

BRAGANTIA

Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo

Vol. 17

Campinas, dezembro de 1958

N.º 12

PURIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DO VÍRUS DO MOSAICO DO QUENOPÓDIO (*)

DARCY M. SILVA, engenheiro-agrônomo, Seção de Virologia, Instituto Agrônomo, MÁRIO MENEGHINI, engenheiro-agrônomo, Seção de Bioquímica Vegetal, Instituto Biológico, e HELENA LOPES DE SOUZA SANTOS (**), eletromicroscopista, Seção de Microscopia Eletrônica, Universidade de São Paulo

RESUMO

O vírus do mosaico do quenopódio foi purificado por meio de centrifugações alternadas de baixa e alta velocidade, complementadas pelo tratamento com clorofórmio e álcool amílico. Foram obtidas preparações altamente ativas, que apresentaram as reações características das proteínas e um espectro de absorção da luz ultravioleta igual ao das nucleoproteínas, e que não apresentavam o fenômeno de anisotropia de fluxo. O sedimento dessas preparações purificadas, obtido na ultracentrifuga, retomado em um pequeno volume de solução de sulfato de amônio 0,2 saturada e guardado a 4°C, produz um grande número de microcristais.

As partículas que compõem as preparações examinadas ao microscópio são de aspecto e dimensões bastante uniformes; são "esféricas" e de cerca de 30 milimicrons de diâmetro.

O material purificado se assemelha ao vírus do mosaico "southern bean", quanto ao aspecto dos cristais, mas os testes de hospedeiros e sorológicos indicaram tratar-se de dois vírus perfeitamente distintos.

1 — INTRODUÇÃO

Estudos realizados por Costa e Bennett (1), sobre as propriedades e, principalmente, os hospedeiros de um vírus que atacava o *Chenopodium murale* L., indicaram que êle diferia dos demais vírus até então descritos na literatura.

Tratando-se de um novo vírus, bastante resistente à desnaturação e que ocorre em alta concentração no hospedeiro, resolvemos tentar

(*) Trabalho em parte realizado com equipamento doado pela Fundação Rockefeller. Recebido para publicação em 21 de dezembro de 1957.

(**) Bolsistas do Conselho Nacional de Pesquisas.

(1) COSTA A. S. & BENNETT, C. W. 56bre os hospedeiros do vírus do mosaico do quenopódio. Campinas, Instituto agrônomo, 1956. [Comunicação verbal]

purificá-lo, pois além do interesse científico apresentado pelo problema, essas propriedades indicavam que as nossas tentativas poderiam ser bem sucedidas.

Os resultados preliminares dos trabalhos realizados por dois dos autores já foram objeto de uma comunicação prévia (10).

Na presente publicação se descrevem com mais pormenores alguns fatos observados no transcorrer dessas tentativas, o método que permitiu a obtenção de preparações altamente ativas e cristalizáveis e algumas propriedades das preparações purificadas do VMQ (vírus do mosaico do quenopódio).

2 — MATERIAIS E MÉTODOS

Para a obtenção do material que era submetido aos processos de purificação, folhas de tamanho médio de *Chenopodium murale* assim como de *C. album* eram inoculadas mecânicamente com suco de plantas doentes, diluído em igual volume de solução tampão de fosfato 0,1M e de pH 7. O material que originalmente servia de inóculo provinha de folhas de *C. murale* doentes, mantidas na Seção de Virologia do Instituto Agrônômico.

As plantas sadias que serviram de controle nas nossas experiências eram sempre cultivadas nas mesmas condições das plantas que eram inoculadas com vírus.

A colheita das folhas infetadas era em geral feita 15 a 20 dias após as inoculações. Na mesma ocasião procedia-se, quando necessário, à colheita de folhas sadias para controle. Após a colheita essas folhas eram guardadas na geladeira, mais ou menos a 4°C, geralmente por uma noite, até o início do processo de purificação.

O suco de tais folhas, obtido pelos processos usuais, diluído com igual volume de solução tampão de fosfato 0,1M e pH 7 era centrifugado a 1 500 g durante 20 minutos, numa centrífuga "International", para a sua clarificação.

A seguir, numa ultracentrífuga Spinco, Modelo L, refrigerado, o suco assim clarificado era submetido, por duas vezes, a centrifugações alternadas de rotação baixa (1 700 g, 30 min) e alta (95 000 g, 60 min).

As "pellets" obtidas na última ultracentrifugação eram dissolvidas em tampão de fosfato 0,1M e de pH 7, a solução resultante era agitada enérgicamente com clorofórmio e álcool amílico, segundo o processo descrito por Schneider (8). De ordinário êsse processo era repetido uma segunda vez e o sobrenadante final, contendo o vírus, era ultracentrifugado a 95 000g, durante 60 minutos. A "pellet" então sedimentada era muito clara e de aspecto homogêneo.

O espectro de absorção dessas preparações foi determinado num espectrofotômetro Beckman DU e o método empregado nas microdeterminações de nitrogênio foi o de micro-kjeldahl.

Para o exame ao microscópio eletrônico, suspensões do VMQ em diluições convenientes foram pulverizadas em telas de microscopia eletrônica recobertas previamente com um filme de parlódio. Em seguida foram metalizadas em alto vácuo, com cromo, sob ângulo de 20° para efeito de sombreado. As preparações foram observadas em um microscópio eletrônico RCA tipo EMU. Foram obtidas microfotografias com aumento direto de 5 700 \times e que depois foram aumentadas ópticamente.

Os soros contra o vírus do mosaico do quenopódio (cujo poder antigênico já havia sido demonstrado em trabalho anterior) (9), e contra o do mosaico "southern bean" (*) foram obtidos de coelhos, que receberam, em dias alternados, uma série de cinco injeções intravenosas de 1 ml de uma solução concentrada dos respectivos vírus purificados. A sangria foi feita 10 dias após a última injeção. Com êsses soros foram realizadas provas cruzadas de precipitina.

A estimativa da atividade de uma das preparações purificadas foi feita em meias fôlhas opostas, comparando-se o número de lesões cloróticas produzidas pela preparação e pelo suco original, ambos ajustados à mesma concentração de nitrogênio. A comparação foi feita em diversos níveis de concentração e para cada um dêles foram empregadas 10 fôlhas de *Chenopodium murale*.

O vírus do mosaico do quenopódio foi cristalizado a partir das preparações atrás mencionadas, pelo seguinte processo: 12 ml de uma suspensão purificada contendo aproximadamente 5 mg/ml de vírus foram ultracentrifugados durante 60 minutos a 95 000 g. O sobrena-

(*) A amostra do vírus do mosaico "southern bean" (SBMV), purificada no Departamento de Biofísica da Universidade de Pittsburgh por meio de centrifugações diferenciais, nos foi cedida gentilmente por Pêrsio de Souza Santos, do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo.

dante foi decantado e à "pellet" sedimentada juntaram-se 0,25 ml de uma solução 0,2 saturada de $(\text{NH}_3)_2 \text{SO}_4$. O tubo foi guardado na geladeira à temperatura de cerca de 4° C, numa posição inclinada para que a solução cobrisse totalmente a "pellet". Com o tempo esta se desmancha quase totalmente, formando uma suspensão opaca. Um exame dessa suspensão ao microscópio, feito em geral 12 horas após a adição da solução de sulfato de amônio, revelou a presença de numerosos cristais.

3 — RESULTADOS

Já na primeira ultracentrifugação do suco clarificado das folhas de plantas doentes sedimenta-se uma "pellet" que contém a nucleoproteína ativa. Mas, também do suco das plantas sadias separa-se, nessa mesma operação, um sedimento do mesmo aspecto, porém em menor quantidade e não pegajoso como o proveniente do material colhido de planta afetada. É de se presumir, portanto, que as preparações de vírus do mosaico do quenopódio obtidas por simples ultracentrifugações contêm quantidade apreciável de substâncias normais da planta. Repetir, ainda que por diversas vezes, as centrifugações alternadas de baixa e alta rotação, com a intenção de purificar a preparação, seria provavelmente inútil, pois do material sadio submetido a uma tal operação por quatro vezes, ainda se sedimentou uma "pellet" na última ultracentrifugação.

Se, porém, a suspensão em tampão de fosfato 0,1M e de pH 7 da "pellet" obtida de suco de plantas sadias for agitada com clorofórmio e álcool amílico, e em seguida centrifugada, as substâncias que a compõem são eliminadas da fase aquosa, que na centrifugação se sobrepõe à fase clorofórmio-álcool amílico. Contudo, para que essa eliminação seja completa, é necessário que esse tratamento seja repetido uma segunda vez. Depois desse tratamento, no caso de planta sadia, se o sobrenadante é ultracentrifugado não se sedimenta material algum. Ao contrário, de material de plantas doentes sedimenta-se ainda uma "pellet" bastante grande, presumivelmente constituída pelas partículas de vírus.

Os dados apresentados no quadro 1 dão uma idéia da atividade do produto obtido por esse processo: ultracentrifugações combinadas com o tratamento Schneider.

QUADRO 1. — Comparação entre o número de lesões cloróticas produzidas em *C. murale* pelo vírus puro do VMQ (A) e o suco original (B) em várias diluições, num teste de meias folhas

Diluição	Lesões obtidas com o vírus puro	Lesões obtidas com a suspensão original	Relação
	A	B	A/B
	<i>n.º</i>	<i>n.º</i>	
1:32	336	262	1,3
1:64	102	60	1,7
1:320	116	32	3,6
1:1 600	270	54	5,0
1:16 000	184	22	8,3
1:32 000	111	12	9,2
1:160 000	51	9	5,6

O exame do quadro 1 revela que se trata de uma comparação quantitativa aproximada, entre as atividades das preparações purificadas e do suco original, baseada no número de lesões cloróticas produzidas pelo vírus em meias folhas opostas de *C. murale*. O material purificado foi diluído à mesma concentração do nitrogênio do suco provindo de planta sadia. Essa diluição foi feita com suco de plantas sadias de mesma concentração do suco original que continha o vírus. Embora o valor quantitativo desse processo seja discutível, é evidente que a atividade por unidade de nitrogênio do material purificado é nitidamente superior à do suco original.

Esse material purificado apresentou as reações características das proteínas — Mil-
 lon, xantoprotéica e biureto

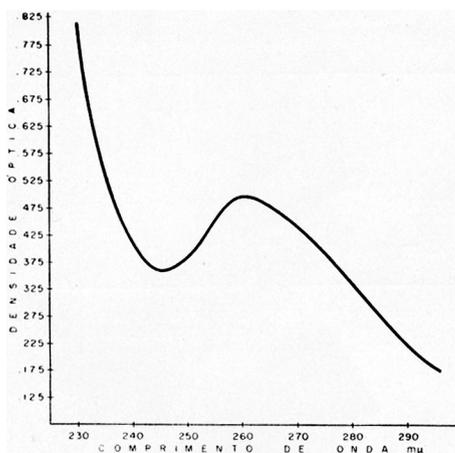


FIGURA 1. — Curva de absorção da luz ultravioleta de diversos comprimentos de onda, de uma suspensão do VMQ purificado.

— e o seu espectro de absorção da luz ultravioleta é o característico das nucleoproteínas (fig. 1).

A suspensão não apresenta anisotropia de fluxo, numa concentração em que o vírus do mosaico do fumo mostra nitidamente esse fenômeno (12), o que nos fêz prever que as suas partículas não deveriam ser sensivelmente assimétricas.

As fotografias feitas ao microscópio eletrônico confirmaram essa previsão, pois as partículas que elas mostram são isométricas, e tem-se a impressão que sejam poliédricas, como é mostrado na estampa 1-B. O seu diâmetro médio é de cêrca de 30 m μ .

A estampa 1-1 mostra os cristais do VMQ, de forma semelhante aos do vírus do mosaico "southern bean" (7), que se obtém quando o material purificado é ultracentrifugado e tratado com um pequeno volume de solução de sulfato de amônio 0,2 saturada.

As reações sorológicas cruzadas, pelo método das precipitinas entre os soros e os vírus do SBMV e VMQ revelaram os resultados reproduzidos no quadro 2.

QUADRO 2. — Resultados de reações sorológicas cruzadas, pelo método das precipitinas, entre soros e vírus do SBMV e VMQ (*)

Anti-Soro Vírus	SBMV diluido a					VMQ diluido a					Soro Normal diluido a		
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/2	1/4	1/16
SBMV	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VMQ	-	-	-	-	-	+++	++	+	-	-	-	-	-
Pl. sd. f.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pl. sd. m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(*) Pl. sd. f. = suco de planta sadia de feijão; Pl. sd. m = suco de planta sadia de *C. murale*; + = reação positiva, em tubo de prova; - = reação negativa, em tubo de prova.

4 — DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Não há, naturalmente, razões para se pressupor que o tratamento com clorofórmio, da "pellet" obtida do suco de plantas doentes, seja perfeitamente seletivo, desnaturando completamente certas substân-

cias e deixando intatas outras. Contudo, é provável que as substâncias normais da planta, contidas nas "pellets" oriundas do suco de plantas doentes, se desnaturem mais rápida e facilmente que as partículas de vírus que as acompanham. Planos para estudar essa questão estão sendo considerados. Contudo, pode-se desde já afirmar que, enquanto a "pellet" do material sadio é completamente desnaturada depois de tratada uma ou duas vezes pelo método de Schneider, parte substancial daquela correspondente ao material doente continua a sedimentar-se mesmo depois de quatro tratamentos. É muito provável, porém, que parte das partículas do vírus seja também desnaturada por esse tratamento. Por tal motivo não dispomos ainda de dados que permitam avaliar com a desejada segurança a concentração que o vírus alcança nas plantas infetadas.

Conquanto deva ser reconhecida a necessidade de outras evidências, a homogeneidade quanto ao aspecto e dimensões de praticamente todo o material que se observa no campo de microscópio eletrônico nos faz supor que essas preparações do vírus do mosaico do quenopódio sejam de um razoável grau de pureza (6).

Conforme estampa 1-B as partículas do vírus do mosaico do quenopódio são arredondadas e têm um diâmetro médio de 30 μ .

Um exame mais atento das partículas e das suas sombras revela que elas são poliédricas. Essa forma poliédrica das partículas de vírus de plantas consideradas "esféricas" já foi observada em diversos outros vírus tais como "wound tumor" (1), "Tomato bushy stunt" (2).

Essa forma tem sido atribuída também a uma alteração que as partículas sofrem durante o processo de metalização e alto vácuo para efeito de sombreamento (13).

Os dados do quadro 1 mostram claramente que as nossas preparações de vírus do mosaico do quenopódio são altamente ativas. O vírus purificado foi diluído à mesma concentração de N da parte do suco original, separado no início do processo de purificação. Essa diluição foi feita com suco de plantas sadias para que, na medida do possível, as condições fôssem semelhantes para as duas suspensões. Diluições iguais dessas duas soluções foram feitas e inoculadas em meias folhas opostas de *C. murale*. Depois de inocular, sem resultados, 110 variedades de *Phaseolus vulgaris* L., da coleção do Instituto Agrônomo, à procura de uma planta que produzisse lesões locais bem distintas quando inoculada com o vírus do mosaico do quenopódio, tivemos que

nos satisfazer com as lesões cloróticas que foram produzidas nas folhas inoculadas do próprio *C. murale*. Essas lesões não são bem definidas e contá-las com exatidão, especialmente quando seu número é grande, é muito difícil. Por essa razão e também porque o número de 10 folhas, empregado para cada diluição, fôsse muito pequeno, os resultados que obtivemos, embora indiquem claramente a alta atividade da preparação purificada quando comparada com o suco original, têm apenas um valor relativo. Note-se, por exemplo, que por diversas vezes o número de lesões produzidas por uma certa diluição é maior que o número produzido pela diluição menor, anterior. Não obstante, a relação entre o número de lesões produzidas pelo vírus purificado e pelo suco original é sempre maior que 1 (um). Essa relação é máxima nas diluições intermediárias, de acordo com o que se poderia esperar considerando-se o que se admite, de uma maneira geral, sobre a relação existente entre a concentração de uma solução de vírus e o número de lesões que ela produz (3).

Diante da alta atividade das preparações e da uniformidade das partículas que aparecem no campo do microscópio eletrônico, parece razoável supor que estas sejam as partículas do próprio vírus. Naturalmente cabem aqui tôdas as objeções que foram levantadas contra idéia semelhante, no caso de outros vírus, especialmente do vírus do mosaico do fumo, e que têm sido removidas, parcial ou totalmente, pelas evidências acumuladas com o transcorrer do tempo (4).

No presente caso a possibilidade de que a atividade da preparação seja devida a partículas muito pequenas para serem vistas ao microscópio eletrônico, talvez possa ser desprezada, pois muito provavelmente elas teriam sido eliminadas com os sobrenadantes das diversas ultracentrifugações a que o material foi submetido. Resta, ainda, a possibilidade de que nem tôdas as partículas visíveis sejam de vírus. Parte delas poderia ser material normal da planta constituído por coincidência de partículas do mesmo tamanho das partículas do vírus, ou então material inativo, cuja formação tenha sido provocada pela presença do vírus (5,11).

Contudo, pelos resultados que obtivemos trabalhando com plantas sadias, é pouco provável que ainda exista quantidade apreciável de material normal nessas preparações. Além disso, algumas observações ao microscópio eletrônico do material de planta sadia não revelaram a presença de partículas do tamanho das do material purificado.

Continua, porém, de pé a possibilidade de que parte do material seja naturalmente inativo ou talvez tenha sido inativado pelos tratamentos que sofreu durante o processo de purificação.

A semelhança da forma dos cristais do VMQ com a dos cristais do SBMV e o fato de possuírem pontos de inativação térmica elevados, além da alta concentração nos seus hospedeiros (*) levaram-nos a realizar estudos sorológicos com os mesmos, não obstante existirem evidências de diferenças entre eles com relação aos hospedeiros.

Para isso foram preparados soros contra ambos os vírus em coelhos e foram realizadas provas cruzadas de precipitina. Os resultados estão resumidos no quadro 2, e dêles se depreende que ambos são sorologicamente diferentes.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF CHENOPODIUM MOSAIC VIRUS

SUMMARY

The Chenopodium mosaic virus was purified by means of alternated low and high speed centrifugations combined with chloroform N-amyl alcohol treatment.

Such preparations have a high activity, give positive tests for protein and its ultra-violet absorption spectrum is that of a nucleoprotein solution. They do not show the phenomenon of anisotropy of flow.

When examined in the electron microscope they showed to be constituted of "spherical" particles of uniform size having an approximate diameter of 30 m μ .

If a pellet of the purified virus is resuspended in a small volume of 0,2 saturated (NH₄)₂ SO₄ solution and kept at 4°C for several hours, masses of roughly rhombic crystals are formed.

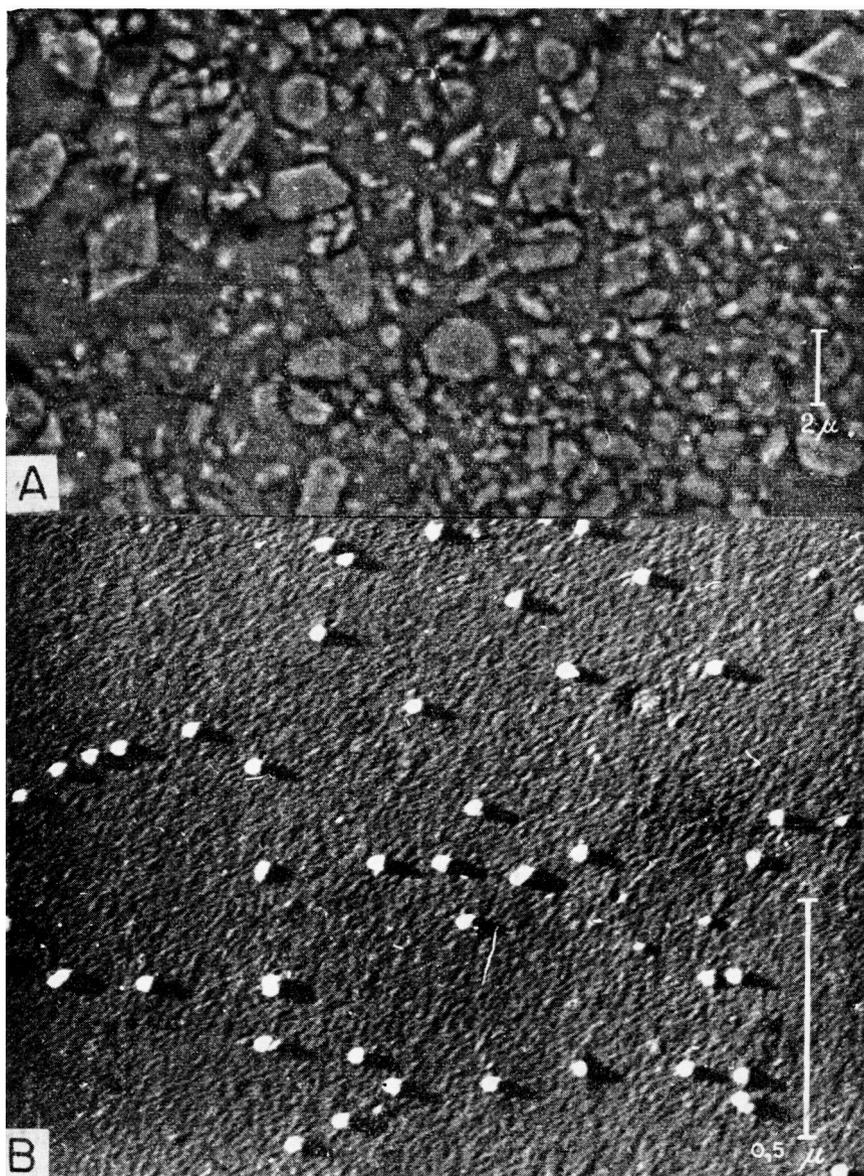
As far as the size of particles and the form of crystals are concerned, the *Chenopodium mosaic* virus resembles the southern bean mosaic virus. They differ, however, in their host range and are not related serologically.

LITERATURA CITADA

1. BRAKKE, MYRON K., VATTER, A. E. & BLACK, L. M. Size and shape wound-tumor virus. Brookhaven Symposia in Biology 6:137-156. 1954.
2. KAESBERG, PAUL. Structure of small "spherical" viruses. Science (n.s.) 124:626-628. 1956.
3. KLECZKOWSKI, A. Interpreting relationships between the concentrations of plant viruses and number of local lesions. J. gen. Microbiol. 4:53-69. 1950.

(*) COSTA, A. S. & BENNETT, C. W. Estudos sobre algumas propriedades do VMQ. Campinas, Instituto agrônomo, 1956. [Comunicação verbal]

4. LAUFFER, MAX A. The sedimentation rate of the infectious principle of tobacco mosaic virus. *J. biol. Chem.* 151:635-642. 1943.
5. MARKHAM, ROY & SMITH, KENNETH M. Studies on the virus of turnip yellow mosaic. *Parasitology* 39:330-342. 1949.
6. PIRIE, N. W. The criteria of purity used in the study of large molecules of biological origin. *Biol. Rev.* 15:377-404. 1940.
7. PRICE, W. C. Purification and crystallization of southern bean mosaic virus. *Amer. J. Bot.* 33:45-54. 1946.
8. SCHNEIDER, I. R. Solution of tobacco mosaic virus in the aqueous phase of a chloroform-water emulsion and application of the phenomenon in virus assay. *Science (n.s.)* 117:30-31. 1953.
9. SILVA, DARCY M. Estudos serológicos com dois vírus de planta. *Rev. Agric., Piracicaba* 32:189-194. 1957.
10. ——— & MENEGHINI, M. Purificação do vírus do mosaico do quenopódio. Comunicação à VII Reunião Anual da SBPC. *Ciê. e Cult.* 8:161. 1956.
11. TAKAHASHI, WILLIAM N. & MAMORU, ISHII. The formation of rodshaped particles resembling tobacco mosaic virus by polymerization of a protein from mosaic-diseased leaves. *Phytopath.* 42:690-691. 1952.
12. ——— & RAWLINS, T. E. Rod-shaped particles in tobacco mosaic virus demonstrated by stream double refraction. *Science (n.s.)* 77:26-27. 1933.
13. WILLIAMS, ROBLEY C. The shapes and sizes of purified viruses as determined by electron microscopy. *Cold Spring Harbor Symposia* 18:185-195. 1953.



Vírus do mosaico do quenopódio (*Chenopodium murale* L.). *A* — Cristais do VMQ obtidos por precipitação com sulfato de amônio 0,2 saturado; *B* — fotomicrografia eletrônica, mostrando as partículas "esféricas" do VMQ (preparação sombreada com cromo).