

BRAGANTIA

Boletim Científico do Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo

Vol. 24

Campinas, março de 1965

N.º 19

OCORRÊNCIA DE VÍRUS ESFÉRICO CAUSANDO FAIXA AMARELA DAS NERVURAS DA COUVE EM SÃO PAULO (1)

E. W. KITAJIMA, A. R. OLIVEIRA e A. S. COSTA, *engenheiros-agrônomos, Seção de Virologia, Instituto Agrônomo*

RESUMO

Partículas esféricas de 50-60 $m\mu$ de diâmetro foram encontradas em preparações semipurificadas e em preparações rápidas de plantas de couve infetadas com um vírus que induz faixa amarela das nervuras (VFANC). Essas partículas têm um capsídeo aparentemente icosaédrico, constituído de 92 capsômeros de 50-60 Å de diâmetro. Quando tratadas com acetato de uranila, revelaram a existência de uma zona central, que se impregna fortemente com este corante, possivelmente constituída de nucleoproteína. Tais partículas não foram encontradas em plantas sadias, mas foram nelas detectadas, após serem inoculadas por união de tecidos, por meios mecânicos ou por afídeos com VFANC.

Partículas similares foram encontradas em secções ultra-finas de tecido foliar de couve infetado com o VFANC, porém apresentavam um diâmetro ligeiramente menor, da ordem de 35-45 $m\mu$. Invariavelmente, essas partículas foram encontradas em meio às inclusões citoplasmáticas de forma e dimensões variadas, constituídas de uma massa amorfa, granular e densa.

Tais inclusões puderam também ser observadas em secções mais espessas e montadas para microscopia óptica.

Possivelmente o VFANC pertence ao grupo do vírus do mosaico da couve-flôr, dada a semelhança na morfologia das partículas e nas moléstias induzidas.

1 — INTRODUÇÃO

No decurso de exames, ao microscópio eletrônico, de preparações semipurificadas de um vírus latente em couve (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) (6), feitas para fins de serologia, observaram-se, além das partículas alongadas daquele vírus, outras, de forma esférica, com cerca de 50-60 $m\mu$ de diâmetro.

Testes de transmissão (7) mostraram que as partículas esféricas

(1) Recebido para publicação em 25 de março de 1965.

acima mencionadas podiam ser transmitidas mecânicamente, por união de tecidos, e por duas espécies de afideos (*Brevicoryne brassicae* L. e *Myzus persicae* Sulz.) para mudas novas de couve. Plantas desta espécie, invadidas pelas partículas esferoidais unicamente, mostram faixa amarela das nervuras e necrose em suas fôlhas. Os ensaios de transmissão, corroborados com os exames feitos ao microscópio electrónico, indicam que essas partículas esferoidais representam um vírus possivelmente ainda não descrito. A morfologia e localização desse vírus nos tecidos da planta hospedeira são relatadas no presente trabalho.

2 — MATERIAL E MÉTODOS

Para microscopia electrónica do vírus da faixa amarela das nervuras da couve (VFANC) foram utilizadas plantas de couve da var. Ribeirão Pires, I-2620, nas quais inicialmente o VFANC foi encontrado, e da var. Gongarsol, para as quais foi transmitido (7).

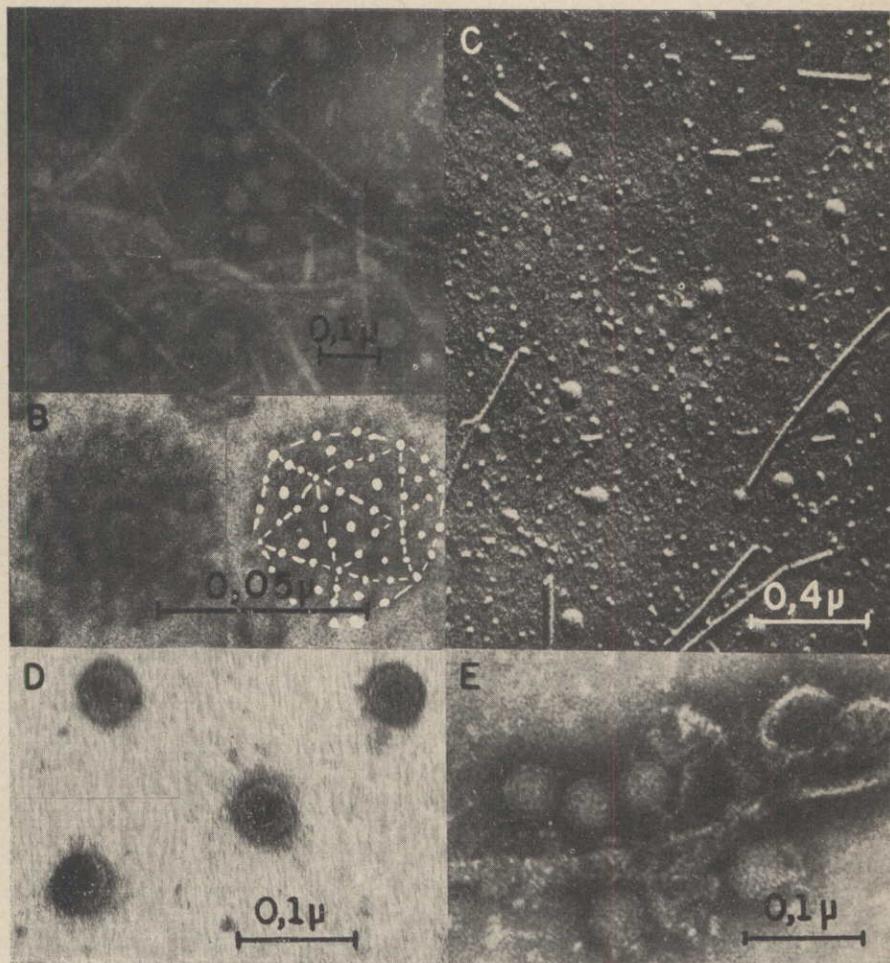
Exames electrono-microscópicos de material semipurificado foram feitos: (a) Pela técnica de contrastação negativa, utilizando-se ácido fostotungstico a 2%, neutralizado com KOH, 1N (3), tendo sido adicionada albumina de sôro na proporção de 0,05%, como espalhante; (b) pela técnica de coloração positiva com acetato de uranila a 2% (12); (c) em preparações metalizadas com paládio.

Preparações rápidas para contrôlo dos testes de transmissão, ao microscópio electrónico, foram feitas por uma modificação (14) da técnica de «dipping» (2), combinando-a com a de contrastação negativa.

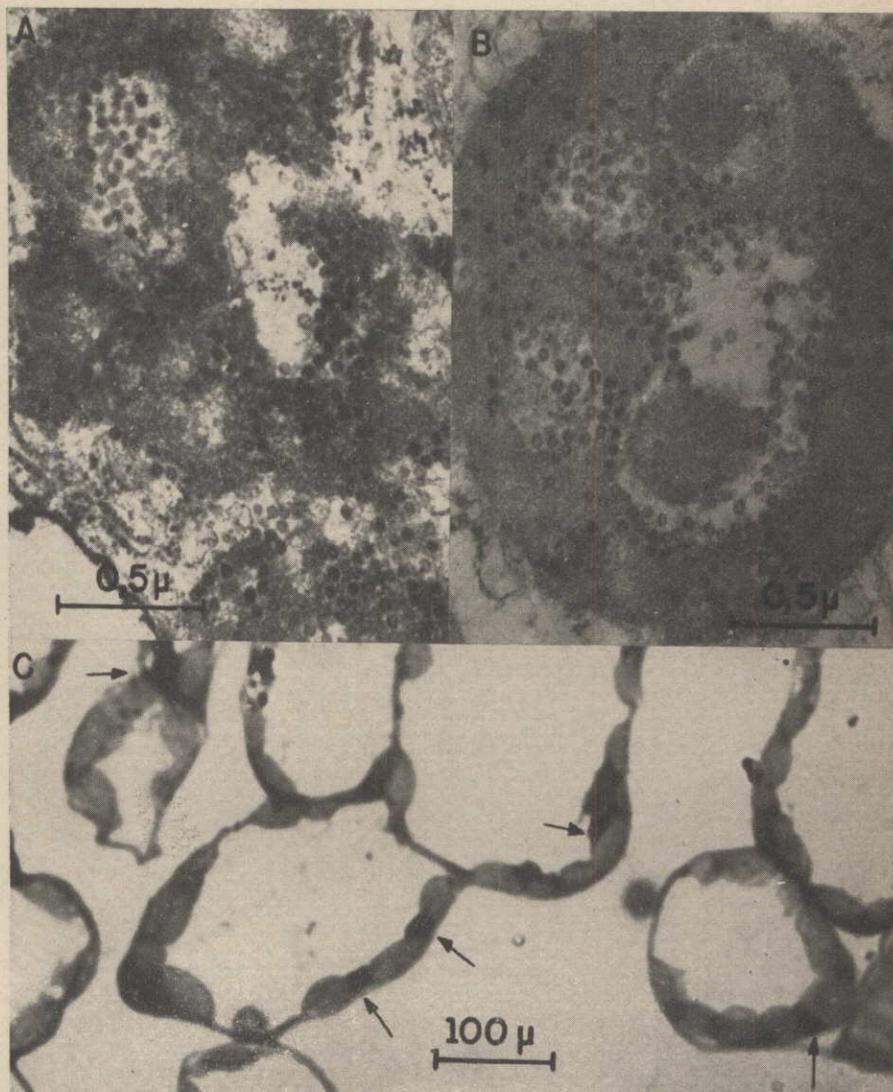
Para exame de tecidos infetados, ao microscópio electrónico, pedaços de fôlha de 1 mm x 3 mm foram fixados em ácido ósmico a 2% em tampão fosfato 0,2 M (17), desidratados em série de concentração crescente de acetona e incluídos em Epon 812 (16). As secções (500-800 Å) foram feitas num ultramicrotomo Porter-Blum, utilizando-se navalhas de vidro, e, antes de serem examinadas ao microscópio electrónico, foram coradas com acetato de uranila (25) e citrato de chumbo (20). Algumas secções mais espessas (2 a 5 μ) foram montadas para microscopia óptica e examinadas após serem coradas com uma mistura de Azur II e azul de metileno (23).

Todos os exames ao microscópio electrónico foram feitos num aparelho Siemens, modelo Elmiskop I (2).

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



Morfologia das partículas do VFANC. Fotomicrografias electrónicas de preparações semipurificadas (A-D) e de "dipping" (E). A — Preparação contrastada negativamente com ácido fosfotungstico; B — Detalhe de uma partícula, mostrando a disposição dos capsômeros (imagem revertida); C — Preparação metalizada com paládio; D — Preparação contrastada positivamente com acetato de uranila; E — Preparação feita por uma combinação do método de "dipping" e contrastação negativa. As partículas alongadas que aparecem nas micrografias A e C representam o vírus latente em couve (6).



Partículas do VFANC *in situ*. A e B — Fotomicrografias eletrônicas de secções ultrafinas de tecido foliar infetado. Dois aspectos das inclusões citoplasmáticas, contendo partículas do VFANC. C — Fotomicrografia ao microscópio óptico, de secção de tecido foliar. As inclusões estão indicadas pelas flechas.

3 — RESULTADOS

Em preparações semipurificadas, as partículas associadas à faixa amarela das nervuras da couve foram facilmente identificadas pelo seu contorno circular, com diâmetro de 50-60 $\mu\mu$, em preparações contrastadas negativamente (estampa 1-A e B), e cerca de 70 $\mu\mu$, em preparações metalizadas (estampa 1-C). As partículas, quando metalizadas, apesar de terem contorno circular, projetaram sombras angulosas e de extremidade pontiaguda ou truncada, indicando serem, elas poliédricas (estampa 1-C). Quando contrastadas negativamente, as partículas mostraram possuir capsídeo (5) poliédrico, constituído de numerosos capsômeros, de 50 a 60 Å de diâmetro (estampa 1-B). Por outro lado, nestas mesmas preparações, a presença de capsídeos ocos, isto é, partículas sem a zona central revelada pela penetração do corante nesta zona, como ocorre com muitos vírus de forma esférica (11, 18, 24, 26), não foi constatada. O tratamento das partículas com acetato de urânio revelou a existência de uma zona central, de cerca de 25 $\mu\mu$ de diâmetro, que se impregna fortemente com êsse corante, a julgar pelo seu adensamento (estampa 1-D).

Em preparações rápidas, feitas por uma combinação do método de «dipping» e contrastação negativa, com a finalidade de se identificar rapidamente plantas que contivessem as partículas associadas à faixa amarela das nervuras da couve, estas foram facilmente identificadas pelo seu diâmetro e ocorrência de subunidades, em meio aos detritos celulares (estampa 1-E). Partículas similares não foram constatadas em preparações contrôles feitas de plantas não inoculadas.

Secções ultra-finas de tecidos foliares infetados com o VFANC mostraram que em praticamente todos os tipos de células, exceto nos dos vasos condutores, ocorriam inclusões densas no citoplasma (estampa 2-A e B). Tais inclusões eram de forma irregular (estampa 2-A) ou de contorno elíptico (estampa 2-B), sem apresentarem uma membrana limitante. Suas dimensões variavam de cerca de 0,5 μ de diâmetro até 8 a 10 μ de comprimento, quando alongadas. As inclusões constituíam-se de um substrato granular extremamente fino e amorfo, mas denso ao feixe eletrônico, e em meio a essa massa ocorriam lacunas, onde o substrato tornava-se mais ralo e mesmo inexistente. Partículas de 35-45 $\mu\mu$ de diâmetro ocorriam em maior quantidade nessas lacunas, embora muitas partículas pudessem ser observadas em:

bebidas no substrato. Tais partículas não mostravam detalhes ultra-estruturais, exceto que muitas delas apresentavam uma zona central mais transparente, de 20-30 $m\mu$ de diâmetro, dando a impressão de serem ôcas. A densidade das partículas era ligeiramente maior que a do substrato que forma a inclusão, permitindo sua identificação mesmo em meio ao substrato. Não se constatou nenhuma relação visível entre a inclusão e organelas celulares.

As inclusões observadas em cortes ultra-finos puderam ser facilmente notadas em secções mais espessas, de 2 a 5 μ de espessura, montadas para microscopia óptica. Em tais secções, as inclusões apareciam coradas de púrpura bem carregada, como os nucléolos, porém diferenciavam-se destas pela sua posição extranuclear (estampa 3-A).

4 — DISCUSSÃO

As partículas esferoidais de 50-60 $m\mu$ de diâmetro devem representar o vírus da faixa amarela das nervuras da couve, e os seguintes argumentos justificam tal ponto de vista: (a) Transmissibilidade de tais partículas, de plantas infetadas para sadias, por meios mecânicos ou de afídios com conseqüente manifestação de sintomas, conforme constatadas pelos exames electrono-microscópicos; (b) Similaridade entre a morfologia destas partículas e a daquelas de alguns vírus como os do «wound tumor» do trêvo (*Melilotus sp.*) (1), nanismo do arroz (*Oryza sativa* L.) (8) e REO («respiratory and enteric orphan») (24), êste último, um vírus de mamífero; (c) Presença de partículas similares às encontradas *in vitro*, nos tecidos de plantas infetadas, e a correspondente ausência das mesmas plantas sadias.

As partículas do VFANC têm forma aparentemente icosaédrica, com capsídeo formado de 92 capsômeros. A análise das micrografias electrônicas de preparações contrastadas negativamente (4) e, também, da sombra projetada pelas partículas em preparações metalizadas (13), corroboram tal asserção. O adensamento de uma zona central de cêrca de 25 $m\mu$ de diâmetro, produzido pelo tratamento com acetato de urânio, deve resultar da presença de material nucléico ou nucleoprotéico (12). Tôdas estas características morfológicas do VFANC são bastante similares às do vírus do «wound tumor» do trêvo, nanismo do arroz e REO vírus, exceto no que toca ao diâmetro. Com efeito, os valores descritos para o diâmetro dêstes vírus oscila entre 60 e 70 $m\mu$, enquanto

o VFANC parece ter um diâmetro entre 50 e 60 $m\mu$, porém uma diferença real somente poderá ser determinada em condições comparativas.

Quanto à composição química do vírus, pouco se pode dizer, exceto que deve possuir material nucleoprotéico, dada a afinidade da parte central das partículas ao acetato de uranila (12). Vírus que se assemelham morfológicamente ao do VFANC, como «wound tumor», e REO possuem material genético do tipo ribonucléico, e em cadeia dupla (9, 10, 15).

Tecidos de plantas infetadas com o VFANC mostram células com inclusões citoplasmáticas, nas quais se acham embebidas partículas de 35-45 $m\mu$ de diâmetro. Tais partículas são consideradas como sendo as do VFANC *in situ*, pois somente ocorrem em tecido de plantas afetadas e não nas sadias. A ligeira discrepância no diâmetro das partículas observadas em secções (35-45 $m\mu$) e em suspensões (50-60 $m\mu$) pode ser atribuída à possível contração das partículas que ocorre durante a fixação ou um achatamento das partículas nas preparações *in vitro*. Aliás, tal diferença entre dimensões das partículas *in situ* e em suspensões já foi constatada para os vírus que se assemelham ao VFANC (8, 21, 22).

A natureza da massa amorfa, constituída de granulação fina, que forma o substrato das inclusões, não é conhecida, porém com bastante possibilidade deve estar relacionada com a síntese das partículas. As lacunas existentes em meio à inclusão, em geral preenchidas por um número apreciável de partículas, parecem indicar que o substrato foi convertido em partículas. Fenômeno similar foi descrito nas inclusões de REO vírus em células do rim de macaco (MK cells), quando a densidade do substrato das inclusões diminuía à medida que aumentava o número de partículas em seu interior (21). Porém, o aspecto geral da inclusão do REO vírus e do VFANC é bastante diferente. Além disso, não foram observados arranjos cristalinos das partículas nas inclusões do VFANC, como ocorre com as partículas dos vírus REO (21), nanismo do arroz (8) e «wound tumor» do trevo (22).

As partículas que mostram sua zona central menos densa talvez representem unidades desprovidas de material nucléico, podendo ser subprodutos ou fases intermediárias de síntese, ou ainda, resultantes de artefato de técnica. Tais partículas ôcas, no entanto, aparecem frequentemente em secções de outros vírus como REO (21). O fato de partículas «ôcas» não terem sido encontradas no exame electrono-mi-

croscópico das preparações *in vitro* poderia ser explicado baseado na instabilidade destas partículas, ou alternativamente, pela impermeabilidade do capsídeo, que impediria a penetração do corante no interior das partículas.

Alguns efeitos citopatogênicos foram observados em tecidos de plantas para as quais o VFANC foi transmitido. Informações mais detalhadas sôbre tais alterações, e também sôbre as inclusões, serão objeto de um futuro trabalho.

A detectabilidade das inclusões, ao microscópio óptico, abre perspectivas para identificação do VFANC através das inclusões que induz em tecidos afetados, mesmo sem contar com o microscópio eletrônico.

Finalmente, a semelhança nas moléstias induzidas e na morfologia das partículas (19) sugere que o VFANC e o vírus do mosaico da couve-flor sejam relacionados.

OCCURRENCE OF YELLOW VEIN BANDING OF COLE INDUCED BY A SPHERICAL VIRUS

SUMMARY

Spherical particles, 50-60 $m\mu$ in diameter were found in partially purified preparations, and also in quick preparations made from plants infected with a virus inducing yellow vein banding in cole (*Brassica oleracea* var. *acephala*). These particles apparently had an icosahedral capsid composed by 92 capsomeres, each with 50-60 A in diameter. Uranyl acetate treatment of these particles revealed a central zone, about 25-30 $m\mu$ in diameter, which bound strongly with the stain, indicating that this part of the particle is nucleoprotein. Such particles were absent in healthy plants, but they were detected after these plants were inoculated by tissue union, mechanically, or by aphids with the cole yellow vein banding virus.

Similar particles were found in ultrathin leaf sections from cole infected by yellow vein banding virus, invariably embedded in a cytoplasmic inclusion body, but their diameters were slightly smaller (35-45 $m\mu$). These inclusions, with variable dimensions and shape, were composed by an amorphous, dense and granular matrix, and were detectable even under light microscope level in thicker sections.

It is likely that the above described virus is related to the cauliflower mosaic virus, due to the similarities in particle morphology and induced diseases.

LITERATURA CITADA

1. BILS, R. F. & HALL, C. F. Electron microscopy of wound tumor virus. *Virology* 17: 123-130. 1962.

2. BRANDES, J. Eine elektronenmikroskopische Schnellmethode zum Nachweis faden- und stäbchenförmiger Viren, insbesondere in Kartoffel-Dunkelkeimen. *Nachrichtl. dtsh. Pflschdienst.*, Braunschweig, 9: 151-152. 1957.
3. BRENNER, S. & HORNE, R. W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta* 34: 103-110. 1959.
4. CASPAR, D. L. D. & KLUG, A. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27:1-24. 1962.
5. ———, DULBECCO, R., KLUG, A., LWOFF, A., STOKER, M. G. P., TOURNIER, P. & WILDY, P. Proposals. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27: 49-50. 1962.
6. COSTA, A. S., KITAJIMA, E. W. & OLIVEIRA, A. R. Um vírus latente em couve no Estado de São Paulo. (Em preparo).
7. ———, ———, ———. Vírus da faixa amarela das nervuras da couve. (Em preparo).
8. FUKUSHI, T., SHIKATA, E. & KIMURA, I. Some morphological characters of rice dwarf virus. *Virology* 18: 192-205. 1962.
9. GOMATOS, P. J. & TAMM, I. The secondary structure of Reovirus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 49: 707-714. 1963.
10. ———, ———. Animal and plant viruses with double-helical RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 50:878-885. 1963.
11. HARRISON, B. D. & NIXON, H. L. Purification and electron microscopy of three soil-borne plant viruses. *Virology* 12: 104-117. 1960.
12. HUXLEY, H. W. & ZUBAY, G. Preferential staining of nucleic acid-containing structures for electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11:273-296. 1961.
13. KAESBERG, P. Structure of small spherical viruses. *Science* 124:626-628. 1956.
14. KITAJIMA, E. W. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. *J. Electronmicroscopy (Japan)* 14: 119-121. 1965.
15. LANDRIDGE, R. & GOMATOS, P. J. The structure of RNA. *Science* 141: 694-698. 1963.
16. LUFT, J. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9: 409-414. 1961.
17. MILLONIG, G. Studio sui fattori che determinano la preservazione della ultrastruttura. In «From molecule to cell»: Symposium on Electron Microscopy. p.347-362. (P. Buffa Ed.), Roma. 1964.
18. NIXON, H. L. & GIBBS, A. J. Electron microscope observations on the structure of turnip yellow mosaic virus. *J. Mol. Biol.* 2:197-200. 1960.
19. PIRONE, T. P., POUND, G. S. & SHEPHERD, R. J. Purification and properties of cauliflower mosaic virus. *Nature* 186: 656-657. 1960.
20. 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.
21. RHIM, J. S., JORDAN, L.E. & MAYOR, H. D. Cytochemical, fluorescent antibody and electron microscopic studies on the growth of Reovirus (ECHO 10) in tissue culture. *Virology* 17: 342-355. 1962.
22. SHIKATA, E., ORENSKI, S. W., HIRUMI, H., MITSUHASHI, J. & MARAMOROSCH, K. Electron micrographs of wound tumor virus in an animal host and in a plant tumor. *Virology* 23: 441-444. 1964.
23. SILVEIRA, MARINA. Comunicação pessoal.
24. VASQUEZ, G. & TOURNIER, P. The morphology of Reovirus. *Virology* 17:503-510. 1962.
25. WATSON, M. L. Staining tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol* 4: 475. 1958.
26. WILDY, P., STOKER, M. G. P., McPHERSON, J. A. & HORNE, R. W. The fine structure of polyoma virus. *Virology* 11: 444-457. 1960.