

BRAGANTIA

Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Estado de São Paulo

Vol. 20

Campinas, maio de 1961

N.º 13

MORFOLOGIA DO VÍRUS DO MOSAICO DO PICÃO (1)

ELLIOT W. KITAJIMA, ANA MARIA B. CARVALHO e A. S. COSTA, engenheiros-agrônomo, Seção de Virologia, Instituto Agrônômico

RESUMO

Preparações feitas com exsudato de plantas de fumo, girassol, picão, erva-de-Santa-Maria, cordão-de-frade, fedegoso, *Chenopodium amaranticolor* e *Physalis floridana*, sadias e infectadas pelo vírus do mosaico do picão, foram examinadas ao microscópio eletrônico. Partículas com comprimento normal aproximado de 720 m μ x 12-13 m μ foram encontradas nos exsudatos das oito espécies, quando afetadas, mas não nos das plantas sadias, testemunhas. Tais partículas são consideradas como sendo o vírus causador do mosaico do picão.

1 — INTRODUÇÃO

A morfologia das partículas elementares de um vírus serve, juntamente com as suas demais propriedades físicas, químicas e biológicas, para completar a sua identificação, sendo de grande valor para a diagnose das moléstias por êle causadas.

Utilizando método rápido e simples (4, 8), pode-se determinar a morfologia das partículas de vírus associadas a uma moléstia, desde que essas partículas sejam alongadas (bastonetes ou filamentos). No caso dos vírus que têm essa conformação, não é necessário recorrer aos processos usuais de purificação que, além de consumirem tempo, podem alterar a forma das partículas.

Estudos sôbre as moléstias de vírus das ervas daninhas e sôbre o papel destas como fontes de vírus para as plantas cultivadas no Estado de São Paulo vêm sendo feitos há anos, na Seção de Virologia. Uma delas, o mosaico do picão (*Bidens pilosa* L.), acha-se bastante difundida no Estado e afeta diversas plantas econômicas. Nesta publicação são apresentados os resultados de observações efetuadas sôbre a

(1) Recebido para publicação em 30 de janeiro de 1961.

forma e dimensão das partículas desses vírus. Uma descrição pormenorizada da moléstia será feita em outro trabalho (6).

2 -- MATERIAL E MÉTODOS

As preparações para exame ao microscópio electrónico foram feitas pelo método do exsudato, descrito por Johnson (8). Os exsudatos foram obtidos de folhas retiradas de plantas afetadas, cerca de 10 a 15 dias após a inoculação. Foram utilizadas as seguintes plantas hospedeiras: fumo Turkish (*Nicotiana tabacum* L.), girassol (*Helianthus annuus* L.), erva-de-Santa Maria (*Chenopodium ambrosioides* L.), *Physalis floridana* Rydb., *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn., fedegoso (*Cassia occidentalis* L.), cordão-de-frade (*Leonotis nepaetifolia* L.) e picão.

O líquido exsudado das nervuras na superfície de corte das folhas infectadas e submetidas à pressão hidráulica foi transferido para as grades de cobre (200 malhas/polegada) que tinham sido anteriormente cobertas com membrana de «Parlodion» a 1,5%. Em alguns casos submeteu-se o exsudato a uma diálise prévia em membrana de colódio, da seguinte maneira: gotículas de exsudato foram colocadas sobre uma película de colódio flutuando sobre água destilada; após 24 horas transferiu-se o exsudato para as grades, por meio de micropipeta. Em outros casos o exsudato foi centrifugado em capilares (3 000 rpm/15'), numa tentativa para eliminar impurezas que interferem nas observações e, ainda, concentrar as partículas nele contidas.

As preparações, depois de terem sido metalizadas com cromo ou paládio, foram examinadas ao microscópio electrónico (Siemens UM 100b) (2). Os negativos foram tirados com aumento aproximado de 7 000 x, e posteriormente projetados a 50 000 x, em papel sobre o qual se traçaram as partículas. As partículas desenhadas no papel foram medidas com régua, ou, quando elas eram sinuosas, com aparelho marcador, de roda dentada, que assinalou sobre o desenho certo número de pontos. Contando-se êstes e conhecendo-se a distância entre dentes consecutivos, pôde-se determinar o comprimento aproximado das partículas. Os valores referentes às partículas medidas foram distribuídos em classes com intervalo de 20 m μ . Como preparação-padrão para calibragem das mensurações examinaram-se exsudatos de plantas

(2) Ao Dr. A. Vallejo-Freire, chefe da Seção de Vírus e Virusterapia do Instituto Butantã, São Paulo, os autores agradecem pelas facilidades proporcionadas no uso do microscópio electrónico da Seção; ao Dr. A. Brunner Jr., assistente da mesma Seção, pelas valiosas sugestões sobre a técnica de electronmicroscopia.

de fumo Turkish infectadas sistêmicamente com o vírus do mosaico comum.

3 — RESULTADOS

O exame ao microscópio electrônico dos exsudatos de plantas afetadas de fumo, girassol, *Chenopodium amaranticolor*, cordão-de-frade, erva-de-Santa Maria, fedegoso, *Physalis floridana* e picão revelou a presença de partículas alongadas e flexíveis (figura 1) em maior ou me-

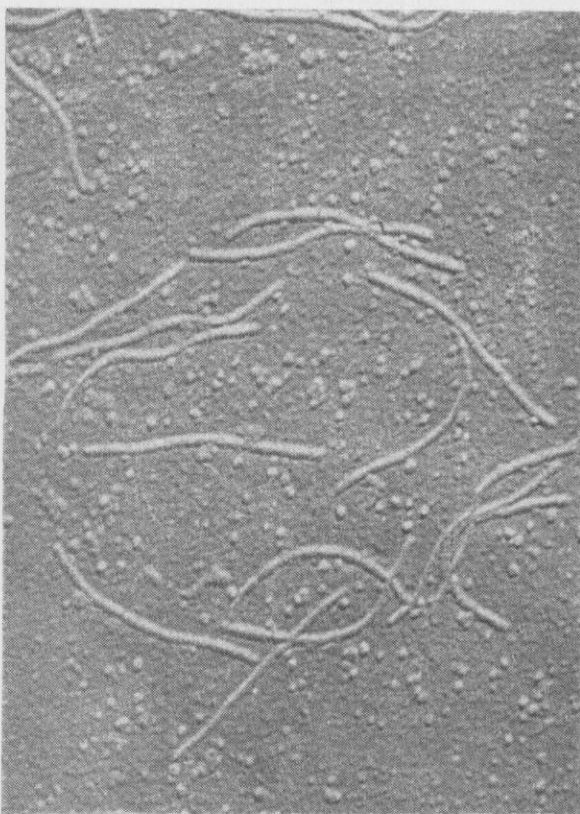


FIGURA 1. — Foto micrografia electrónica do vírus do mosaico do picão, em exsudato de *Chenopodium amaranticolor*. (43 200 x).

nor concentração, que não foram encontradas nos exsudatos das plantas sadias comparáveis. Devido ao pequeno número de partículas encontradas nos exsudatos do fedegoso e de *P. floridana*, e à dificuldade

de exsudação no caso do picão, não foram feitos histogramas para estas três últimas hospedeiras. Os resultados referentes aos comprimentos das partículas encontradas nas outras cinco espécies acham-se representados na figura 2. Nos polígonos de distribuição dos comprimentos, 70-80% das partículas medidas acham-se entre 600 e 800 $m\mu$; fora deste trecho distribuem-se mais ou menos uniformemente, com ligeira tendência para formarem picos secundários nos valores próximos à metade ou ao dôbro do comprimento normal (CN) (3, 13). As determinações do CN deram para o vírus do mosaico do picão (VMP) um valor de cerca de 720 $m\mu$ (quadro 1). As flutuações que se verificaram nos CN das partículas de diferentes origens não são significativas, considerando-se os erros inevitáveis nas medidas e as variações inerentes às partículas.

QUADRO 1. — Resultados das medições de partículas do vírus do mosaico do picão de cinco diferentes hospedeiras

Hospedeira	Número de partículas medidas			Comprimento normal $m\mu$
	No pico principal (1)	Porcentagem do total	Total	
<i>Nicotiana tabacum</i>	579	87,0	665	723,07
<i>Chenopodium amaranticolor</i> .	715	74,5	961	713,37
<i>Helianthus annuus</i>	275	81,0	340	713,16
<i>Chenopodium ambrosioides</i> .	120	79,5	151	710,50
<i>Leonotis nepactifolia</i>	150	74,5	203	724,67
Total	1 839	79,0	2 320	717,13

(1) Entre 640 e 800 $m\mu$ do histograma de distribuição dos comprimentos das partículas.

A diálise e a centrifugação parecem não ter alterado a conformação das partículas (quadro 2, figura 3). No caso de exsudatos de *Chenopodium amaranticolor*, a diálise deu resultados satisfatórios, fornecendo uma suspensão mais limpa que a de exsudatos sem êsse tratamento e também, por razão ainda não compreendida, com maior concentração de partículas.

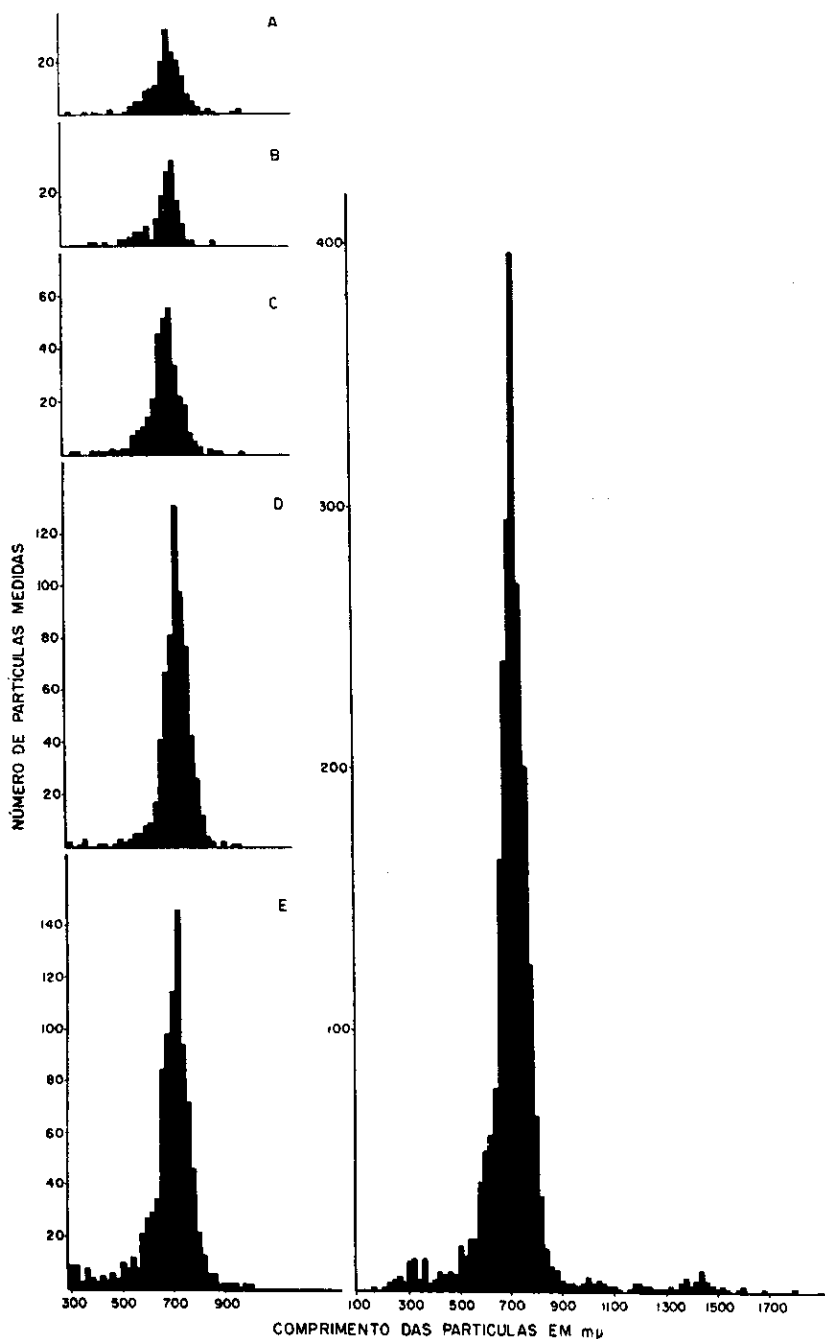


FIGURA 2. — Distribuição dos comprimentos das partículas de VMP em exsudatos de diferentes plantas hospedeiras: A — rubi; B — erva-de-Santa Maria; C — girassol; D — fumo; E — *Chenopodium amaranticolo*; F — total.

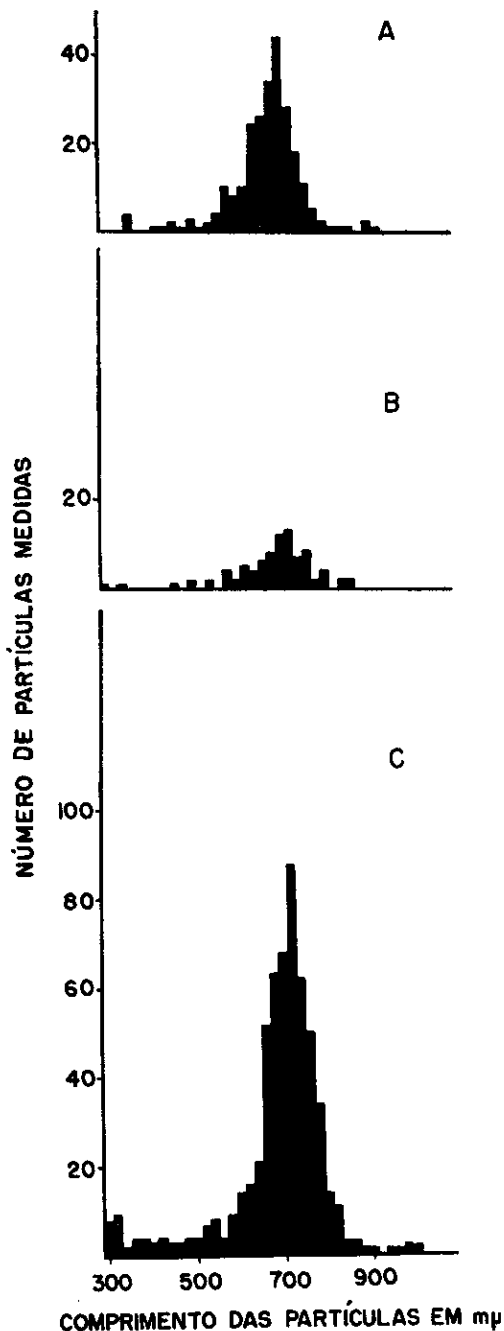


FIGURA 3. — Distribuição dos comprimentos das partículas de VMP em exsudato de *Chenopodium amaranticolor*: A — sem tratamento; B — centrifugado; C — dialisado.

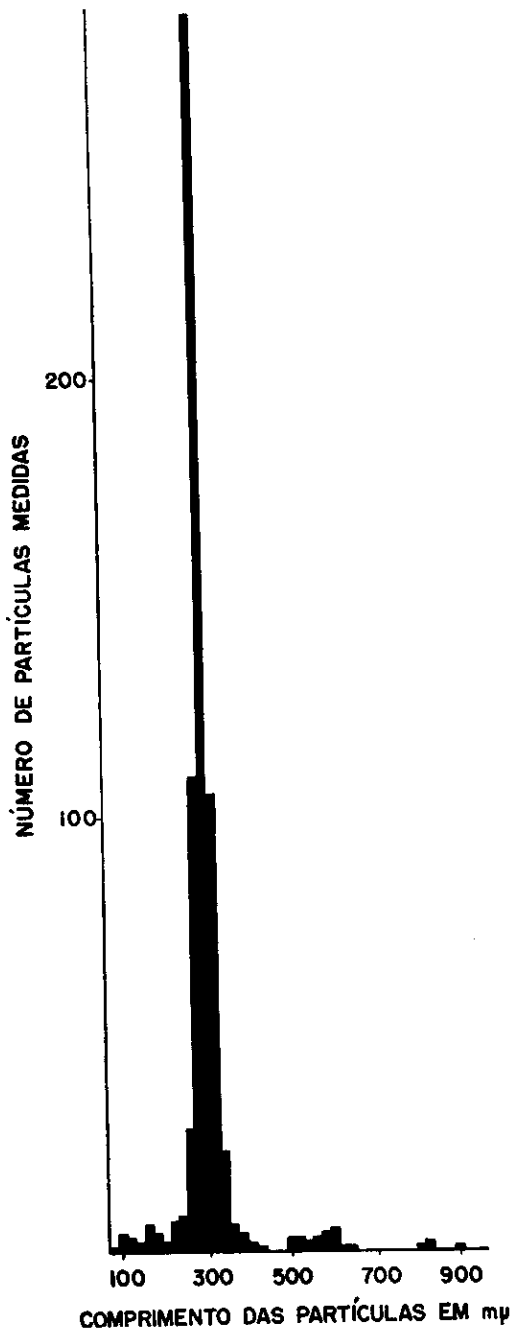


FIGURA 4. — Distribuição dos comprimentos das partículas do vírus do mosaico comum do fumo, em exsudato de fumo.

QUADRO 2. — Resultados das medições de partículas do vírus do mosaico do picão quando o exsudato (1) foi submetido a diferentes tratamentos

Tratamento	Número de partículas medidas			Comprimento normal
	No pico principal (2)	Porcentagem do total	Total	
Díálise	453	74,5	609	$m\mu$ 714,17
Centrifugação	65	73,0	89	714,15
Contrôle	197	75,0	263	711,27

(1) Exsudato de *Chenopodium amaranticolor*.

(2) Entre 640 e 800 $m\mu$ no histograma de distribuição dos comprimentos das partículas.

O diâmetro das partículas do VMP, tomando-se como padrão aquêlo do vírus do mosaico comum do fumo (15 $m\mu$), foi de 12-13 $m\mu$. O CN do vírus do mosaico do fumo determinado paralelamente e pelos mesmos métodos, correspondeu ao citado na literatura (1, 14), isto é, 300 $m\mu$ (figura 4).

4 — DISCUSSÃO

A presença de partículas alongadas, de 720 $m\mu$ x 12-13 $m\mu$, foi constatada no exsudato de oito espécies pertencentes a cinco famílias diferentes, quando infectadas pelo VMP, e não no de plantas sadias. Essas observações são consideradas como evidência de que tais partículas representam o vírus causador do mosaico do picão. Seria difícil conceber que partículas que ocorrem sistematicamente no material afetado e não no sadio, com forma e dimensões constantes, pudessem representar produtos da reação dessas diferentes hospedeiras à infecção. Paralelamente, há vários casos na literatura onde as partículas observadas em exsudatos foram identificadas como sendo as partículas elementares do vírus, graças a trabalhos de microscopia electrónica quantitativa conjugados com ensaios biológicos. Entre outros podem ser mencionados o «tobacco rattle» (7, 10), mosaico do fumo (1, 12), vírus X da batatinha (2, 11), amarelo da beterraba (5, 9).

Brandes e Wetter (4) classificaram os vírus alongados segundo o CN e diâmetro das partículas, modo de transmissão e ponto de inativação térmica. O VMP nessa classificação pertenceria ao grupo 10.

que tem as seguintes características: CN, 730 $m\mu$; diâmetro, 12-13 $m\mu$; transmissão mecânica e por meio de afídios; ponto de inativação térmica, 50-60°C. Embora o vírus causador do mosaico da alface (*Lactuca sativa* L.), no sistema de classificação daqueles investigadores seja colocado no grupo II (CN, 750 $m\mu$), julgam os autores que há certa relação entre êste e o VMP, embora não sejam idênticos. Experiências visando determinar o grau de parentesco entre os dois vírus serão descritas em outro trabalho (6).

MORPHOLOGY OF THE BIDENS MOSAIC VIRUS PARTICLE

SUMMARY

Electron microscopical observations were made on exudates obtained from plants of *Bidens pilosa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Leonotis nepetifolia*, *Helianthus annuus*, *Nicotiana tabacum*, *Cassia occidentalis*, *Chenopodium ambrosioides*, and *Physalis floridana* infected with a virus that induces mosaic on the first named species. The presence of a flexible thread with a normal length 720 $m\mu$ x 12-13 $m\mu$ was recorded in the exudates from the diseased plants, but not in those from the healthy ones, and is considered to represent the causal virus.

LITERATURA CITADA

1. BODE, O. & KÖHLER, E. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Kartoffel-X und Tabakmosaik-Virus. Z. Naturforsch. 7:598-600. 1952.
2. ——— & PAUL, H. L. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Kartoffel Viren. I. Vermessung an Teilchen des Kartoffel-X-Virus. Biochim. et Biophys. Acta 16:343-345. 1955.
3. ——— ——— Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Kartoffel-Viren. III. Vermessung an Teilchen des Kartoffel-Y-Virus. Phytopathol. Z. 27:107-112. 1956.
4. BRANDES, J. & WETTER, C. Classification of elongated plant viruses on the basis of particle morphology. Virology 8:99-115. 1959.
5. ——— & ZIMMER, K. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die viröse Vergilbungs Krankheit der Rube (beet yellows). Phytopath. Z. 24:211-215. 1955.
6. COSTA, A. S., CARVALHO, ANA MARIA B & KITAJIMA, ELLIOT W. Mosaico do picão. (Em preparo).
7. HARRISON, B. D. & NIXON, H. L. Separation and properties of particles of tobacco rattle virus with different lengths. J. gen. Microb. 21: 569-581. 1959.
8. JOHNSON, J. Virus particles in various plant species and tissues. Phytopathology 41:78-93. 1951.
9. MUNDREY, K. W. Über die Korrelation zwischen Partikellänge und Infektiosität beim Vergilbungsvirus der Ruben. Z. Naturforsch. 13:19-27. 1958.

10. PAUL, H. L., & BODE, O. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Kartoffel-Viren. II. Vermessung an Teilchen von drei stämmen des Rattle-Virus. *Phytopath. Z.* 24:341-351. 1955.
11. ROCHOW, W. F., ROSS, R. A. & SIEGEL, B. M. Comparison of local lesion and electron microscope particle count methods for assay of PVX from plants doubly infected by PVX and PVY. *Virology* 1:28-39. 1955.
12. STEERE, R. J. Virus increment curves obtained from counts of particles in clarified juice. *Amer. J. Bot.* 39:211-220. 1952.
13. WETTER, C. & BRANDES, J. Untersuchungen über das Kartoffel-S-Virus. *Phytopathol. Z.* 26:81-92. 1956.
14. WILLIAMS, R. C. & STEERE, R. L. Electron microscopic observations on the unit length of the particle of TMV. *J. Amer. chem. Soc.* 73:2057-2061. 1951.