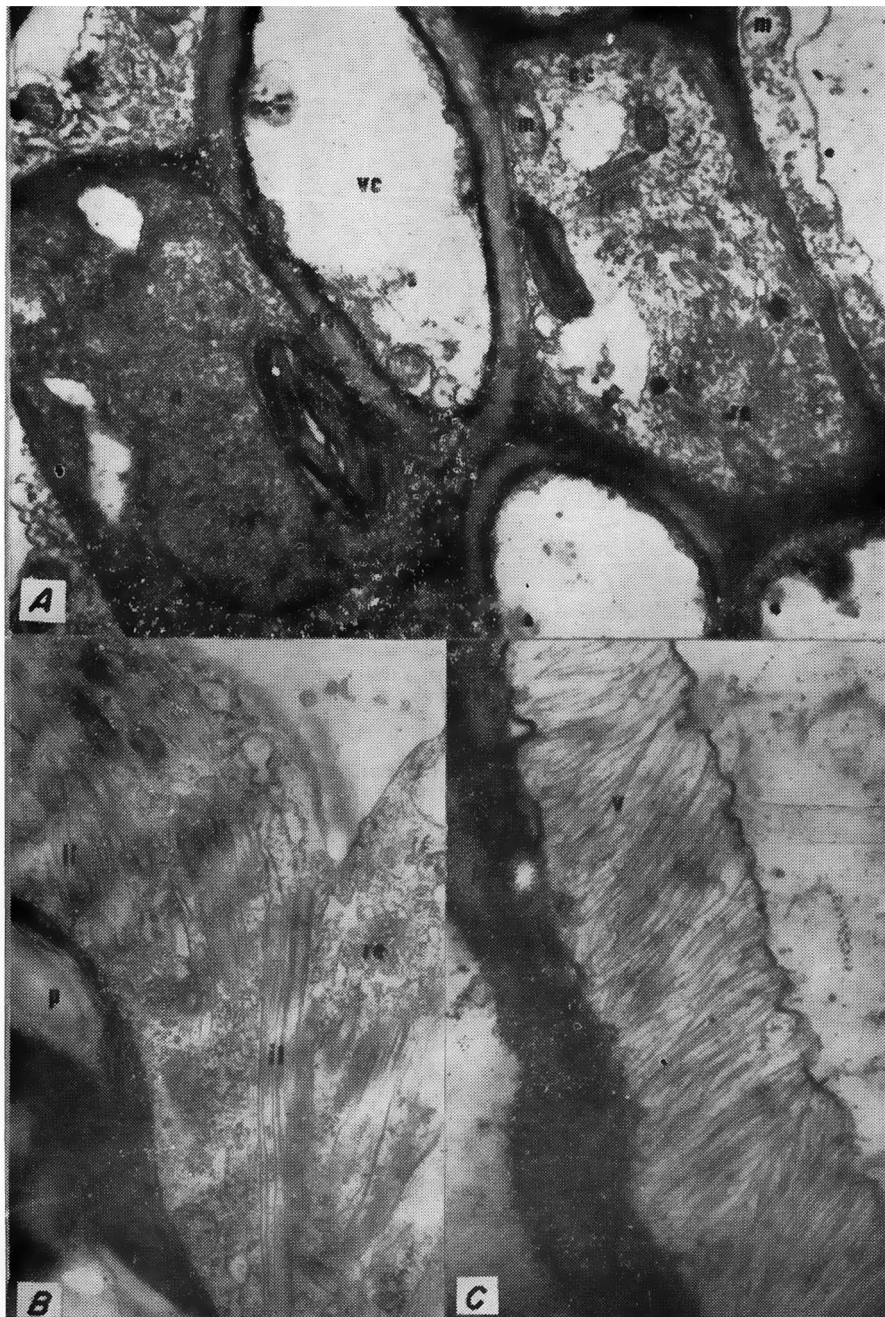
LITERATURA CITADA

1. BEEMSTER, A. B. R. & VAN DER WANT, J. P. H. Serological investigations on the *Phaseolus vulgaris* 1 and 2. *Antonie van Leeuwenhoek*, 17:285-296, 1951.
2. BERCKS, R. Serologische Untersuchungen zur differenzierung von Isolaten des *Phaseolus-Virus* 2 und ihrer Verwandtschaft mit *Phaseolus-Virus* 1. *Phytopath. Z.* 39:120-128, 1960.
3. BRANDES, J. Identifizierung von gestreckten pflanzenpathogenen Viren auf morphologischer Grundlage. *Mitt. biol. BundAnst. Ld.- u. Forstw.*, Berlin 110:1-130, 1964.
4. ————— & QUANTZ, L. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Buschbohnenviren (*Phaseolus-Virus* 1 und *Phaseolus Virus* 2). *Naturwissenschaften* 42:588, 1955.
5. COSTA, A. S. Comunicação pessoal.
6. EDWARDSON, J. R. Cylindrical inclusions in the cytoplasm of leaf cells infected with tobacco etch virus. *Science* 153:883, 1966.

7. EDWARDSON, J. R. Electron microscopy of cytoplasmic inclusions in cells infected with rod-shaped viruses. *Am. J. Bot.* 53:359-364, 1966.
8. HAYASHI, T.; MATSUI, C. & YAMAGUCHI, A. Electron microscopy of intra-cellular turnip mosaic virus. *Phytopathology* 55:458, 1965.
9. KITAJIMA, E. W. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. *J. Electromicroscopy*, Tokyo 14:119-121, 1965.
10. LUFT, J. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. biophys. biochem. Cytol.* 9:409-414, 1961.
11. MCWHORTER, F. P. Isometric crystals produced by *Pisum virus 2* and *Phaseolus virus 2*. *Phytopathology* 31:760-761, 1941.
12. MATSUI, C. & YAMAGUCHI, A. Electron microscopy of host cells infected with tobacco etch virus. I. Fine structures of leaf cells at later stages of infection. *Virology* 22:40-47, 1964.
13. MILLONING, G. Studio sui fattori che determinano la preservazione della ultrastruttura. In: From molecule to cell. Symposium on Electron Microscopy. P. Buffa, ed. Roma, 1964. p. 347-362.
14. REDDICH, D. La transmission du virus de la mosaïque du haricot par le pollen. *Extr. du Deux. Cong. Inst. Path. Comp.* 1931. p. 363-366.
15. ————— & STEWART, B. V. Transmission of the virus of bean mosaic in seed and observations on thermal death-point of seed and virus. *Phytopathology* 9:445, 1919.
16. 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.
17. SABATINI, D. D.; BENSCH, K. & BARNETT, R. J. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixative. *J. Cell Biol.* 17:19-58, 1963.
18. WEINTRAUB, M. & RAGETLI, H. W. J. Fine structure of inclusions and organelles in *Vicia faba* infected with bean yellow mosaic virus. *Virology* 28:390-402, 1966.

Estampa 1

Micrografia eletrônica de tecidos de plantas infetadas pelo vírus do mosaico comum do feijoeiro: A — Região vascular de folhas de feijoeiro. Inclusões lamelares (il) paralelas ou em forma de catavento, numa célula companheira (cc) do vaso crivado (vc); **m**- mitocôndrio, **pc**- parede celular, **n**- núcleo, **p**- plastídeo. **B** — Célula de folha de feijoeiro com inclusões lamelares (il), **re**- retículo endoplasmático; **p**- plastídeo. **C** — Secção de tecido radicular de feijoeiro. Detalhe de uma célula cortical mostrando uma inclusão filamentosa com partículas (v) dispostas frouxamente, numa estreita faixa entre o vacúolo e a parede celular (pc).



Estampa 2

Micrografia eletrônica de tecidos de plantas infetadas pelo vírus do mosaico comum e mosaico amarelo do feijoeiro: **A** — Parte de uma célula foliar de feijoeiro infetado pelo VMCF, em que aparecem inclusões lamelares (il) seccionadas em diferentes planos e um agrupamento de partículas filamentosas (v) próximas ao vacúolo (vac); **p**- plastídeo, **m**- mitocôndrio. **B** — Secção de folhas de fava infetada pelo VMAF, onde se vê dois grupos de partículas filamentosas (v) formando arranjos paralelos de tamanho uniforme, separados por uma zona densa; **m**- mitocôndrio, **p**- plastídeo. **C** — Secção de folha de fava infetada com o VMAF. As inclusões lamelares (il) aparecem formando bandas densas; dispersas no citoplasma vêem-se góticulas de material denso.

