

ELLIOT W. KITAJIMA

ENGENHEIRO - AGRÔNOMO

SEÇÃO DE VIROLOGIA  
INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS

MORFOLOGIA DAS PARTÍCULAS DO VÍRUS  
DO ANEL DO PIMENTÃO E ULTRAESTRUTURA  
DOS TECIDOS INFETADOS

Tese apresentada à Escola Superior  
de Agricultura "Luiz de Queiroz"  
da Universidade de São Paulo, para  
obtenção do título de Doutor em  
Agronomia.

CAMPINAS — ESTADO DE SÃO PAULO  
1967

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO . . . . .	1
2. REVISÃO DE LITERATURA . . . . .	2
a. <u>Vírus do "rattle" do fumo: Generalidades</u> . . . . .	2
b. <u>Microscopia electrónica dos vírus de grupo do VRF</u> . . . . .	4
3. MATERIAL E MÉTODOS . . . . .	9
a. <u>Material</u> . . . . .	9
<u>Vírus</u> . . . . .	9
<u>Plantas hospedeiras utilizadas</u> . . . . .	9
b. <u>Métodos</u> . . . . .	9
<u>Determinação do comprimento normal - método do "dipping"</u> . . . . .	9
<u>Contrastação negativa e positiva</u> . . . . .	11
<u>Tratamento enzimático do VAP</u> . . . . .	12
<u>Tratamento térmico do VAP</u> . . . . .	12
<u>Técnicas histológicas para microscopia electrónica</u> . . . . .	12
4. RESULTADOS . . . . .	15
a. <u>Morfologia das partículas do VAP</u> . . . . .	15
<u>Determinação do comprimento normal</u> . . . . .	15
<u>Ultraestrutura das partículas do VAP, em preparações contrastadas negativa ou positivamente</u> . . . . .	17
<u>Efeito do tratamento enzimático</u> . . . . .	17
<u>Efeito do tratamento térmico</u> . . . . .	18
<u>Secções de sedimentos de preparações purificadas do VAP, - ultracentrifugadas</u> . . . . .	19
b. <u>Observações histológicas em secções ultra-finas de tecidos de plantas infetadas pelo VAP</u> . . . . .	20
<u>Inclusões citoplasmáticas de partículas do VAP</u> . . . . .	20
<u>Associação das inclusões do VAP com mitocôndrios</u> . . . . .	21
<u>Estrutura do tecido foliar de plantas infetadas pelo VAP</u> . . . . .	22
<u>Secções do tecido radicular de tomateiro e fumo, infetado pelo VAP</u> . . . . .	24
<u>Secções do ápice vegetativo e dos primórdios foliares de plantas de fumo infetados sistemicamente pelo VAP</u> . . . . .	25

<u>Ocorrência de inclusões do VAP em tecidos florais e do fruto em tomateiro</u> . . . . .	26
<u>Infeção mista de plantas com o VAP e com o vírus Y da batata</u> . . . . .	26
<u>Cristais perinucleares em células do parênquima do floema de perpetua infetada pelo VAP</u> . . . . .	26
c. <u>Histologia de tecidos infetados pelo VAP ao microscópio convencional</u> . . . . .	27
5. DISCUSSÃO . . . . .	28
a. <u>Identidade das partículas observadas ao microscópio electrónico e o VAP</u> . . . . .	28
b. <u>Morfologia das partículas do VAP</u> . . . . .	28
c. <u>Alterações morfológicas das partículas do VAP, induzidas por tratamentos enzimáticos ou térmicos</u> . . . . .	31
d. <u>A natureza das partículas curtas</u> . . . . .	32
e. <u>As partículas do VAP "in situ" e a citologia dos tecidos de plantas infetadas</u> . . . . .	35
<u>As inclusões citoplasmáticas e sua associação com mitocôndrio</u> . . . . .	35
<u>Citologia das folhas de plantas infetadas pelo VAP</u> . . . . .	38
<u>Presença do VAP na zona meristemática apical e radicular</u> . . . . .	40
<u>Infeção mista de plantas com o VAP e com o vírus Y da batata</u> . . . . .	41
f. <u>Histologia de plantas infetadas pelo VAP ao microscópio convencional</u> . . . . .	41
6. RESUMO . . . . .	42
7. SUMMARY . . . . .	45
8. LITERATURA CITADA . . . . .	48

A minha espôsa e filho  
e à memória de meus pais  
dedico.



## AGRADECIMENTOS

O autor deseja consignar, aqui, os seus sinceros agradecimentos:

Ao Prof. Ferdinando Galli, orientador desta tese, pelo incentivo, sugestões e apoio dado à execução do presente trabalho.

Ao Dr. Álvaro Santos Costa, pelas discussões, sugestões e críticas estimulantes, durante o desenvolvimento do trabalho e na revisão dos originais.

Aos Profs. Almiro Blumenschein, Darcy M. Silva e Carminda da Cruz-Landin, pelas críticas e sugestões ao manuscrito.

Aos colegas da Seção de Virologia, pelas colaborações prestadas, - particularmente aos engs. agrs. Avelino Rodrigues de Oliveira e José B. Mattiello, pelas purificações do vírus.

A Dr. José Elias de Paiva Netto, Diretor do Instituto Agrônomo - de Campinas, pelas facilidades proporcionadas à realização da presente tese.

A Srta. Ivonete de Souza Braga e aos srs. Miguel O. Torre, Beneticto Ferreira, Luiz Afonso, William C. Ducret, Benedito L. A. Braga e Renato Ramalho Jr. pela atenciosa cooperação prestada na apresentação deste - trabalho.

A todos os funcionários e demais pessoas que, de uma maneira ou outra, contribuíram para a execução e apresentação deste trabalho.

EWA

# MORFOLOGIA DAS PARTÍCULAS DO VÍRUS DO ANEL DO PIMENTÃO E ULTRAESTRUTURA DOS TECIDOS INFETADOS <sup>(1)</sup>

## I - INTRODUÇÃO

Uma moléstia de vírus em pimentão (Capsicum annuum L.), encontrada no município de São Carlos, S.P., em 1960, foi denominada anel ou mancha anular de pimentão. As propriedades biológicas, bem como dados preliminares sobre a morfologia e a serologia do vírus do anel de pimentão (VAP) (Costa et al., dados não publicados) permitiram sua inclusão no grupo do "rattle" do fumo (Nicotiana tabacum L.). Posteriormente outros isolados do VAP foram encontrados em tomateiros (Lycopersicon esculentum Mill.) em Jacutinga, M.G. e Itapeva, S.P., além de um outro, que apareceu nas estufas da Seção de Virologia do Instituto Agrônomo, infectando o picão (Bidens pilosus L.) (Costa et al., e Costa e Kitajima, dados não publicados). A purificação e a determinação de algumas propriedades físicas e químicas do isolado de São Carlos foram recentemente descritas (Silva, 1965).

O objeto da presente tese é relatar parte das investigações básicas que estão sendo conduzidas em relação ao VAP, na Seção de Virologia do Instituto Agrônomo de Campinas, e refere-se à descrição da morfologia das partículas deste vírus, em preparações rápidas, em material purificado e no interior das células infetadas. Também são descritas algumas alterações na ultraestrutura dos tecidos de plantas infetadas, discutindo-se aspectos da biosíntese deste vírus.

---

<sup>(1)</sup> Pesquisa subvencionada parcialmente pela FAPESP (C. Agron. - 66/107) e pelo CNPq (TC 4827).

2 - REVISÃO DE LITERATURA

a. Vírus do grupo do "rattle" do fumo. Generalidades

Moléstias causadas por vírus, atualmente considerados pertencentes ao grupo do "rattle" do fumo (VRF), são conhecidas de longa data. Sua primeira menção é atribuída a Behrens (1899) que descreveu uma condição em fumo denominada "Mauche", comparando-a ao mosaico do fumo, em vista da ausência de organismos parasíticos. Böning (1931) redescreveu-a com o nome de "Streifen- und Kräuselkrankheit" (moléstia de listas e encrespamento). Quanjor (1943) denominou uma moléstia similar ao "Mauche" do fumo na Holanda, de "rattle" do fumo. Este nome parece ser o mais adequado para designar genericamente vírus deste grupo (Harrison, 1960), pois foi com ele que suas propriedades foram caracterizadas pela primeira vez. Também as principais propriedades físicas e químicas dos vírus do grupo do VRF tem sido relatadas posteriormente sob esta denominação. Podem ser citadas também como causadas pelos vírus do grupo VRF, outras moléstias como: - "Stengelbont" (Mosqueado do caule) da batata (Solanum tuberosum L.) - (Rozendaal, 1947); "Spraing" da batata (Lihnell, 1958; Eibner, 1959); mosaico em Atropa belladonna L. (Smith, 1943; Cadman & Harrison, 1959); "early browning" da ervilha (Pisum sativum L.) (Bos & van der Want, 1958, 1962; Gibbs & Harrison, 1964), além de algumas moléstias em hortaliças e batata nos Estados Unidos (Walkinschaw & Larson, 1958, 1959; Oswald & Bowman, 1958; Gold et al., 1963; Paulus et al., 1963; Allen, 1963b) e o VAP, no Brasil (Costa et al., dados não publicados).

Na classificação de Johnson (1927), o VRF recebeu o nome de Tobacco virus 11, Böning, enquanto na de Smith (1937), Nicotiana virus 5 (Böning) Smith. Schmelzer (1957) denominou-o de Annulus behrensianus. Lwoff et al. (1962a,b) propuseram uma classificação dos vírus baseada principalmente em características químicas e físicas, e que serviu de base para que uma comissão provisória de nomenclatura propusesse e recomendasse um sistema de nomenclatura e classificação dos vírus (Lwoff & Tournier, 1966). Neste sistema, o VRF pertence ao subfilo Ribovira (ácido ribonucléico como material genético), à classe Ribovirales (vírions com capsídeo de simetria helicoidal).

dal), à ordem Rhabdovirales (ribovirus de nucleocapsídeo nú), à subordem Rigidovirales (nucleocapsídeos rígidos) e à família Pachyviridae. Nas sugestões apresentadas por Lwoff e Tournier, o VRF seria o representante típico desta família, recebendo o nome específico de Pachyvirus crotalum.

A distribuição geográfica dos vírus do grupo do VRF é bastante ampla, tendo já sido descritos na Europa, na América do Norte, e também no Japão (Tomaru, 1964). O VAP parece ser o seu primeiro representante na América do Sul (Costa et al., dados não publicados) e aparentemente não tem a importância econômica que certos integrantes deste grupo têm, particularmente na Europa.

Vírus do grupo do VRF têm um vasto círculo de hospedeiras (Noordam, 1956; Uschdraweit & Valentin, 1956; Schmelzer, 1957; van Slogteren, 1958; Costa et al., dados não publicados); são relativamente estáveis, conforme indicam suas propriedades físicas in vitro (van der Want, 1952; Schmelzer, 1957; Cadman & Harrison, 1959; Costa et al., dados não publicados). A transmissão mecânica do VRF é feita facilmente, exceto a de certos isolados instáveis (Cadman & Harrison, 1959). Estes têm sua infetividade sensivelmente majorada, quando o suco das plantas infetadas é extraído em presença de fenol, o que levou alguns autores (Singer & Brandenburg, 1961; Cadman, 1962) a sugerirem que tais isolados ocorressem como ácido nucléico livre.

Investigações sobre relações imunológicas entre diferentes isolados do VRF, encontrados em diferentes partes do mundo, mostraram, quase sempre, a existência de agrupamentos antigênicos comuns (Oswald & Bowman, 1958; Cadman & Harrison, 1959; Walkinschaw & Larson, 1959; Costa et al., dados não publicados; Maat, 1963; Allen, 1963b; Gold et al., 1963; Tomaru, 1964; Oliveira, dados não publicados).

Análises químicas feitas em preparações purificadas do VRF mostraram que as partículas têm 95% de proteína e 5% de ácido ribonucleico (RNA); este pode ser separado da parte proteica, mantendo ainda sua infetividade (Harrison & Nixon, 1959a,b). Silva (1965) obteve resultados similares com o VAP, tendo ainda feito a determinação da composição qualitativa dos áci-

dos aminados, bem como de ácido aminado terminal (Iisim) da proteína, e a proporção relativa dos nucleotídios do RNA deste vírus. Semancik (1966) - identificou quantitativa e qualitativamente os ácidos aminados da porção proteica de um isolado californiano do VRF, verificando a ocorrência de 18 ácidos aminados, 1 a mais (histidina) que o VAP.

b. Microscopia eletrônica dos vírus do grupo do VRF.

van der Want e Rozendaal (1948) foram os primeiros a examinarem ao microscópio eletrônico preparações de plantas infetadas pelos vírus de "rattle" do fumo e do mosqueado do caule da batata, tendo encontrado partículas em forma de bastonetes, de 150 e 300 m $\mu$  de comprimento. Paul e Bode (1955) utilizando o método do exsudato de Johnson (1951), reinvestigaram a morfologia das partículas de diversos isolados do VRF, confirmando a forma em bastonete das mesmas, e que tinham cerca de 20 m $\mu$  de diâmetro, e eram de dois tipos quanto ao comprimento normal (CN), respectivamente 70 e 180 m $\mu$ . Paul e Bode atribuíram a presença de partículas de 300 m $\mu$ , encontradas pelos autores holandeses a uma possível contaminação com o vírus do mosaico comum do fumo.

Tentando explicar a existência de dois tipos de partículas do VRF, KBhler (1956) sugeriu que vírus de forma alongada multiplicar-se-iam por crescimento terminal. O VRF teria pontos de rupturas a 70 e 180 m $\mu$ , alternadamente, ao longo das partículas em crescimento, enquanto em outros vírus, este ponto de ruptura seria equidistante, originando partículas de um só tipo quanto ao comprimento.

Harrison e Nixon (1959a) obtiveram preparações altamente purificadas de um isolado britânico do VRF e, por meio de ultracentrifugação em gradiente de densidade (Brakke, 1953), separaram as partículas longas das curtas, demonstrando não haver, entre elas diferenças nas propriedades físicas, químicas e imunológicas, embora a infetividade estivesse somente associada às partículas longas. A proporção entre as partículas curtas e longas variava em um mesmo material de 20:1 até 2:1 (Harrison & Nixon, 1959a; Harrison, - 1961). Aliás, tem sido uma característica geral de os vírus do grupo do VRF apresentarem 2 ou mais tipos de partículas quanto ao comprimento (Quadro 1),

Quadro 1. Valores dos comprimentos normais das partículas curtas e longas, determinados para diversos isolados, estirpes e vírus do grupo do "rattle" do fumo (VRF).

Vírus	Comprimento normal (mμ)		
	Partícula longa	Partícula curta	
VRF, "Distel" e "Stem mottle" da batata	180	70	Paul & Bode, 1955
VRF, isolado PRN	180	70	Harrison & Nixon, 1959a
" "	191	78	Harrison & Woods, 1966
"Early browning" da ervilha, Holanda	210	105	Bos & van der Want, 1962
"Early browning" da ervilha, Inglaterra (1)* (2)	187	78	Harrison & Woods, 1966
	187	46 e 55	
VRF, em batata, Califórnia	200	100	Oswald & Bowman, 1958
VAP	200	55	Costa <u>et al.</u> , 1960
VAP, isolado Bidens	197	52	Harrison & Woods, 1966
VRF, isolado de Oregon	200	105	Allen, 1963b
" " "	194	79	Harrison & Woods, 1966
"Corky ringspot" da batata, Wisconsin	200	60	Allen, 1963a
VRF, em alface, Califórnia	200	100	Gold <u>et al.</u> , 1963
" " "	196	46 e 88	Harrison & Woods, 1966
VRF, isolado do Japão	180	70	Tomaru, 1964
VRF em pimentão, Califórnia Isolado B Isolado C	180	50 e 110	Semancik, 1966
	180	50 e 80	
VRF, isolado da Flórida	195	81	Harrison & Woods, 1966
VRF, isolado de <u>Belladonna</u>	189	44 e 92	Harrison & Woods, 1966
VRF, cultura SP (1)* (2)	188	114	Harrison & Woods, 1966
	188	88, 100 e 112	
VRF, isolado VH, Holanda	187	46 e 55	Harrison & Woods, 1966

\* Segundo Harrison & Woods (1966), em certas culturas, as dimensões das partículas curtas se alteravam de (1) para (2) durante as subculturas sucessivas.

sendo atribuída a infetividade destes vírus às partículas longas, embora alguns autores não excluam totalmente a possibilidade de as partículas curtas serem infetivas (Harrison & Nixon, 1959a; Silva, 1965; De Zoeten & Shalla, 1966a, Semancik, 1966; Oliveira, dados não publicados).

Nixon & Harrison (1959) investigaram a ultraestrutura das partículas do VRF pela técnica de contrastação negativa e positiva, mostrando terem tanto as partículas longas como curtas, forma tubular, com 17-25  $\mu$  de diâmetro externo, medindo o canal axial cerca de 4  $\mu$  de largura. Determinados tratamentos revelaram bandas transversais ao longo das partículas, as quais levaram aqueles autores a sugerirem uma estrutura helicoidal para partículas do VRF.

O vírus do "early browning" da ervilha tem partículas de dimensões ligeiramente diferentes das do VRF, tendo as partículas curtas e longas respectivamente 105 e 210  $\mu$  de comprimento (Bos & van der Want, 1962). Isolados do VRF encontrados em diferentes partes dos Estados Unidos, afetando diferentes culturas, têm sido morfológicamente similares ao vírus do "early browning" da ervilha, embora as investigações serológicas indicassem relações apenas com o VRF (Oswald & Bowman, 1958; Walkinschaw & Larson, 1959; Allen, 1963a,b; Gold et al., 1963; De Zoeten & Shalla, 1966a; Semancik, 1966). Apenas um deles, induzindo o "corky ringspot" da batata, difere dos outros pelo fato de as partículas curtas medirem 60  $\mu$  (Allen, 1963a).

Semancik (1966) investigando um isolado do VRF, obtido de pimenta (Capsicum frutescens L.) por Paulus et al. (1963) verificou que este por sua vez constituía-se numa mistura de 2 isolados. Ambos produzem 3 camadas na ultracentrifugação em gradiente de densidade, diferenciando-se, apenas, no comprimento das partículas que formam a camada intermediária.

Determinações preliminares do CN das partículas do VAP indicaram, também a existência de 2 tipos de partículas, aproximadamente de 55 e 200  $\mu$  de comprimento (Costa et al., dados não publicados).

Apresentemente, as diferenças no CN das partículas dos diferentes vírus integrantes do grupo do VRF não seriam tão grandes como inicialmente determinadas. Harrison e Woods (1966) comparando em condições similares diversas propriedades de 10 isolados diferentes do VRF, provenientes de várias partes do mundo (5 britânicos, 1 holandês, 3 norte-americanos e 1 brasileiro), dividiram-nos em 3 serotipos - I, II e III - cujas partículas longas mediam respectivamente 188, 195 e 197 m $\mu$ , todos êles com coeficiente de sedimentação ao redor de 305S. Os isolados europeus constituíam o serotipo I, estando distantemente relacionados com o VAP, que representava o serotipo III. Êste por sua vez era longinquamente relacionado aos isolados norte-americanos, formando o serotipo II. - Harrison e Woods não conseguiram encontrar relações serológicas entre os isolados europeus e norte-americanos, mas outros autores já as obtiveram anteriormente (Oswald & Bowman, 1958; Walkinschaw & Larson, 1959; Allen, 1963b; Semancik, 1966; De Zoeten & Shalla, 1966a). Em relação às partículas curtas, Harrison e Woods separaram os diversos isolados em 6 grupos, em que seu comprimento variava de 43 a 115 m $\mu$ . Êstes grupos, todavia não correspondem aos serotipos. Mencionam ainda êles, que em certos isolados, o comprimento das partículas curtas variou durante a subcultura (Quadro 1), embora o fato pudesse ser atribuído a uma contaminação.

Êste estudo comparativo permitiu a Harrison e Klug (1966), confrontando o coeficiente de sedimentação e o comprimento das partículas curtas e longas dos diferentes isolados do VRF, verificarem uma correlação positiva entre êstes parâmetros.

Markham et al. (1963) utilizando um método estroboscópico, demonstraram a existência de 25 1/3 subunidades morfológicas (capsômeros) dispostas radialmente, quando as partículas do VRF eram vistas de t $\acute{o}$ po. De Zoeten e Shalla (1966b) contudo, encontraram apenas 16 nas mesmas condições, em um isolado californiano do VRF. Offord (1966) empregando um método mais refinado de contrastação negativa (Leberman, 1965), confirmou os resultados de Markham et al. (1963).



Através de microscopia eletrônica de alta resolução, Offord (1966) estabeleceu os valores de 256 Å para o diâmetro externo e 25,5 Å para o passo da hélice formada pelos capsômeros do VRF. Uma espécie de formação anelar foi notada a 82,4 Å do centro, mas o autor não pôde afirmar se ela indicaria a posição do RNA. Com base nêstes parâmetros, Offord calculou o pêso molecular dos capsômeros (24.000 d), cujo valor concordou com aquê le, deduzido através de análises químicas. As partículas longas (ca. 1800 Å de comprimento) teriam assim 1830 capsômeros, enquanto as curtas (ca. 700 Å de comprimento), 660. Supondo 4 nucleotídios por capsômero, o pêso molecular total das partículas longas seria  $46 \times 10^6$  d, e das menores  $16,5 \times 10^6$ . Harrison e Klug (1966) baseados no coeficiente de sedimentação e na morfologia das partículas, deduziram valores semelhantes. Tais números concordam com aqueles sugeridos por Paul e Bode (1955), mas são cêrca de 25% superiores aquêles deduzidos por Silva (1965) para o VAP, fundamenta dos em métodos espectrofotométricos e nas medições das partículas

A maioria dos vírus do grupo do VRF é transmitida por nematóides (Cadman, 1963), tendo Slinger et al. (1962) sugerido a possibilidade de esta transmissão ser do tipo persistente, baseados na presença de partículas típicas do VRF em extratos infetivos de Trichodorus christei virulíferos.

Silva (1965) menciona que o tratamento de preparações purificadas e infetivas do VAP, a 85°C/90", induz a ruptura das partículas em fragmentos curtos, ou o afrouxamento da estrutura helicoidal das partículas, além da eliminação da infetividade.

Edwardson (1966) e De Zoeten e Shalla (1966b) relatam trabalhos sobre microscopia eletrônica do VRF in situ. Edwardson limita-se a mencionar, vagamente, que não encontrou inclusões intranucleares e nem as do tipo induzido pelos vírus do grupo do Y da batata, em tecidos de fumo infetado pelo VRF. De Zoeten e Shalla por outro lado, demonstraram em tecido foliar de fumo, infetado por um isolado californiano do VRF, a presença de inclusões citoplasmáticas, formadas de partículas semelhantes àquelas encontradas in vitro. Tais partículas formavam arranjos cristalinos e apa-

reciam 8-10 dias após a inoculação, nos brotos axilares, situados acima da folha inoculada, mas posteriormente elas se desagregavam, dispersando-se no citoplasma. Estes autores dizem ter encontrado partículas curtas no interior de células infetadas, embora não apresentem nenhuma micrografia eletrônica comprobatória. Baseados nesta evidência, sugerem eles, que, as partículas curtas não resultariam de artefatos de preparo, mas seriam produtos não infetivos da infecção. Lister (1966), por outro lado, ressalta a importância das partículas curtas, quando sugere que a produção de formas estáveis do VRF estaria condicionada à sua presença no inóculo, pois elas conteriam informações necessárias para o capeamento do RNA do VRF pela proteína. Todavia as evidências apresentadas não são convincentes.

Harrison e Woods (1966) relatam uma ligeira diferença entre as extremidades das partículas de diversos isolados do VRF, sendo uma delas côncava e outra, convexa, e, também, que as partículas do vírus do "early browning" da ervilha seriam um pouco estreitas (em cerca de 6,5%) do que as do VRF, o que viria explicar certa diferença no comportamento daquele vírus em relação a este, durante a sedimentação.

Na classificação dos vírus alongados, baseada na morfologia das partículas (Brandes & Wetter, 1959; Brandes, 1964; Brandes & Bercks, 1965), no grupo morfológico do VRF estão incluídos além deste, os vírus do "early browning" da ervilha, do mosaico em faixa da cevada (Hordeum vulgare L.) CN= 130 mp, e o do mosaico do trigo (Triticum sativum L.) transmissível pelo solo- CN= 160 mp. Todavia até o presente, não foram estabelecidas relações de parentesco entre os dois últimos com os primeiros.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### a. Material

##### Vírus

No presente trabalho, utilizaram-se quatro isolados do vírus do anel do pimentão (VAP), denominados respectivamente São Carlos, Jacutinga, Bidens e Itapeva (Costa et al., e Costa & Kitajima, dados não publicados), mantidos na coleção da Seção de Virologia do Instituto Agrônomo.

##### Plantas utilizadas

Foram seguintes as plantas, inoculadas ou não com um dos diferentes isolados do VAP acima mencionados, empregadas para microscopia eletrônica: Solanaceae- fumo (Nicotiana tabacum L.)- s (li- lesões locais; s- infecção sistêmica); N. glutinosa L.- s; pimentão (Capsicum annuum L.)- s; pimenta (Capsicum pendulum Willd.)- s; tomateiro (Lycopersicon esculentum Mill.)- s; maria preta (Solanum nigrum L.)- s; Compositae- girasol (Helianthus annuus L.)- s; emília (Emilia flammula Cass.)- s; picão (Bidens pilosus L.) s; Chenopodiaceae- Chenopodium amaranticolor Coste e Reyn. 11; C. quinoa Willd.- 11; C. murale- 11; Labiatae- cordão-de-frade (Leonotis nepetifolia (L.) R. Br.)- s; Amaranthaceae- perpétua (Gomphrena globosa L.)-s. As plantas foram inoculadas mecânicamente, e utilizadas quando mostravam reações locais ou sintomas sistêmicos conspícuos.

#### b. Métodos

##### Determinação do comprimento normal- método do "dipping"

A fim de se determinar o comprimento normal (CN) (Wetter & Brandes, 1956; Bode & Paul, 1956) das partículas do VAP, prepararam-se folhas de plantas infetadas com um dos isolados deste vírus para microscopia eletrônica, pela técnica do "dipping" (Brandes, 1957). Pequenos fragmentos da folha foram cortados com navalhas esterilizadas, e mergulhados em uma gota de água destilada, mantida sobre uma telinha porta objeto, previamente coberta com uma película de plástico. Após alguns segundos, este fragmento foliar era retirado, eliminando o excesso de líquido sobre a telinha com o auxílio de papel filtro. A telinha era a seguir metalizada a vácuo com paládio ou cromo, sob um ângulo de 10-15° e examinada ao microscópio eletrônico a uma magnificação instrumental de 5.000x.

Uma variante desta técnica, em que se combina o método do "dipping" com o da contrastação negativa Kitajima, (1965b) foi também empregada. - Neste processo, uma gota do corante (solução a 1% do ácido fosfotungstico, neutralizada com KOH N, e contendo traços de albumina de soro bovino) era colocada sobre uma superfície parafinada. Nesta gota era posta a flutuar 5-10 pequenos fragmentos do tecido foliar, cortados com navalha esterilizada. A seguir, uma telinha porta-objeto coberta com película de plástico ou carbono, era também posta a flutuar nesta gota por alguns segundos, com a face coberta pela película em contacto com o líquido. A telinha era então retirada, removendo-se o excesso de líquido com papel filtro, e imediatamente, a seguir, examinada ao microscópio electrónico.

Em ambos os casos os negativos das micrografias electrónicas foram ampliadas a uma magnificação final de 50.000x, em um ampliador fotográfico. O comprimento das partículas era então medido e os valores obtidos, distribuídos em classes de 25 m $\mu$  de intervalo. A calibração da magnificação dada pelo microscópio electrónico foi feita segundo as instruções da firma fabricante o que pode dar um desvio de até  $\pm$  5%. Brandes (1961) sugeriu a mensuração em condições comparativas, do vírus de comprimento normal ainda não determinado, com outros cujo CN acha-se bem estabelecido, pois a magnificação absoluta do microscópio electrónico quase sempre é de difícil determinação, e pode variar de um momento para outro. Nestas condições, diz ele, que diferenças da ordem de 10 m $\mu$  entre CN de diferentes vírus podem ser detectadas. Assim, para controlar os resultados das determinações do CN do VAP, foram feitas em algumas ocasiões, medições comparativas deste vírus com o vírus do mosaico comum do fumo (VMCF), cujo CN acha-se muito bem definido (= 300 m $\mu$ ). Para esta finalidade, preparações do VAP e do VMCF, provenientes de plantas da mesma espécie, foram feitas pelo método de "dipping" e examinadas ao microscópio electrónico. Uma série de micrografias electrónicas de uma das preparações era tomada. Esta era imediatamente substituída pela preparação do outro vírus e tirando-se outra série de fotos, sem praticamente tocar nos contróles de focalização do aparelho.

Preparações de plantas não inoculadas também foram examinadas ao microscópio electrónico para servirem de controle.

Contrastação negativa e positiva

Detalhes ultraestruturais das partículas do VAP foram investigadas pelas técnicas de contrastação negativa ou positiva (Brenner & Horne, 1959; Huxley & Zubay, 1961). Preparações altamente purificadas e infetivas do VAP, obtidas por ciclos de ultracentrifugação diferencial e em gradiente de densidade (Oliveira, dados não publicados), foram utilizadas para tal propósito. Amostras para microscopia electrónica foram colhidas destas preparações, antes ou depois da ultracentrifugação em gradiente de densidade.

Estas amostras eram usualmente diluídas a uma concentração adequada em água destilada ou em solução de tampão fosfato 0,01M a pH 7. Uma gota desta suspensão era colocada sobre uma superfície parafinada, e uma telinha porta-objeto para microscopia electrónica, previamente coberta com película de plástico ou carbono, era posta a flutuar sobre a gota durante 30 a 60 segundos. Com o auxílio de uma pinça a telinha era retirada da gota, removendo-se o excesso de líquido da telinha, com papel filtro, deixando-se secar o restante da suspensão aderente à película à temperatura ambiente. Para contrastação positiva, a telinha era novamente posta a flutuar numa gota de solução saturada de acetato de uranila, com a película em contacto com ela, durante 2 horas (Huxley & Zubay, 1961). Fim do tratamento, a telinha era removida do corante, lavada cuidadosamente com água destilada e depois de seca, examinada ao microscópio electrónico. Para contrastação negativa, a solução de acetato de uranila era substituída pela de ácido fosfotungstico, a 1% neutralizada com KOH N, e contendo traços de albumina. Neste caso, o contacto da telinha com a solução corante foi de apenas alguns segundos.

O exame electrónico-microscópico destas preparações foi feito à magnificações instrumentais de 20.000 a 80.000x, utilizando-se o condensador duplo e diafragmas na objetiva, de 20 e 50  $\mu$  de diâmetro.

### Tratamento enzimático do VAP

Para avaliar-se o efeito da tripsina, e da ribonuclease (RNase) sobre a estrutura das partículas, preparações purificadas do VAP, foram incubadas em presença de cada uma destas enzimas, ou de ambas, a 37°C durante 1 hora. Para este tratamento, as preparações do VAP foram misturadas em partes iguais, com soluções de tampão fosfato, 0,01M, pH 7, contendo enzimas na concentração de 2%. A solução final era colocada em um tubo de vidro de paredes finas, e incubadas durante 1 hora, em banho maria a 37°C. Preparações do VAP, sem as enzimas, incubadas ou não a 37°C, representavam os controles. A tripsina utilizada era DIFCO (1: 250) e a RNase (5x, cristalizada, de pancreas de bovino, grau A), Calbiochem. Encerrado o tratamento, amostras foram retiradas para microscopia eletrônica e examinadas após serem contrastadas negativamente. As preparações tratadas e os controles foram novamente ultracentrifugados para se eliminar o efeito inibidor das enzimas, e testadas quanto à sua infetividade.

### Tratamento térmico do VAP

A fim de se verificar o que sucede às partículas quando deixam de ser infetivas pela ação do cábr, alíquotas de 1 ml de preparações altamente purificadas, foram colocadas em ampolas de vidro de paredes delgadas, as quais foram seladas e mergulhadas em água aquecida e mantida à temperatura constante, de 40 a 90°C, em intervalos de 5°C, durante 10 minutos. Ao fim do tratamento, as ampolas eram imediatamente mergulhadas em gelo fundente, e o seu conteúdo examinado ao microscópio eletrônico após serem contrastadas negativamente. Uma alíquota do material aquecido era testada quanto à infetividade. Como controle, uma amostra ficou sem ser aquecida.

### Técnicas histológicas para microscopia eletrônica

Tecidos de plantas infetadas pelo VAP foram investigados sob o aspecto histológico, através de secções ultra-finas. Pedacos pequenos (1-2mm<sup>2</sup>) de tecido foliar de plantas (fumo, Nicotiana glutinosa, maria pretinha, pimenta, pimentão, tomateiro, Chenopodium amaranticolor, picão e perpétua) - infetadas com um dos isolados do VAP foram usualmente fixadas em uma solução de tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) a 1%, em tampão fosfato de sódio, pH 7, -

0,2 M durante 10-12 horas, a 4°C (Millonig, 1964). Eventualmente outros fixadores como o de Palade ( $\text{OsO}_4$  em tampão veronal-acetato-Palade, 1952), de Caulfield (fixador de Palade, contendo sacarose- Caulfield, 1957), de Dalton (fixador cromo-ósico - Dalton, 1955), aldeído-glutarico seguido ou não de pós-fixação com  $\text{OsO}_4$  (Sabatini *et al.*, 1963) e permanganato de potássio ( $\text{KMnO}_4$ ) a 2% com ou sem tampão (Luft, 1958; Mollenhauer, 1959; Warmke & Edwardson, 1966). Além de tecido foliar, tecido radicular de tomateiro e fumo; tecidos do ápice vegetativo do fumo; mesocarpo do fruto de tomateiro e uma inflorescência anômala de tomateiro, infetados por um dos isolados do VAP, também foram fixados por um dos métodos acima referidos. Com relação ao tecido radicular, particularmente no tomateiro, um sistema excelente foi o de utilizar raízes adventícias produzidas em caules de tomateiro, mergulhadas em água, e que permitia coletar raízes em diferentes estágios de desenvolvimento com extrema facilidade de manuseio e condições de limpeza, além da excelente reprodutibilidade dos resultados. Após a fixação, o material era desidratado em série de concentração crescente de acetona, à baixa temperatura, e em período relativamente curto, e incluído em Epon 812 (Luft, 1961) ou Araldita 6005 (Glauert & Glauert, 1958). Secções ultra-finas (50-70  $\mu\text{m}$  de espessura) foram feitas em um ultramicrotomo Porter-Blum, modelo MT-1, utilizando-se navalhas de vidro, e contrastadas com citrato (Reynolds, 1963) ou hidróxido (Karnovski, 1961) de chumbo, e/ou acetato de uranila (Watson, 1958). Algumas secções mais espessas (0,5- 1  $\mu\text{m}$  de espessura) foram preparadas para serem examinadas ao microscópio convencional, sendo coradas com uma mistura de Azur II e Azul de metileno-bórax, a 1% (Richardson *et al.*, 1960); também pedaços de epiderme de folhas foram fixadas brevemente (30-60") em aldeído glutárico (3% em tampão fosfato de sódio 0,15 M, pH 7) e examinadas diretamente ao microscópio convencional.

Além dos tecidos, sedimentos de preparações do VAP, purificadas e infetivas, obtidas por ultracentrifugação, foram processadas como se fossem tecidos (fixação, desidratação e inclusão), e seccionadas em fatias ultra-finas, e examinadas ao microscópio eletrônico.

Tôda microscopia electrônica do presente trabalho foi feita em um aparelho EMISKOP I, da Siemens <sup>(2)</sup>, instalado no laboratório de microscopia electrônica da Seção de Virologia, Instituto Agronômico de Campinas.

---

<sup>(2)</sup> Doação conjunta da Fundação Rockefeller e do Conselho Nacional de Pesquisas.



#### 4 - RESULTADOS

##### a. Morfologia das partículas do VAP

###### Determinação do comprimento normal

Em tôdas as preparações rápidas para microscopia electrônica, feitas a partir de plantas infetadas por qualquer um dos 4 isolados do VAP, foram encontradas sistematicamente partículas em forma de bastonetes rígidos, de cerca de 20-25  $\mu$  de diâmetro e de dois tipos predominantes quanto ao comprimento, respectivamente de cerca de 55 e 200  $\mu$ , confirmando as observações preliminares de Costa et al., (dados não publicados) (Figs. 1A-E; 2A,B). Em nenhum caso, partículas similares foram encontradas em preparações feitas a partir de plantas contrôles, não inoculadas (15 espécies, pertencentes a 5 famílias).

Os comprimentos daquelas partículas formavam uma distribuição nitidamente bimodal, originando uma curva com dois picos acentuados nas classes 50 e 200  $\mu$ , correspondentes às partículas curtas e longas respectivamente. O comprimento normal (CN) destas partículas foi determinado calculando-se a média aritmética (Brandes & Wetter, 1959) das partículas integrantes das classes 25-75  $\mu$  para as partículas curtas e, 175-225  $\mu$  para as longas. Obtiveram-se valores de 54 e 199  $\mu$  para os CN das partículas curtas e longas respectivamente, considerando-se o total das partículas medidas (cerca de 8 mil). Não houve diferenças significativas nestes valores atribuíveis às diferenças de isolado ou da planta hospedeira, considerando-se as variações até da ordem de 3-5% na magnificação do microscópio electrónico (Fig. 3 - Quadro 2).

Também não se notou diferenças nos valores do CN das partículas curtas ou longas do VAP, quando o material infetado foi preparado para microscopia electrónica pelo método do "dipping" convencional (Brandes, 1957) ou combinado com a contrastação negativa (Kitajima, 1965b) (Fig. 4A - Quadro 3A).

Determinação dos CN das partículas do VAP e do VMCF, em condições comparativas, deram sistematicamente valores ao redor de 300  $\mu$  para o VMCF e 55 e 200  $\mu$  para as partículas curtas e longas, respectivamente, do VAP (Fig. 4B - Quadro 3B).

Quadro 2. Resultado geral das determinações dos comprimentos normais de 4 isolados do vírus do pimentão (VAP), infetando diferentes plantas hospedeiras.

Plantas hospedeiras	Isolados																		TOTAL								
	São Carlos						Jacutinga						Eidens						Itapeva						n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	N
	n <sub>1</sub>	CM <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	CM <sub>2</sub>	N	n <sub>1</sub>	CM <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	CM <sub>2</sub>	N	n <sub>1</sub>	CM <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	CM <sub>2</sub>	N	n <sub>1</sub>	CM <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	CM <sub>2</sub>	N							
Fumo	346	53	565	199	1105	66	59	157	201	275	98	54	83	202	217	25	54	72	200	116	530	54	877	199	1763		
<u>N. glutinosa</u>	74	55	167	200	279	153	58	174	203	374	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	227	57	341	200	653		
<u>Physalis sp.</u>	24	55	56	198	104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24	55	56	198	104		
Tomateiro	21	56	160	200	193	42	57	114	204	227	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	63	57	274	200	420		
Maria pretinha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22	50	135	200	159	-	-	-	-	-	-	22	50	135	200	159	
Pimentão	16	55	77	204	106	31	56	159	202	220	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	47	55	236	202	326		
Pimenta	98	53	309	199	469	60	55	173	197	251	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	158	54	482	199	720		
<u>Emília</u>	5	50	125	198	169	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	50	125	198	169		
Girasol	45	54	72	197	129	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	45	54	72	197	129		
Picão	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	207	56	567	199	875	-	-	-	-	-	-	207	56	567	199	875	
<u>C. amaranticolor</u>	52	54	161	199	235	74	54	124	199	221	-	-	-	-	-	43	54	129	202	289	169	54	414	200	628		
<u>C. quinoa</u>	51	58	163	200	254	284	52	180	196	502	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	335	53	343	198	756		
<u>C. murale</u>	29	52	120	196	175	-	-	-	-	-	49	50	140	197	199	-	-	-	-	-	78	51	260	197	374		
<u>Perpétua</u>	37	55	194	200	274	95	57	130	197	279	96	53	120	201	248	-	-	-	-	-	228	55	444	198	901		
<u>Cordão-de-frade</u>	11	50	75	200	91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	50	75	200	91		
TOTAL	809	54	2244	199	3583	805	55	1211	199	2349	481	54	1198	198	1903	68	54	201	201	445	2163	54	4534	199	8280		

n<sub>1</sub> - nº de partículas nas classes 25 a 75 µm inclusives; n<sub>2</sub> - idem, nas classes 175 a 225 µm; N - nº total de partículas medidas.  
 CM<sub>1</sub> e CM<sub>2</sub> - respectivamente comprimento normal das partículas curtas e longas, em µm.

Quadro 3. Comprimento normal das partículas do VAP. A - Em preparações feitas pelo método do "dipping" convencional versus "dipping" contrastação negativa; B - Medição comparativa das partículas do VAP e do VMCF.

Vírus e/ou tratamento	$n_1$	$CN_1$	$n_2$	$CN_2$	$nq$
A. Isolado São Carlos do Vap, fumo					
"dipping" convencional	40	52	40	200	116
"dipping" contrastação negativa	64	52	109	199	233
B. Isolado São Carlos do VAP, fumo ("dipping" convencional)	83	53	237	200	342
VMCF, fumo (idem)	-	-	235 <sup>(1)</sup>	301	344

$n_1$  - nº de partículas nas classes 25 a 75 $\mu$ m inclusives;  $n_2$ , idem, nas classes 175 a 225 $\mu$ m; N - nº total de partículas medidas;  $CN_1$  e  $CN_2$  - respectivamente, comprimento normal das partículas curtas e longas, em  $\mu$ m.

(1) nº de partículas nas classes 250 a 350 $\mu$ m inclusives.

.....

Quadro 4. Comprimento normal das partículas do VAP (isolado São Carlos, em fumo) em preparações purificadas antes e depois de serem ultracentrifugadas - em gradiente de densidade.

Tratamento	$n_1$	$CN_1$ ( $\mu$ m)	$n_2$	$CN_2$ ( $\mu$ m)	N
Antes da ultracentrifugação em gradiente de densidade (UCGD)	185	52	69	201	284
Camada de topo, após 1 ciclo de UCGD	197	51	15	198	270
Idem, após 2 ciclos	214	52	5	195	220
Camada do fundo, após 1 ciclo de UCGD	164	53	228	201	431
Idem, após 2 ciclos	77	56	534	198	712

$n_1$  - nº de partículas nas classes 25 a 75 $\mu$ m inclusives;  $n_2$  - idem, nas classes 175 a 225 $\mu$ m; N - nº total de partículas medidas;  $CN_1$  e  $CN_2$  - respectivamente comprimento normal das partículas curtas e longas, em  $\mu$ m.



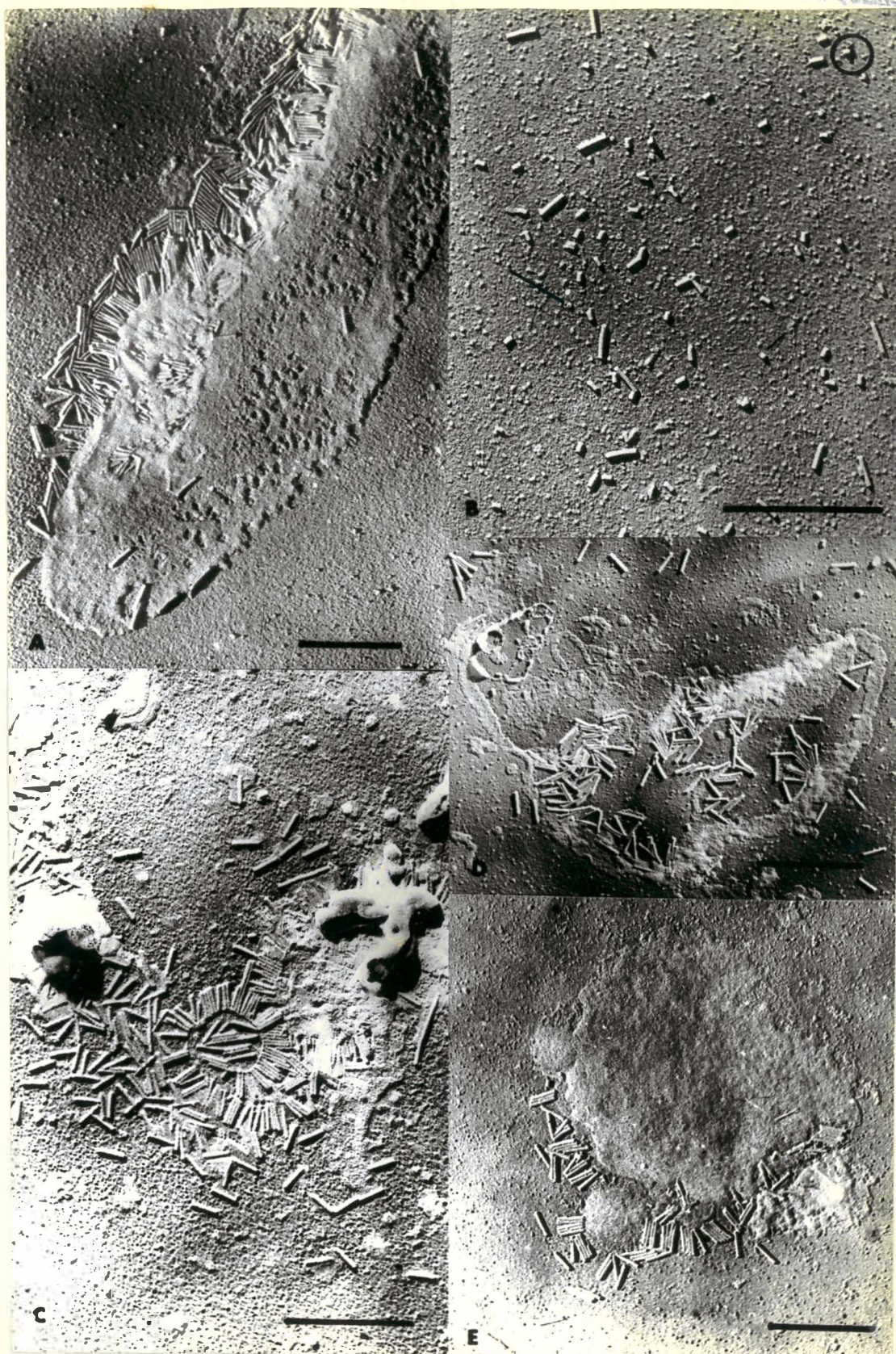


Figura 1. Micrografias electrônicas de preparações feitas pelo método do "dipping", respectivamente das seguintes plantas infetadas pelo VAP; A - *Emilia*; B - *Chenopodium quinoa*; C - *C. rurale*; D - *Nicotiana glutinosa*; E - *Picão*. Notar nas figuras A, C e E a associação de partículas dispostas regularmente com uma estrutura, possivelmente mitocondrio. Em B, algumas partículas ficaram de topo, mostrando indícios do canal axial (seta). Nesta e em outras figuras, quando não assinalada, a escala de cada micrografia representa 1  $\mu$ .



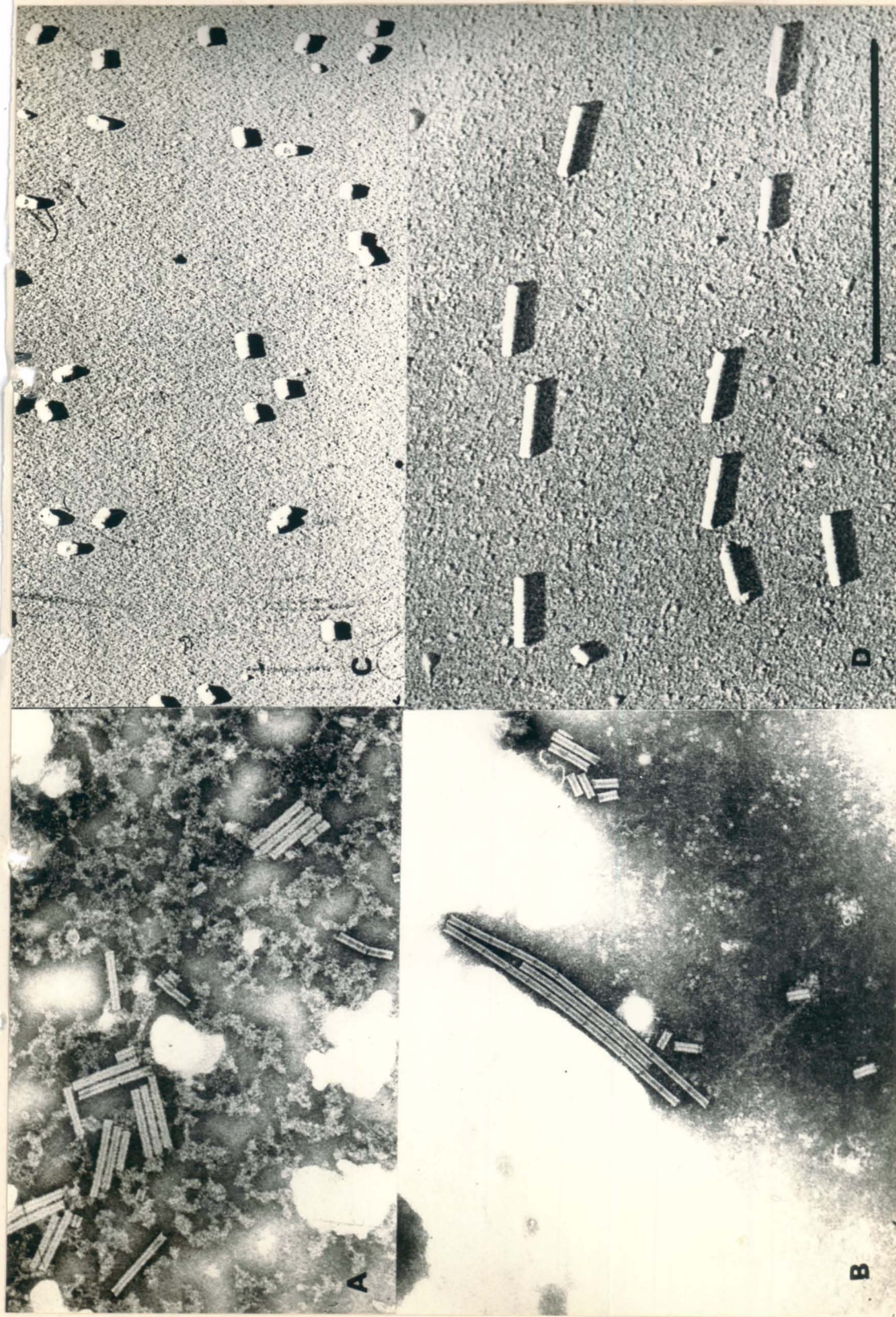


Figura 2. A e B. Preparações feitas pelo método do "dipping", contrastadas negativamente, de pimenteir e fumo, respectivamente. Em B aparentemente houve uma agregação terminal de partículas curtas; - C e D. Preparações purificadas do VAP, em que as partículas curtas (C), foram separadas das longas (D) por ultracentrifugação em gradiente de densidade.

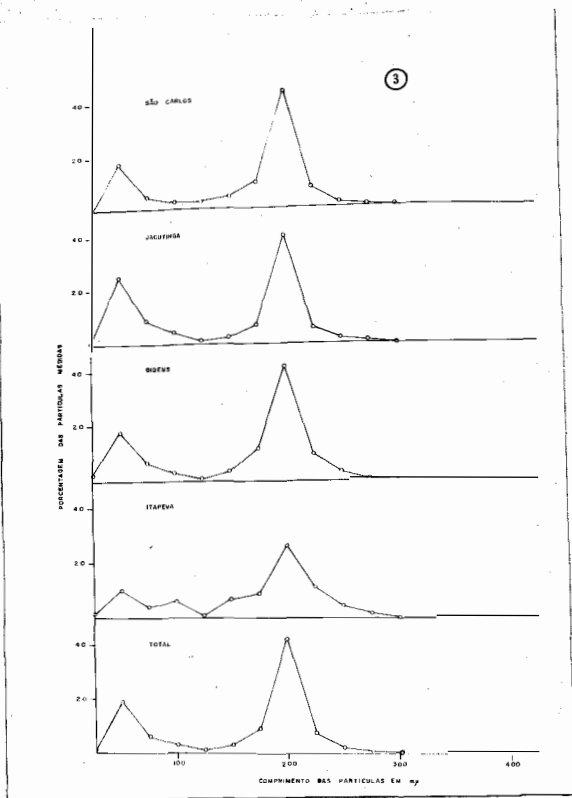


Figura 3. Curva de distribuição dos comprimentos das partículas de diferentes isolados do VAP. Preparações feitas pelo método do "dipping" convencional ou combinadas com contrastação negativa.

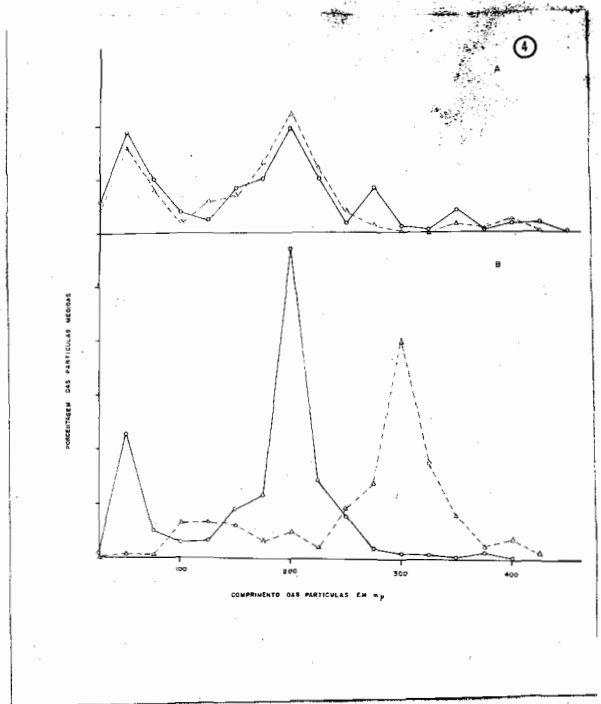


Figura 4. A- Curva de distribuição dos comprimentos das partículas do isolado São Carlos do VAP, em preparações feitas pelo método do "dipping" convencional (o---o) ou combinado com contrastação negativa ( $\Delta$ --- $\Delta$ ); B- idem, das partículas do isolado São Carlos do VAP (o---o) e do VMCF ( $\Delta$ --- $\Delta$ ), obtidas de plantas de fumo, e medidas em condições comparativas.

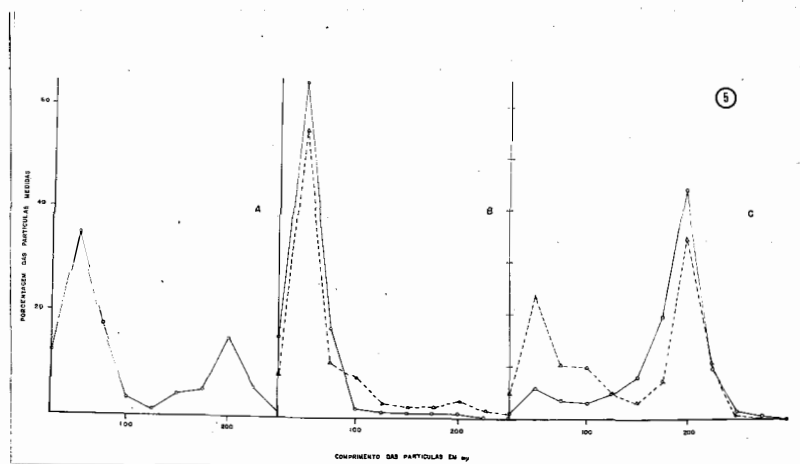


Figura 5. Curva de distribuição dos comprimentos das partículas do VAP, em preparações purificadas, antes (A) e depois (B,C) de serem ultracentrifugadas em gradiente de densidade. B- distribuição dos comprimentos das partículas na camada de topo e C- na de fundo (o---o com 2 ciclos, e  $\Delta$ --- $\Delta$ , com 1 ciclo de ultracentrifugação em gradiente de densidade).

A proporção entre partículas longas e curtas, nas preparações rápidas, variava de um valor pouco inferior à unidade, até cerca de 20 longas para 1 curta, tendo sido em média 2,5 (Quadro 2). Deve-se contudo mencionar que para obtenção das micrografias eletrônicas, para economia de tempo e material, selecionava-se áreas em que a concentração das partículas longas era maior que a usual (cerca de 20 ou mais partículas longas - por fotografia, a uma magnificação de 5.000x).

Em algumas preparações rápidas, observaram-se grupos de partículas longas, dispostas mais ou menos ordenadamente ao redor de remanescentes - de uma estrutura celular, provavelmente mitocôndrios (Fig. 1 A,C,E).

Em preparações purificadas do VAP houve também a predominância dos dois tipos de partículas quanto ao comprimento (Fig. 6 A); as quais formavam uma curva de distribuição tipicamente bimodal, não tendo sido os valores dos CN determinados, diferentes daqueles obtidos em preparações - rápidas (Fig. 5 A - Quadro 4). Nestas preparações houve contudo a prevalência das partículas curtas sobre as longas (Fig. 5 A).

A ultracentrifugação das preparações purificadas do VAP em gradiente de densidade, produz duas camadas distintas (Silva, 1965; Oliveira, - dados não publicados). Uma mais próxima ao menisco, denominada de tampo, contendo predominantemente partículas curtas (Figs. 2C; 5B; 6B - Quadro 4). A outra mais abaixo, chamada de fundo, constituía-se quase que exclusivamente de partículas longas (Figs. 2D; 5C; 6C - Quadro 4). Usualmente a contaminação da camada de fundo pelas partículas curtas foi maior que a da camada de tampo, pelas longas (Fig. 5B,C). Com um ciclo adicional de ultracentrifugação em gradiente de densidade (Oliveira, dados não publicados) esta mistura diminuiu consideravelmente (Quadro 4 - Fig. 5B,C), e que em relação à camada de tampo, podia ser avaliada pela eliminação praticamente total, de sua infetividade.



Ultraestrutura das partículas do VAP, em preparações contrastadas negativa ou positivamente

O exame de preparações altamente purificadas e infetivas, do VAP, contrastadas negativa ou positivamente, revelaram certos detalhes estruturais das partículas deste vírus (Fig. 6A-D).

Do ponto de vista estrutural, não houve diferenças entre as partículas curtas e longas, exceto obviamente no comprimento. Ambas são tubulares, com diâmetro externo ao redor de 25  $\mu$ . O canal axial era claramente visível nas preparações contrastadas negativamente, quando fragmentos anelares ficavam de t $\hat{o}$ po. Aliás, nestas condições mesmo em preparações metalizadas, percebia-se indícios do orifício central (Fig. 1B). Este canal central media c $\hat{e}$ rca de 4  $\mu$  de largura, mas usualmente não era uniforme em diâmetro ao longo da partícula, ora dilatando, ora estreitando.

Mesmo em preparações altamente contrastadas negativa ou positivamente, não se pôde perceber indícios de subunidades morfológicas (capsômeros) bem individualizadas na superfície da partícula. Ocasionalmente a coloração com acetato de uranila mostrava bandas transversais, espaçadas de 30-40  $\text{Å}$ , ao longo das partículas (Fig. 6D).

As extremidades das partículas usualmente não eram iguais, sendo uma delas ligeiramente convexa, e a outra, c $\hat{o}$ ncava; nesta o canal axial comumente se alargava um pouco.

Coloração com acetato de lantânio ou ácido fosfomolibdico não deu resultados satisfatórios, e não trouxe informações adicionais.

Efeito do tratamento enzimático

A incubação de preparações purificadas do VAP, com tripsina e/ou RNase, a 37°C/1 hora, não afetou sensivelmente a infetividade deste vírus e tão pouco a estrutura de suas partículas. Contudo, em 3 das 5 experiências realizadas, notou-se efeito da tripsina, traduzido pela agregação terminal das partículas. Esta agregação verificava-se nas preparações contendo partículas curtas ou longas (Figs. 7A, F; 8A, B). Testes mostraram que a tripsinização das preparações contendo partículas curtas somente, não infetivas, não as tornou capazes de iniciar infecção.



EIVK

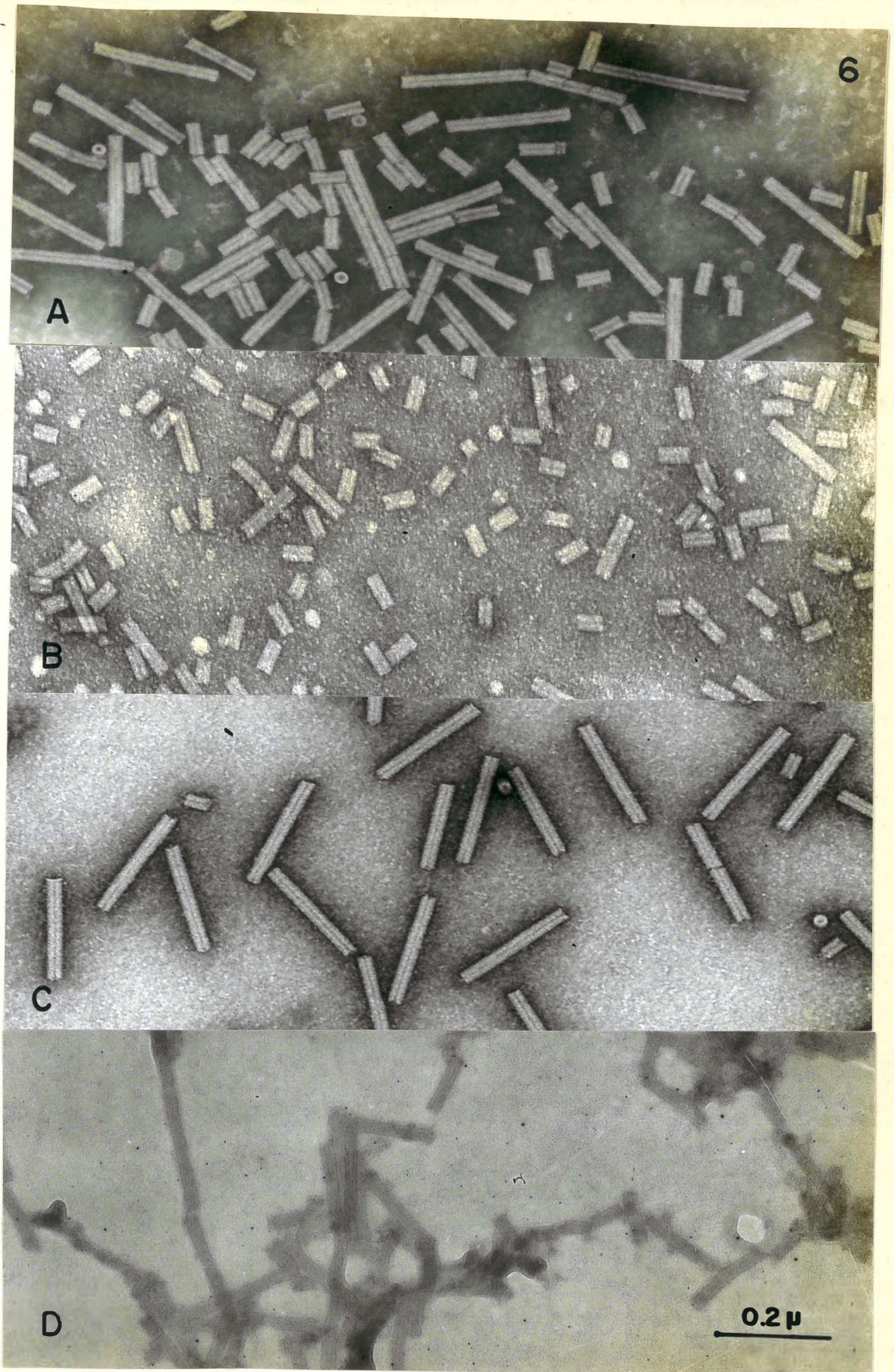


Figura 6. Preparação purificada do VAP contrastada negativamente antes (A) e depois (B e C) da ultracentrifugação em gradiente de densidade. Em B, amostra da camada de topo, constituída predominantemente de partículas curtas, e C, da camada do fundo, compostas quase que exclusivamente de partículas longas. D, Preparação purificada do VAP, contrastada positivamente com acetato de uranila.



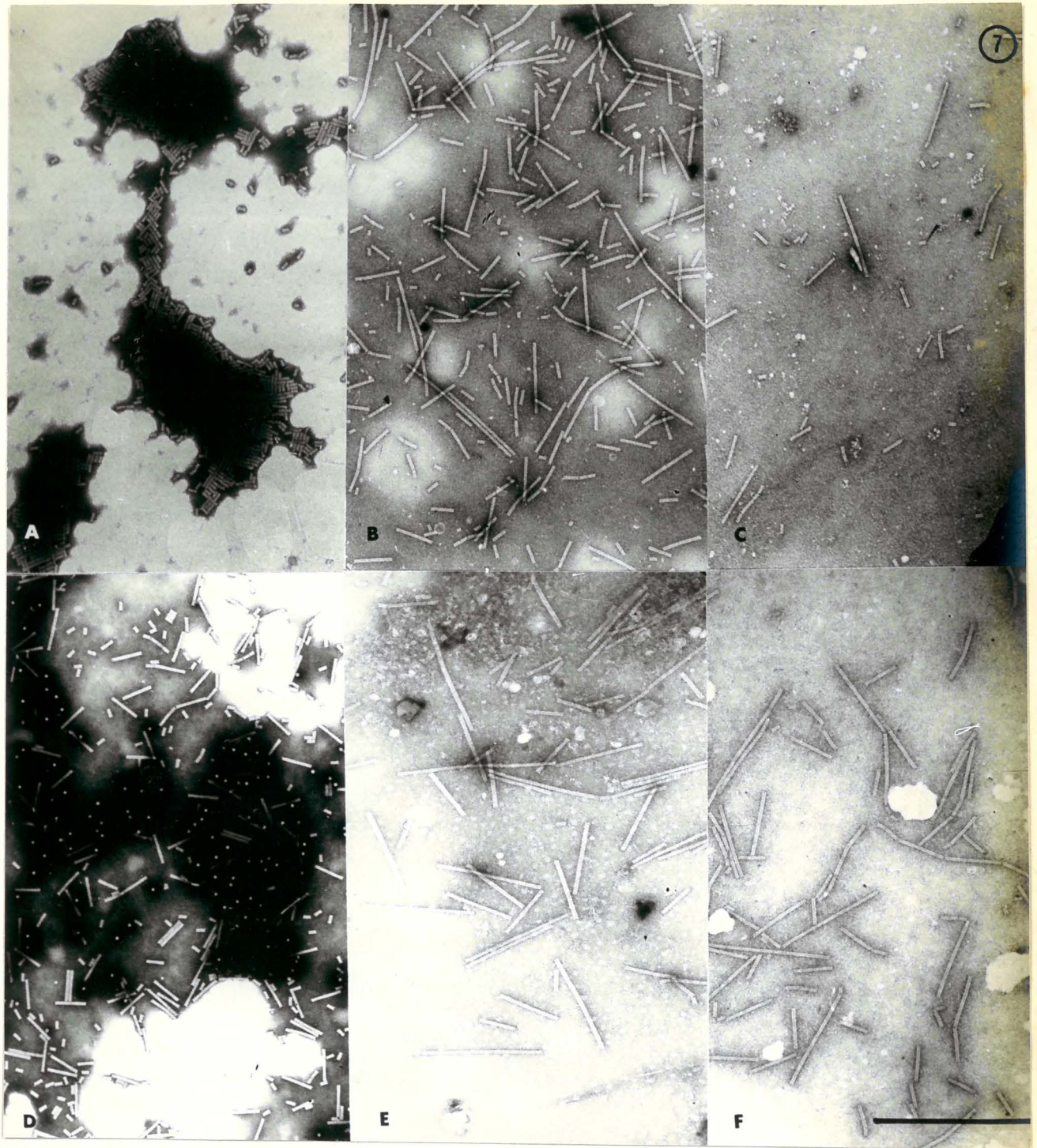


Figura 7. Preparações purificadas contendo partículas curtas (A) ou longas (D), incubadas com tripsina, com (C, F) ou sem (B, E) RNase. Observa-se claramente a ocorrência de uma intensa agregação terminal, tanto das partículas curtas (B, C) como das longas (E, F).

EWK

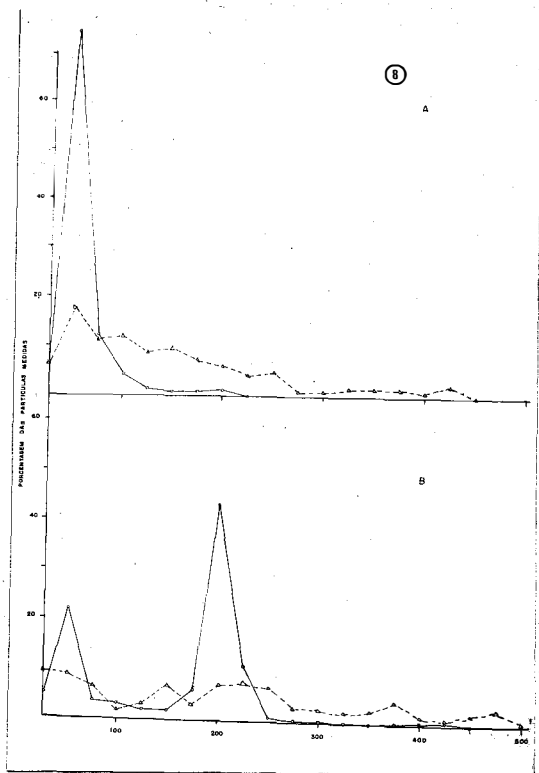


Figura 8. Curva de distribuição dos comprimentos das partículas da camada de topo (A) e do fundo (B), tratadas (▲—▲) ou não (○—○) com tripsina (a ordenada representa o comprimento das partículas em  $\mu$ )

### Efeito do tratamento térmico

Testes realizados com amostras do tratamento térmico das preparações purificadas e infetivas do IAP mostraram que um aquecimento à temperatura constante até  $60-65^{\circ}\text{C}/10'$  não afetava marcadamente a infetividade. A  $80^{\circ}\text{C}/10'$  esta caía bastante, desaparecendo literalmente a  $75^{\circ}\text{C}$ .

O exame de amostras de preparações contendo partículas curtas somente, revelaram que a  $60^{\circ}\text{C}/10'$  já havia um início de decomposição das partículas, que se acentua a  $65^{\circ}\text{C}/10'$ , e a  $70^{\circ}\text{C}/10'$ , estas praticamente desaparecem (Fig. 9A - C).

Quanto às partículas longas, elas começam a se degradar quando aquecidas a  $65^{\circ}\text{C}/10'$ , acentuando esta decomposição até  $80^{\circ}\text{C}$ . A temperaturas superiores as partículas decompõe-se totalmente (Fig. 9D -H).

A degradação térmica das partículas caracterizava-se pela sua transformação em um material pulverulento, constituído de grânulos de 30-40  $\mu$  de diâmetro. No início da decomposição, em geral apareciam numerosas partículas semi-degradadas, aglutinadas pelo material decomposto, formando massas que lembravam precipitados serológicos. A proporção das partículas mantendo integridade estrutural nestas massas diminuía à medida que a tem-



EW

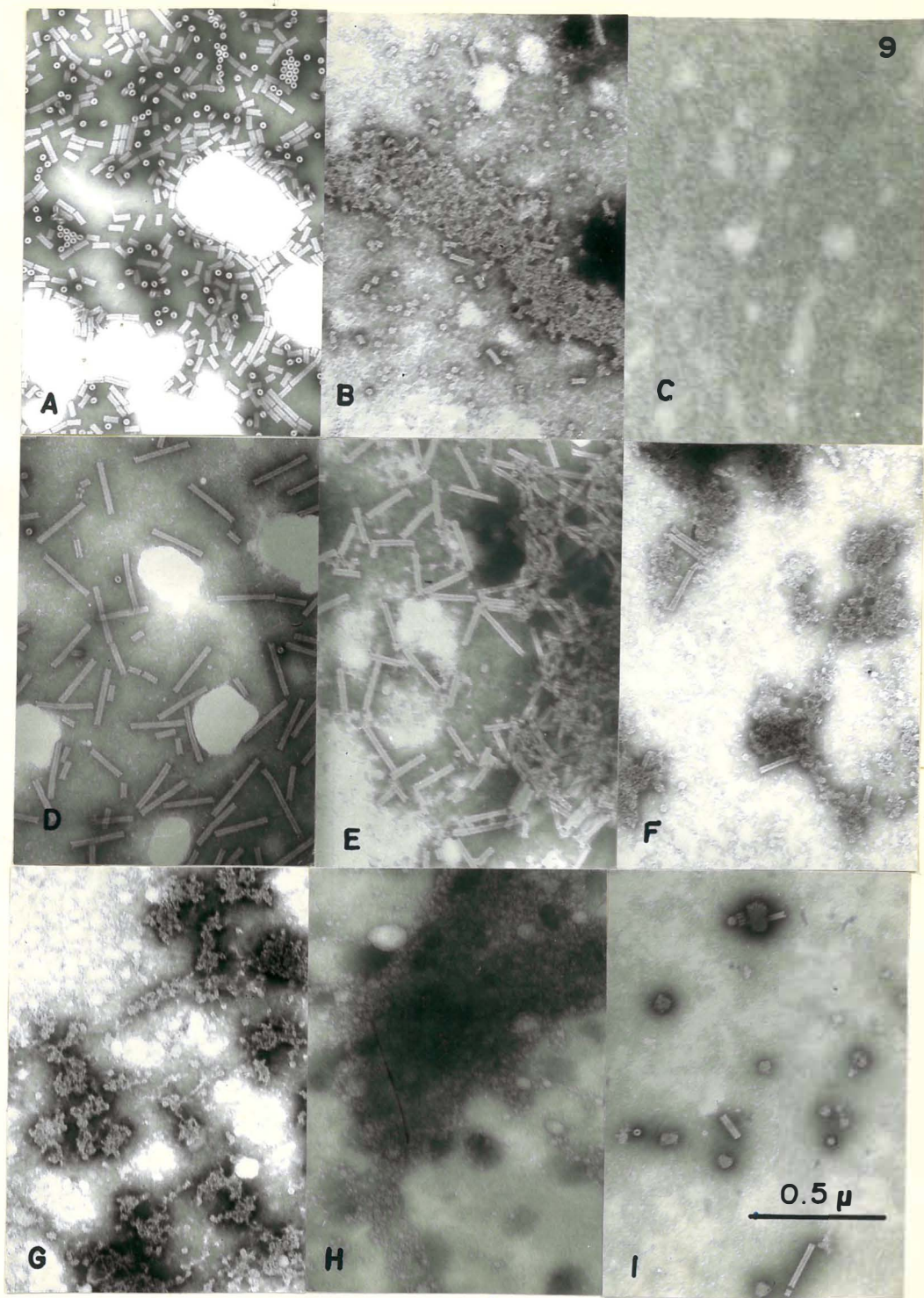


Figura 9. Efeito do tratamento térmico sobre a estrutura das partículas do VAP. A-C. Respectivamente controle, tratamento a  $65^{\circ}\text{C}/10'$  e  $70^{\circ}\text{C}/10'$  da preparação contendo partículas curtas; D-H. Controle e tratamentos a  $65^{\circ}\text{C}/10'$ ,  $75^{\circ}\text{C}/10'$ ,  $80^{\circ}\text{C}/10'$  e  $90^{\circ}\text{C}/10'$  da preparação contendo partículas longas; I. Tratamento da preparação contendo partículas longas, suspensas em água destilada, a  $80^{\circ}\text{C}/10'$ .



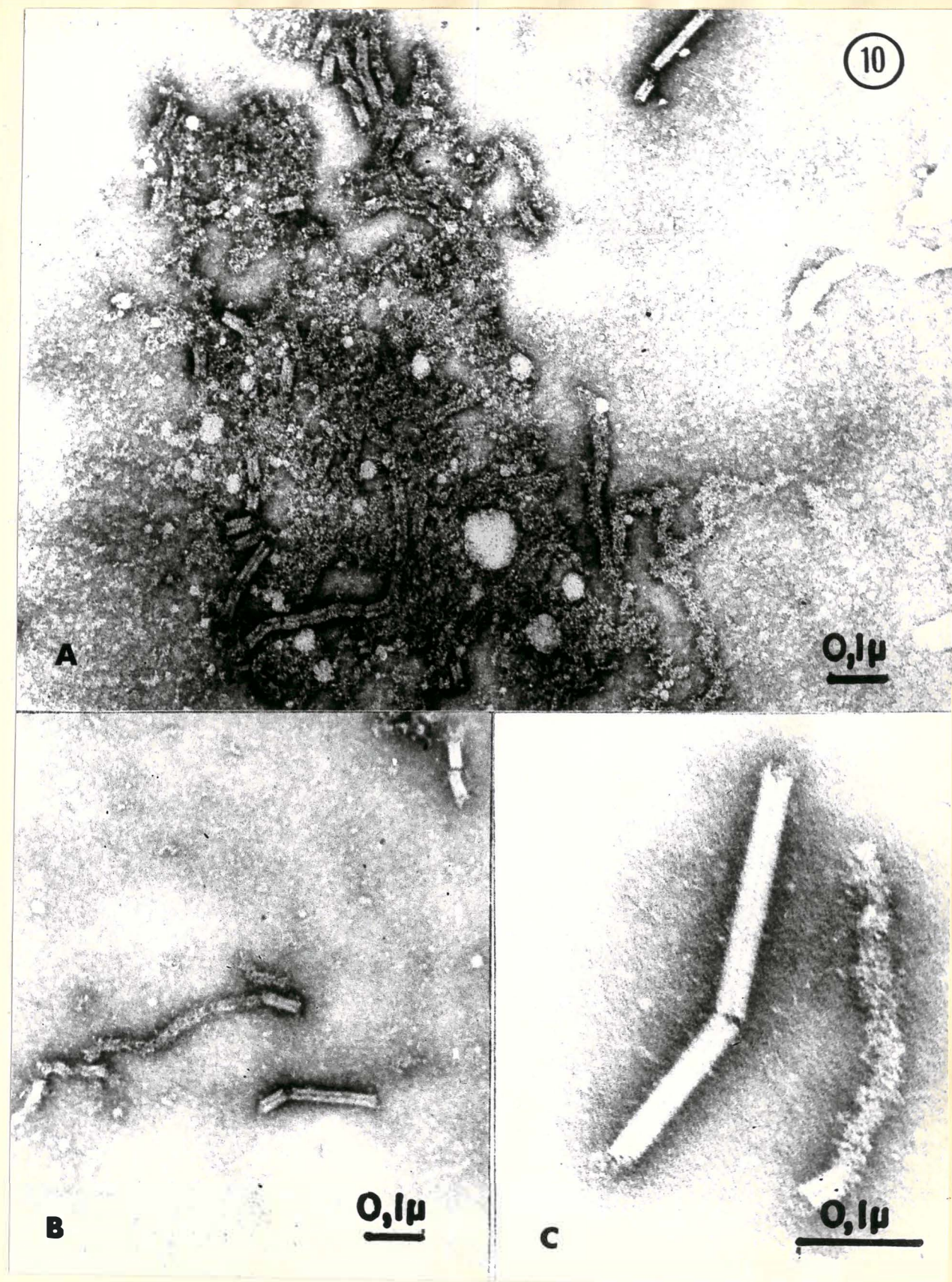


Figura 10. A-C. Detalhes de partículas do VAP, decompostas pela ação do calor (80°C/10'). As partículas acham-se total ou parcialmente transformadas em um material pulverulento, finamente granular de 30-40Å de diâmetro.

peratura aumentava. É provável que a reunião destas massas resultasse em certos grumos, visíveis macroscopicamente na suspensão aquecida a temperaturas superiores a 60-65°C/10', Também foi observada frequentemente, uma intensa fragmentação das partículas em pedaços mais curtos e mesmo anelares. Esta fragmentação era facilmente perceptível nas preparações, contendo partículas longas e se tornava bastante conspícua na faixa de 70-75°C/10'. Por outro lado, em muitos casos, partículas parcialmente degradadas, mas mantendo ainda a forma original, bem como uma certa intumescência de outras, resultantes do tratamento térmico, puderam ser notadas (Fig. 10 A-C).

Numa experiência, em que as partículas se achavam suspensas em água destilada, após o tratamento térmico (75-80°C/10'), o material decomposto não se dispersava (Fig. 9I), formando pequenas massas esferoidais. Isto usualmente não sucedia quando a suspensão do vírus era feita em solução tampão, como nos casos acima descritos, quando a porção decomposta se dispersava, ou fazia parte de agregados formados de partículas em diferentes graus de degradação.

#### Secções de sedimentos de preparações purificadas do VAP ultracentrifugadas

Preparações purificadas e infetivas do VAP, sedimentadas por ultracentrifugação, quando processadas como se fossem tecidos e examinadas ao microscópio electrónico, após serem seccionadas em fatias ultra-finas, mostraram ser constituídas unicamente de partículas tubulares de cerca de 20  $\mu$  de diâmetro, com um canal axial de aproximadamente 4-5  $\mu$  de largura (Fig. 12A, B). Estas mesmas preparações quando examinadas antes de serem processadas "histològicamente", indicaram conter somente partículas curtas e longas, componentes usuais das preparações purificadas do VAP.

Embora sedimentadas a cerca de 100.000g, as partículas não se achavam tão compactadas, raramente tocando-se lateralmente. Todavia, verificou-se que agregação terminal das partículas ocorreu com certa frequência.

Exames cuidados de secções transversais das partículas mostraram a existência de uma zona densa, de aproximadamente 20  $\mu$  de espessura, margeando o canal axial (Fig. 12B) e que se tornava particularmente conspícua, quando a secção era corada com acetato de uranila.

b. Observações histológicas em plantas infetadas pelo VAP

Inclusões citoplasmáticas de partículas do VAP

A presença de inclusões citoplasmáticas características foi notada consistentemente no exame de mais de 2.000 secções ultra-finas de diversos tecidos, de 9 espécies diferentes de plantas, infetadas por qualquer um dos 4 isolados do VAP (Figs. 12-22), mas não nos tecidos de plantas controles, não inoculadas (Fig. 11).

Estas inclusões constituíam-se unicamente de partículas alongadas e tubulares de morfologia similar àquelas observadas em secções de preparações purificadas e infetivas, descritas no capítulo anterior.

As partículas componentes destas inclusões apresentavam-se com um comprimento uniforme, e formavam arranjos mais ou menos ordenados, dispondo-se lado a lado e numa camada única. Seu comprimento era de cerca de 200  $\mu$  em quase todas as inclusões, ocorrendo esporadicamente inclusões constituídas aparentemente de partículas mais curtas de 50-100  $\mu$  de comprimento (Fig. 15E). Estas, todavia, foram interpretadas como secções tangenciais ou oblíquas de grupos de partículas longas. Secções transversais das partículas formando inclusões foram raramente vistas (Figs. 12C, E; 13G; 15B). Nestas pode-se notar claramente a natureza tubular das partículas, e também que seu arranjo apesar de ordenado, não atingia a regularidade de um cristal.

Não se fez uma determinação da distribuição dos comprimentos das partículas que formavam as inclusões, pois elas eram bastante uniformes e de cerca de 200  $\mu$ . Quando todavia, as inclusões se desorganizavam, como será mencionado adiante, as partículas perdiam a uniformidade, aparecendo elas com comprimentos inferiores a 200  $\mu$  (Fig. 22A). Entretanto nestas circunstâncias, a determinação de seu comprimento era bastante dificultada pelo fato de as partículas nem sempre estarem com seu eixo maior no mesmo plano da secção, e portanto sua distribuição também não foi determinada.

Não se observou qualquer variação na aparência geral das inclusões, atribuíveis às diferenças de isolado, dos tecidos e das plantas hospedeiras, ou dos métodos empregados na fixação. Cumpre mencionar apenas que, a fixação com o  $\text{KMnO}_4$ , nas condições empregadas neste trabalho (0,6-2% em so





**Figuras 11 a 21.** Micrografias eletrônicas de seções de tecidos infetados pelo VAP. Chave para abreviações: a- grão de amido; c- cromossomo; d- inclusões densas; e- retículo endoplasmático; f-fuso mitótico; g- estrutura de Golgi; ic- inclusões cristalinas; if- inclusões fibrilares; iy- inclusões associadas a infecção com vírus do grupo do Y da batata; l- grãos de lipíde; m- mitocôndrio; n- nucleio; ni- involucro nuclear; nu- nucleolo; p- proplastídeo ou cloroplasto; pc- parede celular; T- vaso lenhoso; TM- estrutura possivelmente secretora, em *Bidens*; v- partículas ou inclusão do VAP; vc- vacuolo; VC- vaso crivado.

**Figura 11.** A-C. Detalhes de células, particularmente de mitocôndrios, de plantas sadias (A- fumo; B- pimenta; C- picão); D-G. Detalhes do tecido foliar do picão. D- Aspecto geral de uma estrutura possivelmente secretora; E- Região vascular, mostrando vasos crivados e células companheiras com parede celular reforçada (setas); F- - Inclusões cristalinas que ocorrem em células normais.



EWK

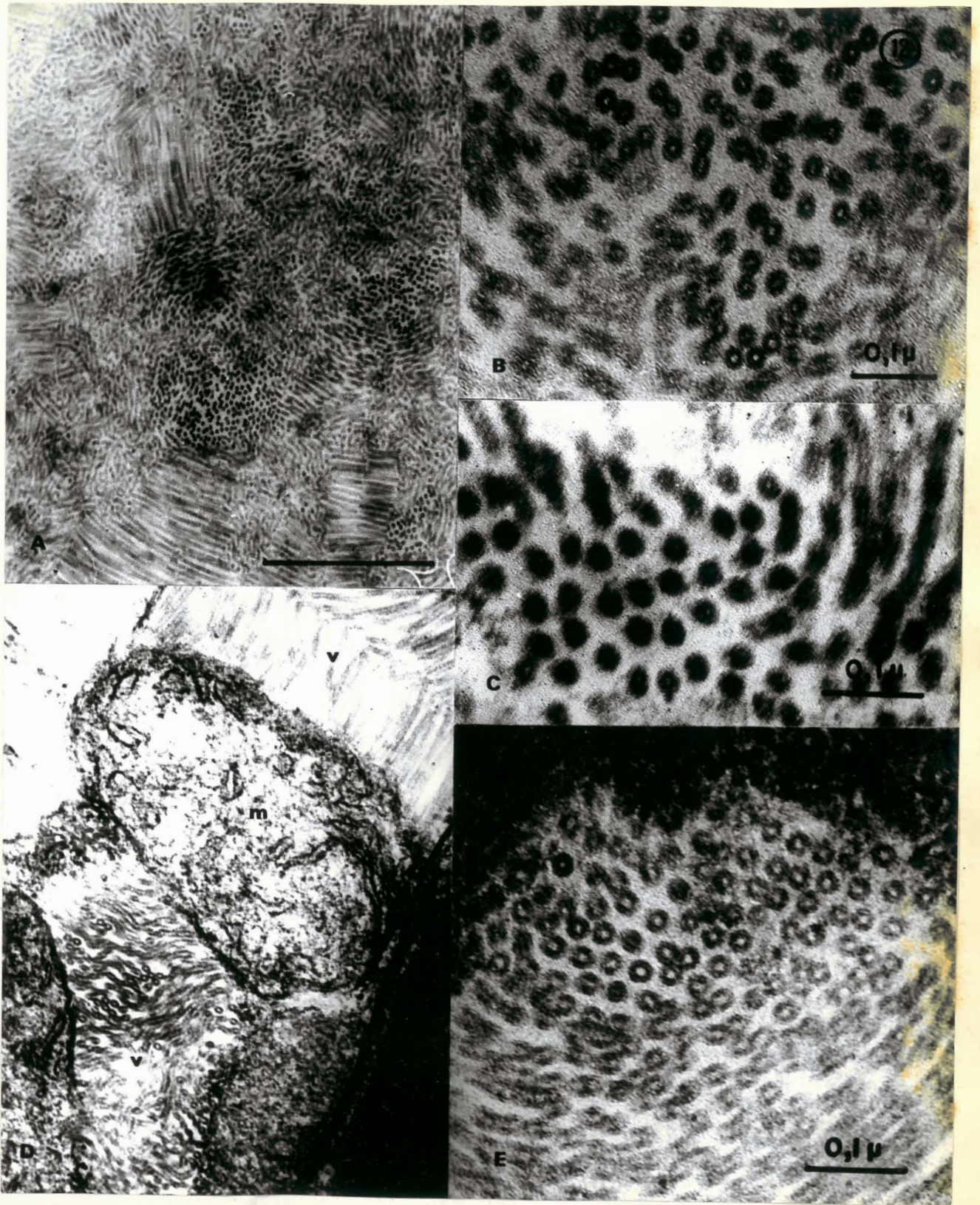


Figura 12. A e B. Secções de sedimentos de preparações purificadas e infectivas do VAP, obtidos por ultracentrifugação; C-E. Inclusões citoplasmáticas formadas de partículas alongadas em células de picão - (C), Chenopodium amaranticolor (D) e Nicotiana glutinosa (E). Notar a semelhança das partículas observadas em A e B, com aquelas presentes nas fotos C-E. As partículas revelam claramente sua natureza tubular. Em algumas micrografias pode-se perceber um anel denso, margeando o canal axial.

lução tampão 0,2M, 5-60', à temperatura ambiente), destruía as inclusões, a julgar pela sua ausência em tecidos de plantas infetadas e fixadas com esta substância.

#### Associação das inclusões do VAP com mitocôndrios

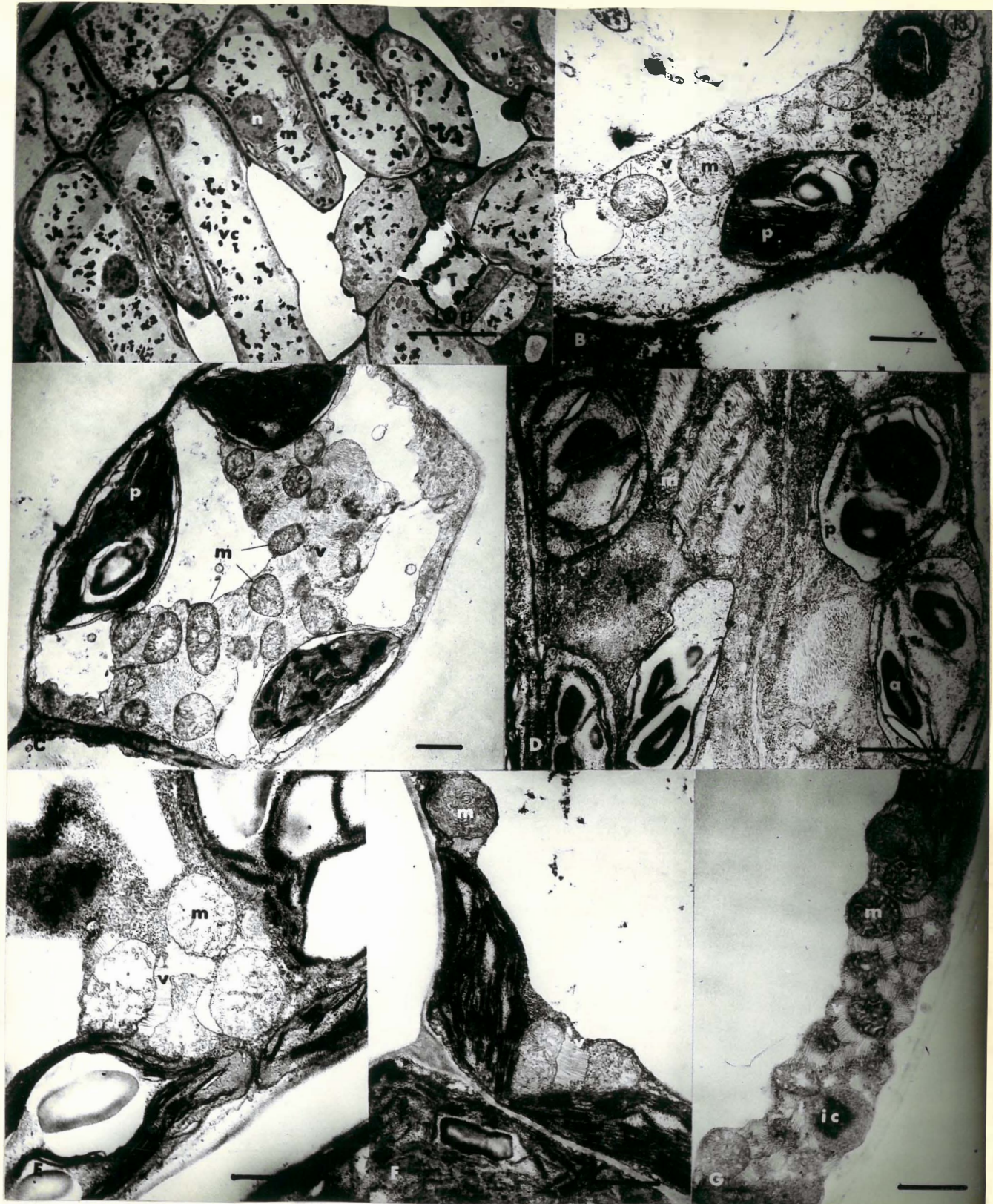
Uma associação constante das inclusões do VAP acima descritas, com mitocôndrios foi também notada (Figs. 12 - 22). As partículas do VAP agregadas ordenadamente dispunham-se ao seu lado de tal modo que o eixo maior das partículas ficava perpendicularmente ou ligeiramente inclinado à superfície lateral deste orgânulo celular. Não foram observadas partículas associadas às extremidades dos mitocôndrios. Em várias ocasiões encontraram-se mitocôndrios dispostos regularmente, lado a lado, separados uns dos outros pelas inclusões (Figs. 14B; 15A, G; 18B; 20C; 21D).

Em nenhum caso encontraram-se partículas no interior do mitocôndrio, ou associadas a outras estruturas celulares. Por outro lado a quantidade de mitocôndrios em células infetadas parecia ser maior do que nas células de plantas sadias.

Apesar de não ser **radical** notou-se uma certa alteração na ultraestrutura dos mitocôndrios de plantas infetadas, associados ou não às inclusões, em relação aos de plantas sadias (Fig. 11A, C). Houve assim um certo aumento no número de grânulos densos, intramitochondriais e um sensível desenvolvimento das cristas intramitochondriais. Isto foi particularmente **conspicuo** na região central do mitocôndrio, onde as cristas formavam dobras sinuosas e abauladas, as quais em certas secções apareciam como um anel concêntrico, muito característico (Figs. 13E; 14A; 15C, E). Não se pôde por outro lado, verificar possíveis fases anteriores à agregação de partículas junto aos mitocôndrios. Apenas em um caso, numa célula do parênquima do floema de fôlha de tomateiro, infetada pelo isolado Itapeva, elementos do retículo endoplasmático dispunham-se perpendicularmente à superfície do mitocôndrio. **Partículas do VAP**, também orientadas perpendicularmente ao mesmo, apareciam entre aqueles elementos do retículo endoplasmático (Fig. 19A).



ENK



**Figura 13.** Aspecto geral de células de diversas plantas infetadas pelo VAP. A- Micrografia a baixo aumento, de tecido foliar de pimentão, mostrando parte da epiderme, parênquima paliçádico e região vascular; B- Parte de célula de fôlha cotiledonar de pimenta; C- Célula do parênquima lacunoso de fôlha de *Chenopodium amaranticolor*; D e E- Parte do parênquima paliçádico de fôlhas de maria pretinha, infetada sistemicamente pelo VAP; F- Parte de uma célula do parênquima lacunoso, da zona verde, de uma fôlha de picão com sintomas de mosaico; G- Parte de uma célula do parênquima lacunoso de fumo, fixado com glutaraldeído.





**Figura 14.** A - Parte de uma célula do parênquima lacunoso de folha de pimentão, infetada pelo VAP. Em alguns mitocôndrios, as cristas têm conformação anelar; B - Vários mitocôndrios dispostos lado a lado, separados uns dos outros pelas inclusões do VAP, em um tricoma de Nicotiana glutinosa; C - Região vascular de folha de N. glutinosa e em D, detalhe de C. Notar a presença de partículas do VAP no interior do vaso crivado; E - Região vascular de folha de Chenopodium amaranticolor, mostrando também partículas no vaso crivado; F - Célula companheira do vaso crivado, em folha de pimenteira, ostentando inclusões do VAP associadas a mitocôndrios.



EWK

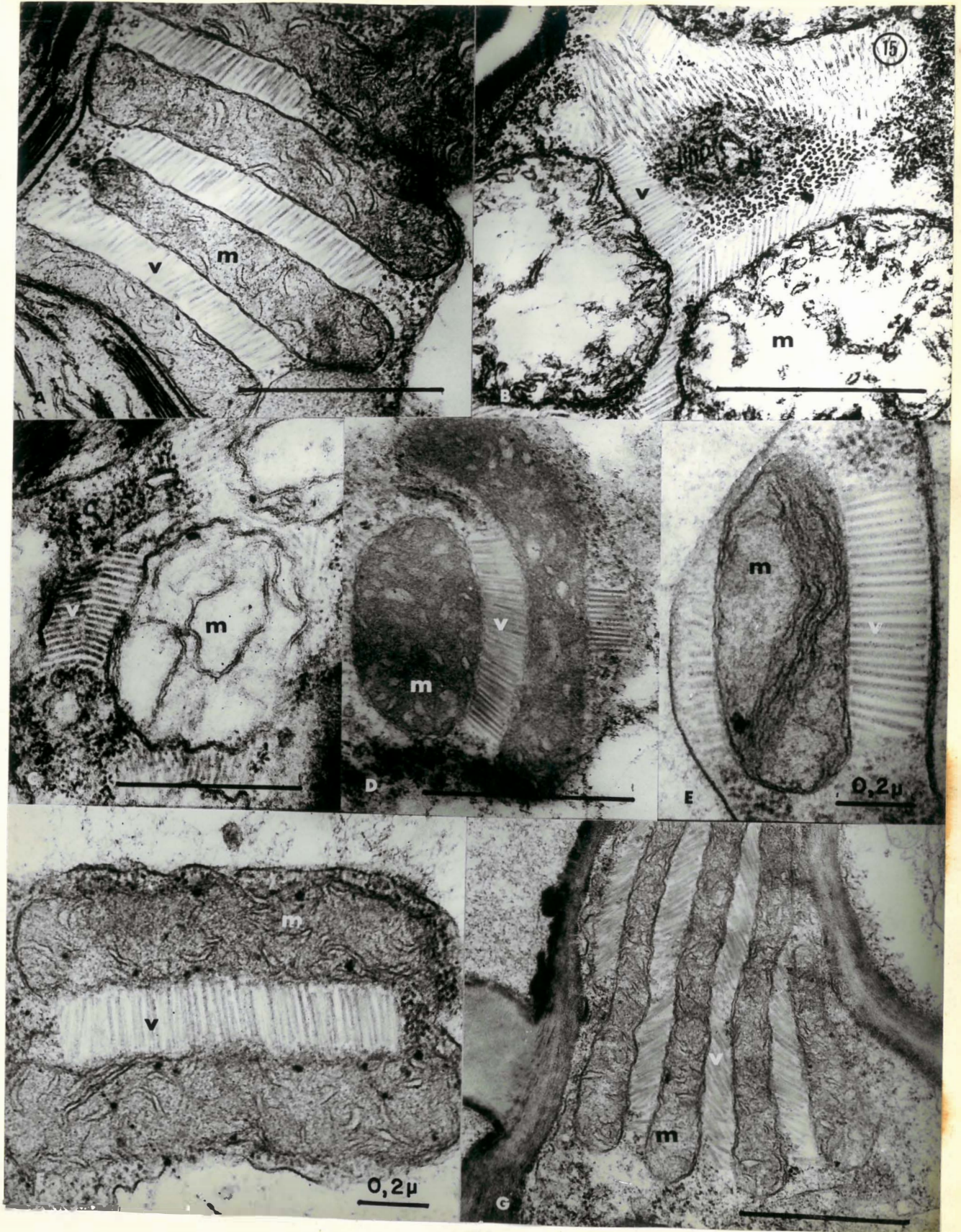


Figura 15. Detalhes da associação da inclusão do VAP com mitocôndrio, em folhas das seguintes plantas, infetadas pelo referido vírus: A - picão; B - *Nicotiana glutinosa*; C - fumo; D - picão (fixado em aldeído glutarico); E - pimentão; F - pimenteira; G - *Chenopodium amaranticolor*. Observar a uniformidade das partículas nas inclusões, cujo comprimento é de cerca de 200mμ.



Estrutura do tecido foliar de plantas infetadas pelo VAP

Em folhas de plantas infetadas pelo VAP, tanto nas lesões locais como nas invasões sistêmicas, com ou sem manifestação de sintomas externos, as inclusões acima descritas foram consistentemente encontradas, com particular frequência nas células do parênquima lacunoso e paliádico. Com menor frequência, foram elas notadas no interior de células da epiderme, do tricoma (Fig. 14B), parênquima do xilema ou do floema, e nas células companheiras dos vasos crivados (Figs. 14C, F; 19A). Em raras ocasiões as inclusões ocorriam no interior dos vasos crivados (Fig. 14C, E), mas em nenhum caso, nos vasos lenhosos.

Folhas de picão possuem uma estrutura peculiar, possivelmente de natureza secretora formada por células características, mas de função ainda desconhecida (Kitajima, 1967), e mesmo em seu interior, as inclusões estiveram presentes, embora não induzisse aparentemente nenhuma alteração nelas (Fig. 18C, D).

As células infetadas, contendo as inclusões, em muitos casos apresentavam-se normais, sem alterações profundas, exceto aquelas mencionadas com relação aos mitocôndrios. Em determinada combinação vírus-planta hospedeira em que resulta sintomas do tipo mosaico (isolado Bidens em picão; quase todos os isolados em maria preta, fumo, Nicotiana glutinosa e tomateiro) sob determinadas condições (Costa et al., dados não publicados), as inclusões foram encontradas tanto em zonas verdes como amarelas (figs. 13F; 19C). Contudo, nestas os cloroplastos apareciam modificados, com o sistema lamelar desorganizado e o estroma menos denso. Sua forma tornava-se mais afilada que a usual, e das extremidades saíam projeções amebóides que se estendiam a distâncias relativamente longas ou formavam bolsas - abarcando pequenas áreas do citoplasma, muitas vezes contendo estruturas celulares e inclusões do VAP (Fig. 19C).

Em certas hospedeiras, além das reações necróticas locais, o VAP induz uma necrose sistêmica. Assim em fumo formam-se linhas necróticas paralelas às nervuras, enquanto em pimenta e pimentão há o aparecimento de anéis, muitas vezes concêntricos, e que deram o nome ao vírus (Costa et al., da

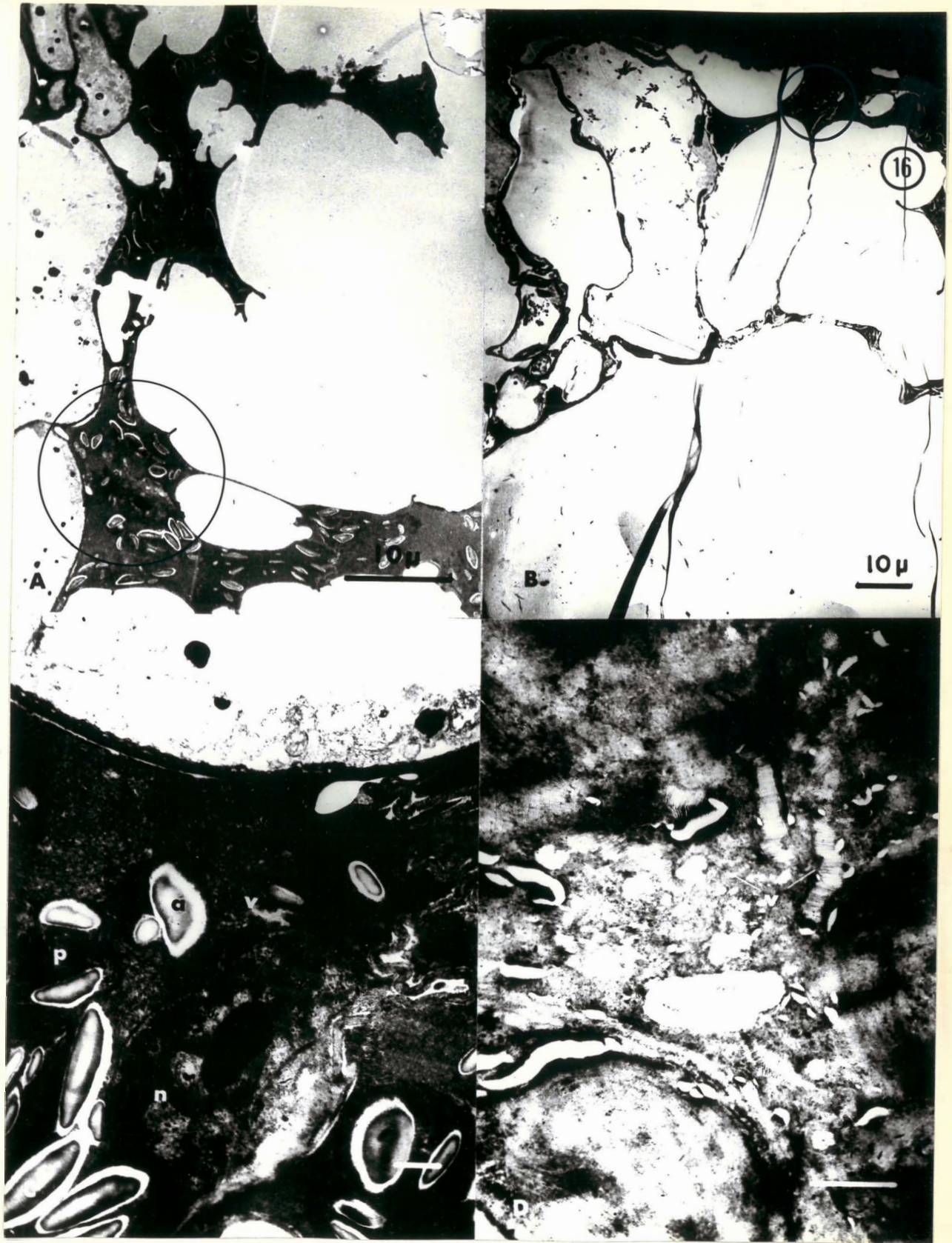
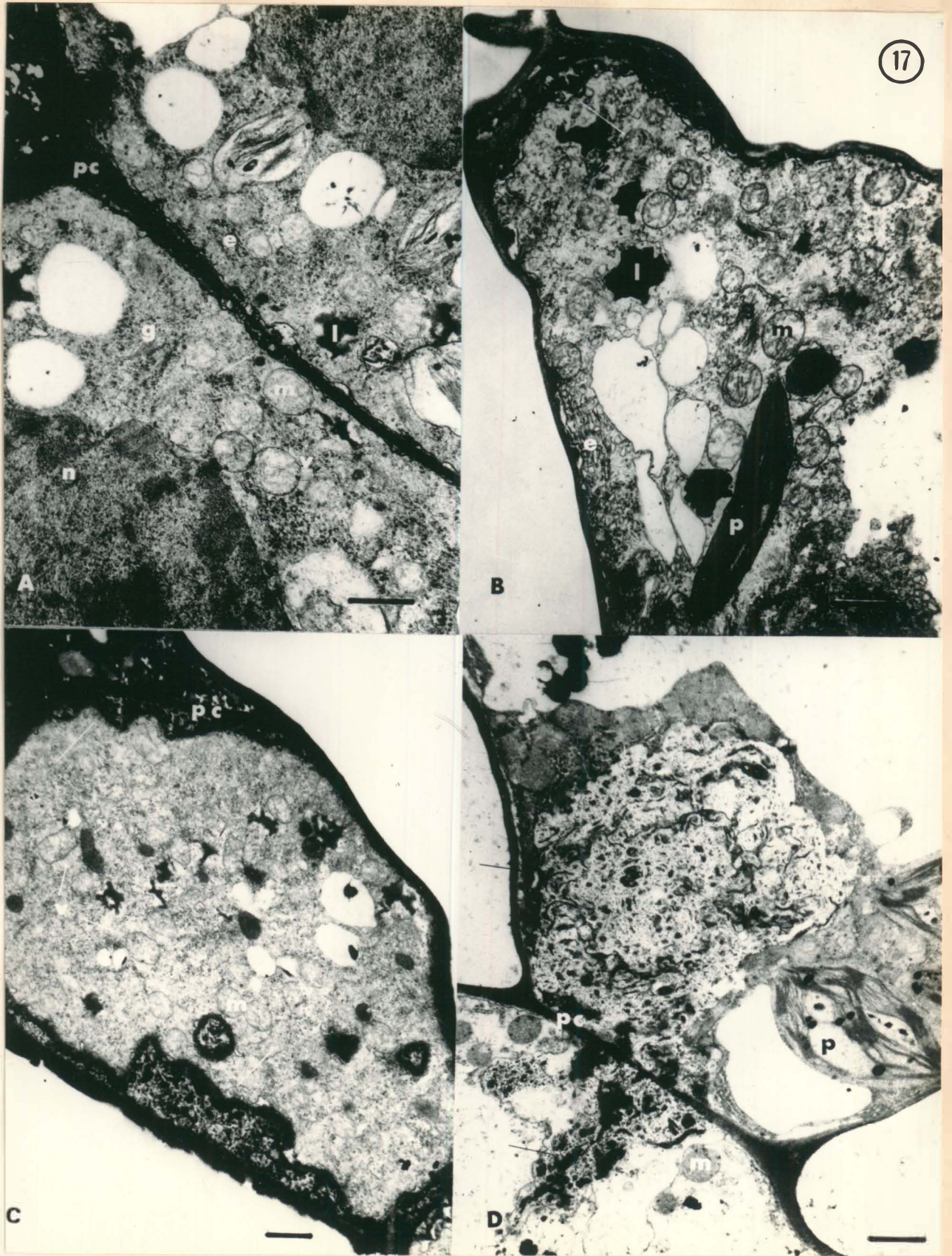


Figura 16. Aspecto geral e detalhes de tecidos necrosados de fôlhas de fumo (A,C) e pimentão (B,D). As áreas assinaladas nas figuras A e B, estão ampliadas em C e D, respectivamente. Apesar do adensamento geral da célula após sua necrose, as inclusões do VAP ainda são identificáveis.



EWK



**Figura 17.** Células, provavelmente em diferentes fases de processo necrótico em folhas de fumo (B) e pimentão (A,C,D). Notar certo adensamento das células, e o intumescimento de porções da parede celular (setas). Em B pode-se notar também a desagregação das inclusões do VAP.



dos não publicados). As secções destas linhas mostraram que elas se constituíam quase que unicamente de células necrosadas (Fig. 16A, D). Esta necrose atinge totalmente o parênquima paliádico e o lacunoso, o sistema vascular, se presente, e usualmente a epiderme, embora, em alguns casos, êste aparentemente se mantivesse vivo. As células necrosadas ficam completamente densas, com o volume bastante reduzido, e usualmente de forma estrelada, tocando-se nas pontas destas "estrelas". Em meio à célula adensada não se conseguia distinguir remanescentes de estruturas celulares, salvo grãos de amido, que formavam áreas elípticas claras, e inclusões do VAP (Fig. 16C, D). As células imediatamente adjacentes àquelas necrosadas, usualmente apareciam alteradas, com o citoplasma mais ralo, plastídios em degeneração, o retículo endoplasmático representado por pequenas vesículas, e inclusões do VAP, quando presentes achavam-se frequentemente em diferentes graus de desorganização. As partículas componentes das inclusões apareciam nos casos extremos, dispersas ao acaso no citoplasma, muitas delas tendo comprimento inferior a 200  $\mu$  (Fig. 19E).

Nessa necrose sistêmica, não se pôde estabelecer a sequência exata do processo que leva uma célula normal à morte. Contudo uma análise efetuada em um grande número de secções mostrou alguns indícios que permitem reconstituir fases dêste processo necrótico. Uma primeira alteração foi um adensamento geral do citoplasma e das estruturas nela presentes, de células infetadas. Êste adensamento parece decorrer de um aumento na quantidade de ribosoma e uma compactação geral das estruturas presentes no citoplasma. Em muitos casos notava-se um intumescimento da parede celular em diversos pontos, e que em alguns casos tornava-se bastante acentuado (Fig. 17A -D). A parte intumescida da parede celular apresentava-se com um material granular ou filamentososo, denso, separadas por áreas menos densas. Na sequência, a célula iniciava uma contração geral, acompanhada pela parede celular, exceto em alguns pontos que ficavam presas às células vizinhas, e que produziam o aspecto estrelado da célula necrosada. Nesta fase contudo, o intumescimento da parede celular não era perceptível, podendo talvez ter regredido. À medida que o adensamento prosseguia, o vacúolo tinha seu volume reduzido, muitas



Figura 18. A e B. Aspecto geral e detalhe de uma inflorescência anômala de origem genética, em tomateiro infetado pelo VAP; C e D. Detalhes de uma estrutura, possivelmente secretora, de folha de picão, invadida pelo VAP.



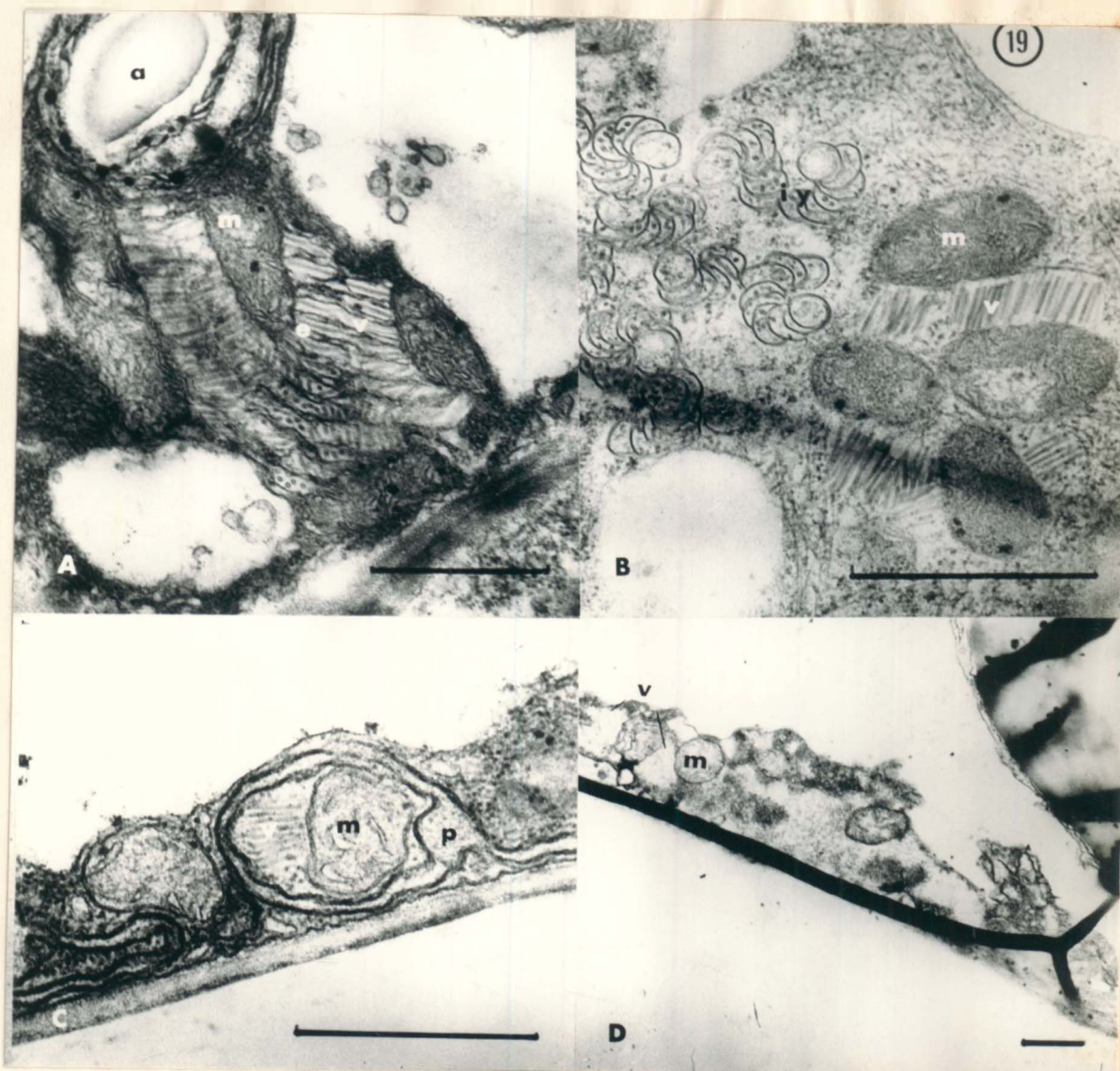


Figura 19. A- Detalhe de uma célula do parênquima do floema de tomateiro infetado pelo VAP. Elementos do retículo endoplasmático estão apostos perpendicularmente à superfície do mitocôndrio, estando as partículas do VAP entre eles; B- Célula de folha de pimentão, infetada simultaneamente pelos vírus Y da batata e VAP. Observar a presença de inclusões características a cada vírus numa mesma célula; C- Projeção amebóide do cloroplasto, em célula da zona amarelada de folha de pimentão, com sintomas de mosaico, contendo um mitocôndrio associado a inclusão do VAP; D- Célula do mesocarpo do fruto de tomateiro, infetado pelo VAP, contendo inclusões do VAP.

vêzes contendo um material finamente granular e denso. O núcleo era aparentemente a última estrutura a se adensar. Embora o processo deva ser drástico, os diversos orgânulos celulares mantêm sua estrutura geral, apenas se adensando.

As dificuldades encontradas em se prever antecipadamente o sítio onde a lesão local aparece nas folhas inoculadas mecânicamente, bem como a relativa rapidez com que as células se necrosam, não permitiram, no presente estudo comparar o processo necrótico sistêmico e nas reações locais.

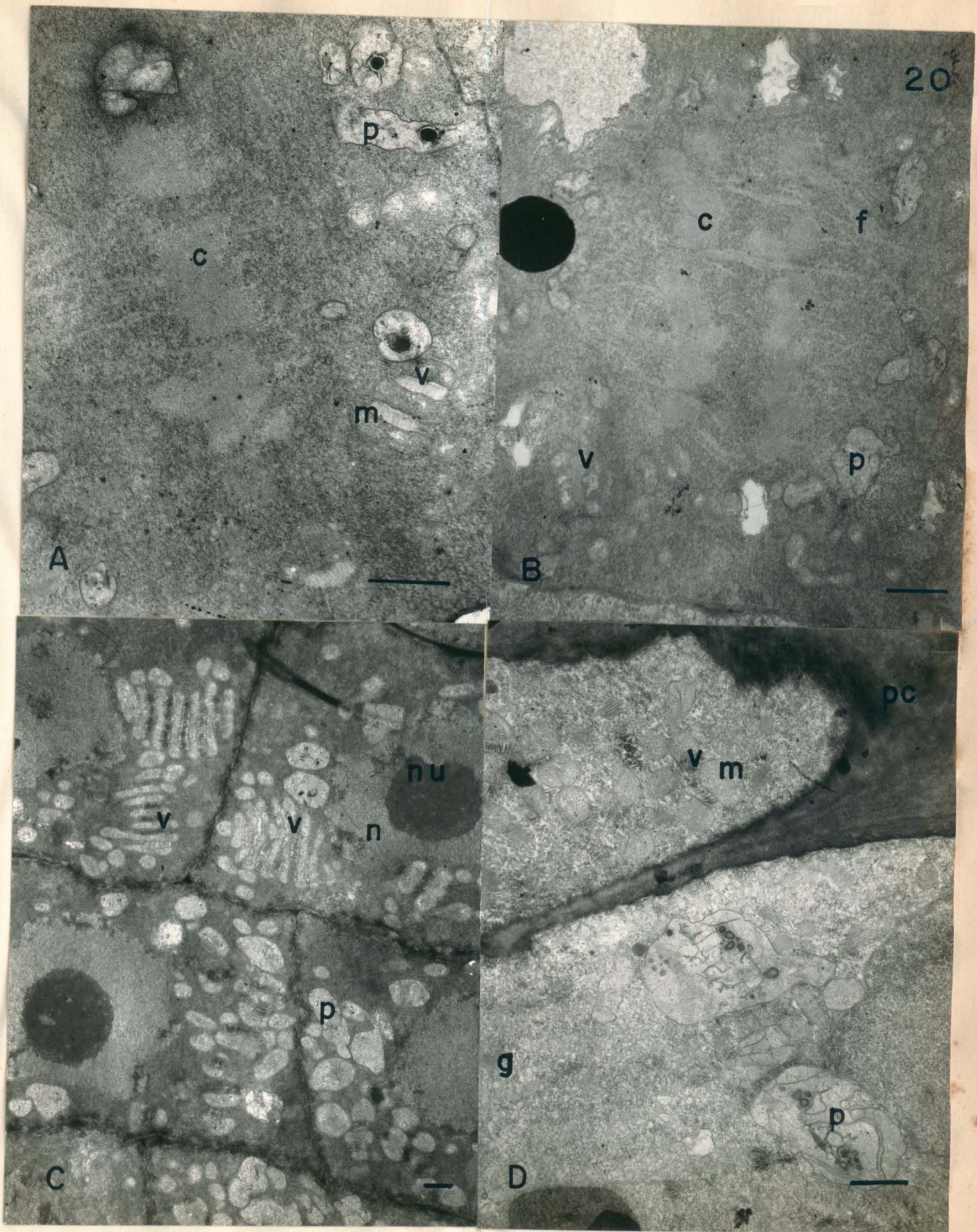
Em certos casos de má fixação, as células se alteravam, sendo todavia o padrão por elas apresentadas, similar àquele ostentado pelas células adjacentes ao tecido necrosado (Figs. 16C; 22A). Havia um raleamento do citoplasma, ruptura do plasmalema e do tonoplasto, desorganização das estruturas do plastídio e do mitocôndrio, e vesicularização do retículo endoplasmático. Aparentemente a estrutura de Golgi e o núcleo foram as únicas componentes celulares que não sofreram alterações morfológicas nestas células.

#### Secções de tecido radicular de plantas infetadas pelo VAP

Em raízes laterais de fumo e tanto laterais como adventícias de tomateiro, as inclusões do VAP foram encontradas com certa frequência, principalmente nas porções em que o tecido já se acha bem diferenciado (zona cortical, vascular e epidérmica). Todavia a maior parte das atenções durante o exame do tecido radicular foi dirigida à ponta da raiz, abrangendo a coifa, a zona meristemática e as primeiras porções do tecido radicular em início de diferenciação (Fig. 20A-D). Não se observaram diferenças entre as raízes laterais e adventícias, quer estruturais, quer de infecção.

Embora houvesse sido feito o contróle da posição relativa das diferentes partes da raiz através de exame de secções mais espessas, adjacentes às ultra-finas, ao microscópio convencional, usualmente era difícil distinguir-se a zona meristemática propriamente dita. Em geral, a natureza meristemática das células nesta região foi baseada pela sua posição relativa na raiz ou pela sua morfologia, conforme descrição feita por Whaley et al. (1960).





**Figura 20.** Micrografias electrônicas do tecido radicular de tomateiro infectado pelo VAP. A e B - Células em plena mitose, na zona meristemática da ponta de raiz, contendo inclusões do VAP; C - Células da zona cortical, ligeiramente afastada da zona meristemática, contendo numerosas inclusões do VAP, associadas aos mitocôndrios; D - Células da coifa, próximas à epiderme, também contendo inclusões do VAP.

Na coifa, as inclusões do VAP, embora presentes, não eram muito frequentes, mas ocorriam desde as células mais periféricas, até as mais interiores, próximas à região meristemática (Fig. 20D).

Na zona que corresponderia à região quiescente (Jensen & Kravallian, 1958), realmente não se constatou a ocorrência de células em divisão, e estas apresentavam-se tipicamente com o aspecto de células meristemáticas. Na sua periferia pôde-se observar várias células em repouso ou em divisão (Fig. 20A-D), contendo inclusões do VAP.

O número de células com inclusão, bem como de inclusões por célula, aumentava gradativamente a partir da periferia da zona quiescente, à medida que se afastava dela, principalmente na região cortical. Não se pôde notar, no entretanto alterações sensíveis nas células radiculares, mesmo quanto contendo um grande número de inclusões. Ocasionalmente constatou-se a ocorrência de mitocôndrios extremamente longos, associados com inclusões do VAP (Fig. 20C).

#### Secções do ápice vegetativo e dos primórdios foliares de fumo, infectados sistemicamente pelo VAP

Verificada a presença de inclusões do VAP nas proximidades da região meristemática da raiz, as atenções se voltaram para a possibilidade de elas ocorrerem também no meristema do ápice vegetativo e primórdios foliares. Devido às dificuldades de se isolar este órgão para histologia electrono-microscópica, os estudos se limitaram às plantas de fumo (Fig. 21).

Assim como na raiz, houve certa dificuldade para se identificar corretamente a região meristemática, propriamente dita, devido aos problemas de orientação do bloco para as secções ultra-finas. Mesmo assim a natureza meristemática das células que constituem as camadas superiores do ápice vegetativo foram facilmente constatadas, e muitas delas se achavam em plena mitose (Fig. 21A). Os primórdios foliares já foram mais facilmente identificados (Fig. 21C, D). Muitas das células do meristema apical, tanto das camadas superficiais (túnica) (Fig. 21A) ou das subjacentes (corpus) (Fig. 21B) como nos primórdios foliares (Fig. 21C, D), algumas delas em mitose, continham inclusões do VAP.



EWK

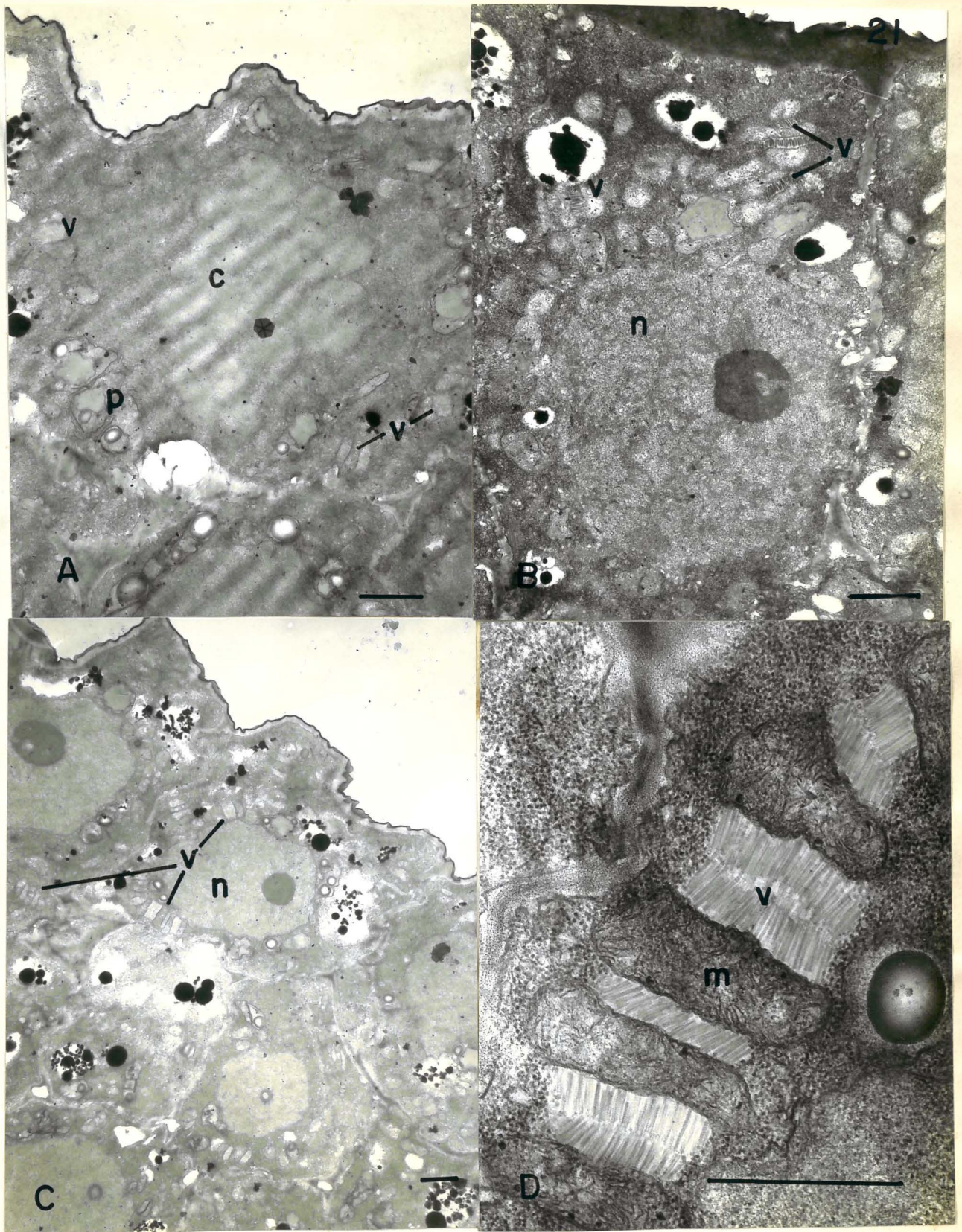


Figura 21. Micrografias eletrônicas da região meristemática do ápice vegetativo (A,B) e dos primórdios foliares (C,D) de fumo, infectado sistemicamente pelo VAP. A- Uma célula em mitose e B- em repouso, ostentando inclusões do VAP; C- Aspecto geral e D- detalhe de uma célula do primórdio foliar, infectado pelo VAP.

Ocorrência de inclusões do VAP em tecidos florais e do fruto em tomateiro

Exame de secções do mesocarpo de fruto de tomateiros infetados pelo isolado Itapeva do VAP, embora não ostentasse sintomas externos, revelou a presença de inclusões do VAP (Fig. 19D). Também exames de secções de uma inflorescência anômala, de origem genética, de uma planta infetada pelo isolado Itapeva, indicaram a presença de inclusões neste tecido (Fig. 18A, B).

Infecção mista de células com o VAP e com o vírus Y da batata

Numa das experiências, empregaram-se plantas, que embora não manifestassem sintomas conspícuos, além daquêles causados pelo VAP, achavam-se acidentalmente contaminadas pelo vírus Y da batata (VYB). Nos tecidos destas plantas, além das inclusões características do VAP, foram encontradas comumente células que se achavam simultaneamente infetada pelo VYB, a julgar pela presença de inclusões lamelares, típicas da infecção com vírus do grupo morfológico do VYB (Edwardson, 1966). Testes patológicos posteriores confirmaram realmente a contaminação pelo VYB. Estas inclusões cilíndricas, aparecem em secções como feixes de elementos lineares retilíneos ou curvos, e neste caso formando figuras semelhante a catavento (Fig. 19B).

Não se percebeu dano sensível à célula, decorrente de uma possível ação sinérgica induzida pela infecção simultânea do VAP e do VYB.

Cristais citoplasmáticos e perinucleares em células do parênquima do floema na perpétua

Em preparações rápidas de folhas de perpétua, infetadas sistemicamente com qualquer um dos isolados do VAP, embora se obtivesse quantidade razoável de partículas, raramente se encontravam inclusões do VAP nestes tecidos. Nas secções, estas se apresentavam bastante degenerados, e nas células do parênquima do floema constatou-se frequentemente a ocorrência de inclusões cristalinas, de baixa densidade, e que em secção apresentavam forma retangular, trapezoidal ou triangular, e envolvidas por uma membrana. Em muitos casos estas inclusões ocorriam no espaço perinuclear. Suas dimensões nas secções eram variadas, mas as maiores chegavam a ter  $3 \mu \times 3 \mu$  ou mais (Fig. 22B).



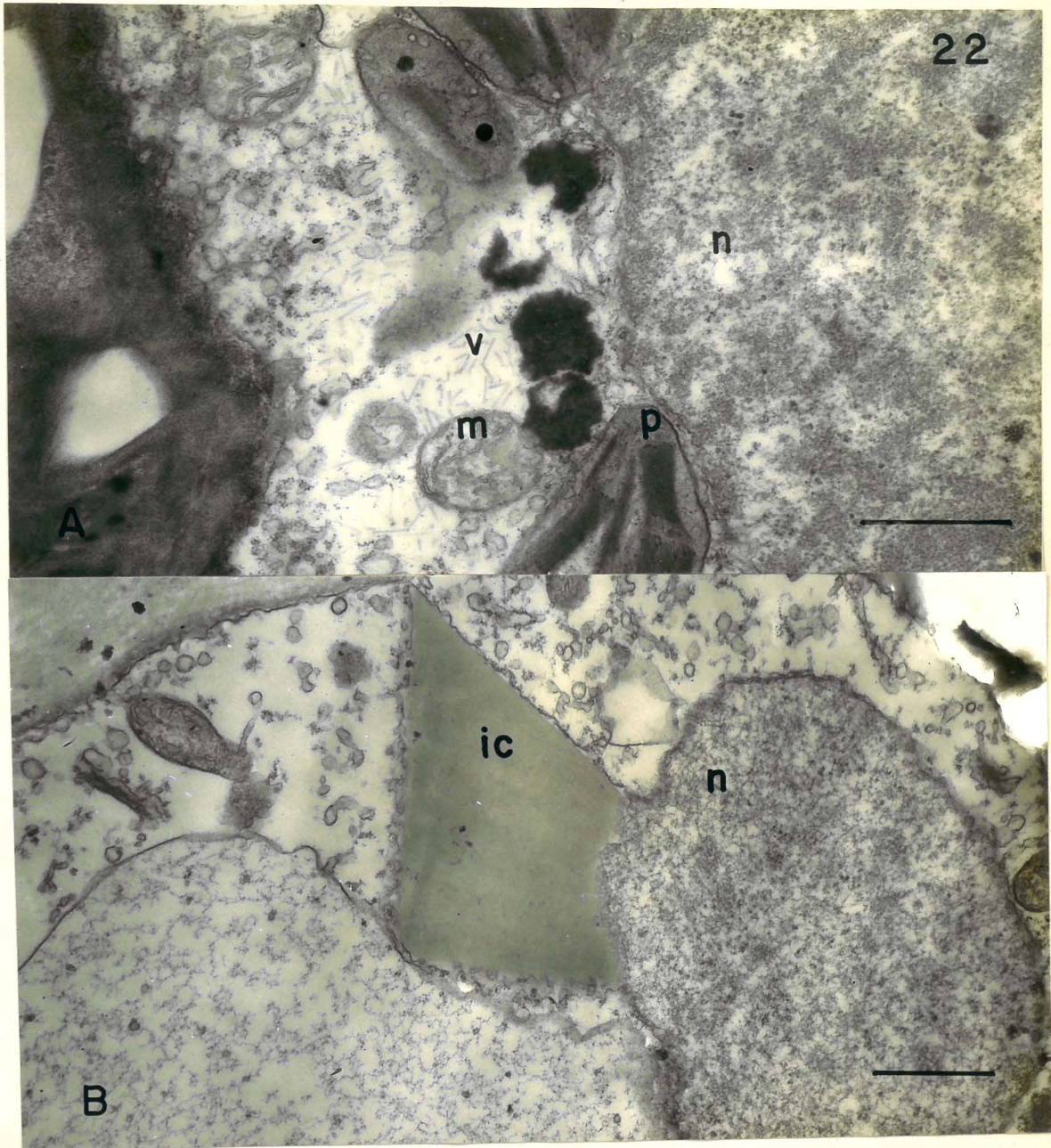


Figura 22. A - Célula do parênquima lacunoso, de fôlha de fumo, infetado sistemicamente com o VAP. Notar particulas de comprimento variado, dispersas no citoplasma, nas proximidades de mitocôndrios; B - Inclusão cristalina, perinuclear, em células do parênquima do floema de perpetua, infetada sistemicamente com o VAP.

c. Histologia de tecidos infetados pelo VAP ao microscópio convencional

Exames de secções espessas (1-2  $\mu$  de espessura) do mesmo bloco do qual foram feitas secções ultra-finas para microscopia electrónica, coradas com Azur II e azul de metileno, não permitiram a visualização das inclusões do VAP. Apenas as alterações maiores das células, consequentes da infecção, como adensamento celular, necrose, etc. puderam ser notadas. O exame de fragmentos de epiderme das folhas de plantas infetadas, em contraste de fase, não permitiu a visualização das inclusões do VAP, vistas ao microscópio electrónico.

5 - DISCUSSÃO

a. Identidade das partículas observadas ao microscópio eletrônico e o VAP

Dos dois tipos de partículas do VAP, curtas e longas, respectivamente com 54 e 199 m $\mu$  de CN, as últimas são consideradas as formas infetivas deste vírus. A evidência crucial provém de o fato de praticamente toda infetividade estar localizada na camada de fundo produzida pela ultracentrifugação em gradiente de densidade, e que ao exame electrónico-microscópico - mostra constituir-se só de partículas uniformes, de ca. 200 m $\mu$  de comprimento, confirmando os trabalhos de Silva (1965) e de Oliveira (dados não publicados), e da diminuição ou mesmo perda desta infetividade diretamente associada à decomposição dessas partículas por um aquecimento superior a 70-75°C/10', conforme verificada ao microscópio electrónico.

Outras evidências suplementares seriam: (a) A omnipresença de tais partículas em todas as preparações rápidas, provenientes de plantas hospedeiras de espécies e famílias diferentes e que reagem diferentemente à invasão do vírus, inclusive naquelas plantas, das quais o vírus não foi ainda purificado. Por outro lado, a ausência de partículas similares em preparações de plantas não infetadas excluiria a possibilidade de estas partículas representarem componentes normais daquelas plantas ou mesmo um vírus latente; (b) A presença constante de partículas de morfologia similar às observadas in vitro, e de comprimento predominantemente próximo a 200 m $\mu$ , no interior de células de plantas infetadas, formando inclusões usualmente associadas aos mitocôndrios. A confirmação desta identidade pôde ser estabelecida pela comparação das inclusões com secções de sedimentos de preparações altamente purificadas e infetivas do VAP, obtidos por ultracentrifugação.

b. Morfologia das partículas do VAP

Os CN das partículas curtas e longas do VAP, respectivamente 54 e 199 m $\mu$ , determinados no presente estudo, confirmam as determinações preliminares feitas por Costa et al. (dados não publicados) e estão de acordo com as medições feitas por Harrison e Woods (1966) no isolado Bidens do VAP. Vale ressaltar que os resultados obtidos pelos últimos (52 e 197 m $\mu$ ) basecu-

se numa distribuição dos comprimentos em classes com 5 m $\mu$  de intervalo, enquanto os presentes dados, em classes de 25 m $\mu$  de intervalo. Isto mostra - que para efeito de determinação do CN, o intervalo de classe não chega a influir decisivamente nos resultados, em perfeito acôrdo com as observações feitas por Brandes e Wetter (1959).

Não houve variações **significativas** nessas determinações, que pudessem ser atribuídas à diferença de isolado do VAP ou da planta hospedeira utilizada. A semelhança morfológica das partículas dos diferentes isolados do VAP corrobora a similaridade no comportamento biológico dos mesmos, e constitui-se numa evidência adicional à consideração de que eles representam um mesmo vírus ou estirpe do mesmo complexo.

O exame de preparações altamente purificadas do VAP, após serem metalizadas ou contrastadas negativa ou positivamente, não mostra nenhuma diferença entre os dois tipos predominantes de partículas, exceto o comprimento. Ambos são tubulares, medindo o diâmetro externo **cêrca** de 25 m $\mu$ , enquanto o do canal interno, 4 m $\mu$ . Estes dados concordam excelentemente com aqueles já determinados para outros vírus do grupo do VRF (Nixon & Harrison, 1959; Offord, 1966). Contudo uma possível diferença morfológica entre o VAP e outros integrantes do grupo do VRF somente poderá ser estabelecida em condições comparativas. Apenas Harrison e Woods (1966) apresentaram dados - neste sentido, apontando além de pequenas diferenças no comprimento das - partículas longas e maiores em relação às curtas, entre os diferentes isolados por eles investigados, e uma ligeira diferença entre o diâmetro do VRF e do vírus do "early browning" da ervilha.

Algumas evidências obtidas através de microscopia eletrônica - (Nixon & Harrison, 1959; Silva, 1965; Offord, 1966), foram consideradas - favoráveis a uma estrutura helicoidal das partículas do VRF e do VAP. Estrias transversais observadas nas partículas do VRF contrastadas com sais de uranila (Nixon & Harrison, 1959; Offord, 1966) e uma possível analogia das partículas do VAP decompostas termicamente, com filamentos helicoidais de um myxovírus (SV 5) (Choppin & Stoeckenius, 1964) apontado por Silva (1965) constituem-se em tais evidências.

Realmente, Finch (1965) aponta, baseado em dados preliminares de difração de raio-X de partículas do VRF e do vírus do mosaico-em-faixas da cevada, que a disposição das subunidades estruturais nestas partículas deve ser helicoidal.

Mas, ainda que os nucleocapsídeos de forma alongada dos diferentes vírus tenham simetria helicoidal, sua comprovação ao microscópio eletrônico tem sido feita somente nos casos em que a hélice é frouxa, como acontece com certos componentes internos dos myxovírus (Horne & Wildy, 1963) e do vírus da estomatite vesicular (Klimenke et al., 1966; Simpson & Hauser, 1966), ou com as partículas do vírus do amarelo da beterraba (Beta vulgaris L.) (Horne et al., 1959) e da tristeza do citros (Kitajima et al., 1965).

Mesmo num caso bastante estudado como o do VMCF, embora muitos autores clamassem ter demonstrado electrono-microscópicamente sua estrutura helicoidal, já provada através de difração de raio-X (Holmes & Franklin, 1958), apenas recentemente Finch (1964) apresentou evidências razoáveis para tal assertiva. A respeito, Mattern (1962) dedicou especial atenção, apontando vários artefatos relacionados ou não à estrutura helicoidal das partículas dos vírus, que podem produzir imagens ao microscópio eletrônico, incompatíveis com a configuração deduzida pelo raio-X.

No caso do VRF e do VAP tanto os dados já conhecidos em literatura como aqueles obtidos no presente trabalho, são considerados insuficientes para confirmar o aspecto helicoidal de suas partículas. É realmente difícil estabelecer se as estriações transversais indicariam uma hélice ou uma pilha de anéis. Quanto às partículas do VAP decompostas termicamente, o aspecto produzido é ambíguo, não permitindo dele tirar conclusão alguma.

A ligeira mas perceptível diferença entre as extremidades das partículas do VAP já fora anteriormente apontada para as partículas do vírus do mosaico do trigo (Brandes et al., 1964) e do VRF (Harrison & Woods, 1966). Finch (1965) interpreta esta diferença, baseado em dados de difração de raio-X, como consequência de os capsômeros das partículas terem a forma de banana e se disporem com seu eixo maior ligeiramente inclinado em relação ao eixo maior das partículas.

As técnicas de coloração das partículas do VAP in vitro não trouxeram informações sobre a possível localização do RNA nas partículas do VAP. Todavia o exame de secções ultra-finas, tanto do material purificado como de tecidos de plantas infetadas, e coradas com acetato de uranila, indicaram a presença de uma zona densa, de ca. 20 Å de espessura, margeando o canal axial (Fig. 12B, E). Como os sais de uranila têm marcante afinidade com material nucléico (Huxley & Zubay, 1961) parece provável que este adensamento seria decorrente da presença do RNA. Comparando esta observação com a situação do RNA nas partículas do VMCF, deduzidas por difração de raio-X (Holmes & Franklin, 1958), os dados parecem ser compatíveis. A zona anelar, a cerca de 80 Å do centro da partícula do VRF, referida por Offord (1966) não parece assim corresponder ao RNA, e talvez represente uma zona de sobreposição dos capsômeros.

A pequena discrepância (ca. 5 mμ) havida na determinação do diâmetro das partículas do VAP in vitro e in situ poderia ser atribuída à ligeira contração das partículas durante a fixação, e que parece ser fenômeno comum a numerosos vírus. Todavia, De Zoeten e Shalla (1966b) mencionam um efeito inverso, no caso de um isolado californiano do VRF.

#### c. Alterações morfológicas nas partículas, induzidas por tratamentos enzimáticos e térmicos

A estabilidade estrutural das partículas do VAP à incubação com tripsina e/ou RNase, bem como o pequeno efeito destas enzimas na infetividade das preparações tratadas, confirmam os resultados de Nixon & Harrison (1959) com o VRF e os de Silva (1965) com o VAP. Todavia, a tripsina causou em alguns casos, uma agregação terminal das partículas. Este tipo de agregação pode ser induzida nas partículas do VMCF abaixando-se o pH do meio de suspensão (Takahashi, 1949; Baudet *et al.*, 1951), mas no presente caso, as razões deste fenômeno não estão perfeitamente esclarecidas, em face à incostância dos resultados. Uma possível explanação seria admitir uma ligeira digestão terminal das partículas pela enzima, e que as tornaria susceptíveis de se unirem pelas extremidades. Saliente-se que aparentemente a agregação das partículas não tornou a preparação que as continha, infetiva.



EWK  
Os resultados dos testes de inativação térmica de preparações purificadas de VAP concordam com aquêles obtidos por Costa et al. (dados não publicados). A temperatura de inativação do VAP parece ser ligeiramente inferior àquela do VRF (Schmelzer, 1957; Cadman & Harrison, 1959).

Silva (1965) descreve a ruptura das partículas do VAP em pequenos fragmentos anelares, ou desorganização e inchamento ao longo das partículas, como consequência do tratamento térmico. Em verdade, o resultado final da degradação pelo calor é a transformação das partículas em uma massa amorfa, de aspecto pulverulento, constituída de grânulos de 30-40 Å de diâmetro, e que representariam provavelmente um ou mais capsômeros denaturados. Embora não seja uma condição essencial, pois frequentemente as partículas se transformavam diretamente na massa amorfa (Fig. 10), a fragmentação das partículas em pedaços menores e mesmo em pequenos anéis, usualmente precede esta decomposição, e possivelmente representa um estágio intermediário deste processo. Isto explicaria, porque as preparações contendo partículas curtas são mais sensíveis ao valor do que àquelas que contêm partículas longas.

O aquecimento de partículas do VAP em presença de água destilada, ao invés da solução de tampão fosfato, leva a formação de pequenas massas do material decomposto pelo calor, possivelmente devida à não dispersão das mesmas. Estas observações confirmam, fornecendo alguns detalhes adicionais sobre o aspecto dessas massas, os estudos feitos por Hart (1956) sobre a degradação térmica do VMGF. Atribue Hart esta não dispersão da porção decomposta do vírus, ao efeito da tensão superficial da água pura, o que seria quebrada em presença de sais.

#### d. A natureza das partículas curtas

As partículas curtas, de 54 mμ de CN, formam um pico conspícuo na curva de distribuição dos comprimentos das partículas, tanto nas preparações rápidas como purificadas, e são facilmente separadas das longas por ultracentrifugação em gradiente de densidade.



Silva (1965) comparou a infetividade da camada de t<sup>o</sup>po em relação à do fundo, após terem sido separadas por um ciclo de ultracentrifugação em gradiente de densidade, e verificando um valor da ordem de 3%, concluiu que "as partículas curtas, de uma maneira geral, não são infetivas". Todavia não descartou êle a hipótese de a preparação contendo as partículas curtas estar contaminada pelas partículas longas, infetivas. Oliveira (dados não publicados) eliminou totalmente esta infetividade residual associada à camada de t<sup>o</sup>po, acrescentando um ciclo adicional de ultracentrifugação em gradiente de densidade. Os dados de microscopia electrónica controlando o primeiro e o segundo ciclo desta separação (Fig. 5B), demonstrando a diminuição da contaminação, constitue-se na evidência adicional de que não haveria infetividade associada às partículas curtas.

A origem e a função das partículas curtas, presentes invariavelmente em preparações in vitro dos diferentes isolados, estirpes e vírus do grupo do VRF ainda não se acham esclarecidas. Algumas das prováveis alternativas seriam: (a) As partículas curtas representariam fragmentos das longas; a ruptura destas poderia ocorrer durante a extração do suco, ou mesmo no interior das células, durante a degeneração das mesmas, como consequência da infecção; (b) A síntese das partículas do VAP dar-se-ia por crescimento terminal, como sugerido por Commoner (1962) para o VMCF. As partículas curtas seriam formas incompletas ou imaturas, ou como aventado por Köhler (1956) para o VRF, as partículas em crescimento teriam pontos de rupturas alternados, a espaços equivalentes ao comprimento das partículas curtas e longas, respectivamente; (c) As partículas curtas seriam produtos colaterais, não infetivos, da infecção pelos vírus do grupo do VRF, e portanto diferentes das partículas longas, podendo ou não estarem implicados no fenômeno da infecção e síntese (Lister, 1966; De Zoeten & Shalla, 1966b).

Embora as evidências obtidas até agora não permitam eliminar totalmente outras hipóteses, a primeira das acima mencionadas é considerada nêsse trabalho como a mais provável, pelo menos em relação ao VAP. Sua extensão aos demais vírus integrantes do grupo do VRF deve esperar o advento de mais dados, principalmente sôbre ultraestrutura dos tecidos infetados.

Esse ponto de vista basea-se nas seguintes observações: (a) Em exames de secções ultra-finas de células invadidas pelo VAP, independente do tecido e da planta considerados, desde que intactos, a julgar pela sua preservação geral, as partículas do vírus ocorriam em agregados mais ou menos ordenados, adjacente aos mitocôndrios, tendo comprimento bastante uniforme, em torno de 200 m $\mu$ . Agregados similares, constituídos de partículas menores não foram observados até o presente. Alguns supostos casos representariam secções obliquas ou tangenciais de grupos de partículas longas. Deve-se ressaltar aqui que, desde que a fixação e a inclusão tenham sido bem feitas, e exame de secções permite observar o vírus e as estruturas celulares literalmente sem alteração alguma, enquanto em preparações rápidas ou purificadas os tratamentos que o vírus sofre são bastante drásticos; (b) A proporção entre partículas longas, baseada em estimativas feitas por métodos espectrofotométricos (Silva, 1965) ou na contagem das partículas em preparações rápidas foi de cerca de 3 longas para 1 curta. Em determinações individuais houve certa variação para mais ou menos sobre este valor. De qualquer maneira, se a maioria das partículas curtas fossem sintetizadas nas células infetadas, seria razoável esperar-se sua ocorrência numa frequência similar; (c) Quando as células se achavam visivelmente em decadência, decorrente da infecção, ou alteradas por artefatos de fixação, as partículas curtas e longas eram encontradas dispersas ao acaso no citoplasma, e sua posição era tal que em geral percebia-se tratar de uma inclusão de partículas longas desorganizada, sendo provavelmente as partículas mais curtas, fragmentos destas (Fig. 22A). Como nessas condições as partículas curtas são identificáveis, não procederia a argumentação de elas ocorriam em células, mas sem formarem inclusões.

O fato de não ocorrer partículas de comprimentos inferiores a 200 m $\mu$  numa frequência aproximadamente igual, torna difícil aceitar aquelas de 55 m $\mu$  como formas intermediárias de um processo sintético por crescimento terminal. Quanto à sugestão de Köhler (1956), se válida, faria com que partículas longas e curtas ocorressem numa mesma proporção, tanto in vitro como in situ. Pelo menos com relação ao VAP, dentro das células infetadas isto não ocorreu.

De Zoeten e Shalla (1966b) afirmam ter encontrado partículas curtas e longas no interior das células de fumo, infetadas por um isolado californiano de VRF, e cujo padrão de distribuição dos comprimentos se assemelhava àquêle das preparações in vitro, fato êste que êles consideram como evidência favorável à hipótese de que as partículas curtas representariam um produto colateral, não infetivo, da infecção por êste vírus. Todavia, mencionam De Zoeten e Shalla, que as partículas do VRF formam na fase inicial da infecção, inclusões cristalinas que com o decorrer do tempo se desagregam. - Embora em seu relato aqueles autores não mencionem claramente, é muito provável que as partículas curtas por êles constatadas, somente aparecessem conspicuamente nesta última fase, como consequência de quebras durante a desorganização das inclusões, como ocorreria com o VAP.

Quanto a Lister (1966), atribui êle às partículas curtas uma função especial, quando notou que as inoculando juntamente com partículas longas, diminuía a freqüência do aparecimento de isolados instáveis do VRF; por outro lado, adicionando-se aos inóculos de isolados instáveis, reduzia o aparecimento destes nas subculturas das lesões locais. Como nestes isolados instáveis, admite-se que o VRF ocorre na forma de RNA livre (Sanger & Brandenburg, 1961; Cadman, 1962), Lister sugeriu que as partículas curtas conteriam em seu RNA, diferente do RNA das partículas longas, informações necessárias para comandar o seu capeamento tanto das partículas curtas como longas, pela proteína. Contudo seus dados devem ser encarados com reservas, pois a obtenção de preparações de partículas curtas ou longas sem contaminação é bastante difícil. Além disso, em sua teoria não há uma explanação razoável para a origem do RNA da partícula menor.

#### e. As partículas do VAP "in situ" e a citologia dos tecidos de plantas infetadas

##### As inclusões citoplasmáticas e sua associação com mitocôndrios

A comparação das partículas, formando inclusões citoplasmáticas características, presente nas secções de células de plantas infetadas pelo VAP, com àquelas observadas em secções de sedimentos de preparações purificadas e infetivas do VAP, obtidas por ultracentrifugação, dirime qualquer

dúvida quanto à identidade delas (Fig. 12A, E). A instabilidade destas inclusões à fixação com  $KMnO_4$  seria uma evidência suplementar à sua natureza nucleoproteica (Luft, 1958; Shalla, 1961).

Quando a infecção é sistêmica, não há aparentemente restrições - quanto ao tipo de tecido susceptível de ser invadido pelo VAP. Em todos os órgãos examinados, literalmente só não foi êle constatado no interior dos vasos do xilema, e pelo menos dentre os vírus até agora estudados - histologicamente, é o único que invade o meristema apical ou radicular. Não se observou peculiaridades nas inclusões ou nos tecidos afetados que permitissem distinguir os diferentes isolados do VAP, complementando a similaridade in vitro.

Além da detecção das partículas do VAP in situ, verificou-se sua constante associação com mitocôndrios (Figs. 13, 22). Dos vírus de planta, de forma alongada e desprovidos de membrana envoltória até agora estudados, a maioria ocorre na citoplasma sem se associarem especificamente com determinadas estruturas celulares. Como exceções, além do VAP, pode-se mencionar uma possível relação do VMCF e do vírus do mosaico do trigo com o retículo endoplasmático (Kohlemainen et al., 1965; Saito, comunicação pessoal) e a ocorrência intranuclear dos vírus do amarelo da beterraba (Cronshaw et al., 1966), do mosaico-em-faixas da cevada (Gardner & Shalla, 1966) e do mosaico amarelo do salsaão (Apium graveolens L.) (Kitajima & Costa, 1967). De Zoeten e Shalla (1966b) aventam uma possível relação das partículas do VRF com estrutura de Golgi, mas suas micrografias não são convincentes.

Mesmo com vírus de animais, raros são os exemplos de associação de vírus com mitocôndrios. Todavia, nos casos descritos, a relação entre os vírus e esta estrutura celular tem sido mais íntima que no caso do VAP, - pois as partículas chegam mesmo a ocorrer em seu interior, podendo aparentemente aí serem sintetizadas, como na infecção do vírus da leucemia eritroblástica (Benedetti & Bernhard, 1958) e da mieloblastose de aves (Bonar et al., 1959) e da peste bovina ("rinderpest") (Breesse & De Boer, 1962).



EwK.  
Certas estruturas com as quais partículas do VAP aparecem associadas, em preparações rápidas (Fig. 1A, C, E), devem representar mitocôndrios. Sua semelhança morfológica com mitocôndrios e a associação intracelular acima referida, servem de base para esta assertiva.

A associação entre elementos do retículo endoplasmático, partículas do VAP e mitocôndrio, observada uma única vez numa célula do parênquima do floema, de folha de tomateiro (Fig. 19A), devida a sua raridade, não permite inferir se o fato constitui-se numa anomalia ou numa fase que antecede à organização das partículas do VAP junto ao mitocôndrio, cuja duração seria extremamente rápida.

A análise das micrografias de seções de tecidos infetados, sugere que os mitocôndrios quando associados com inclusões do VAP, tornar-se-iam achatados, estando as partículas preferencialmente dispostas nas superfícies de área maior, produzindo uma figura que tridimensionalmente lembraria uma escôva com pêlos dos dois lados. Isto explicaria a elevada frequência com que aparecem não só mitocôndrios individuais, mas grupos deles dispostos lado-a-lado, tendo partículas do VAP associadas às superfícies laterais mas não nas extremidades. Embora em parte esta configuração do complexo mitocôndrio-VAP possa também explicar a baixa frequência de seções transversais de grupos de partículas do VAP, ela não é inteiramente satisfatória, se os mitocôndrios se orientam ao acaso. Como não se obteve evidências de uma orientação preferencial desta estrutura nas células infetadas, uma justificativa plausível seria que quando grupos de partículas são seccionadas transversalmente, êles teriam sua detecção dificultada.

Não há ainda uma explicação definitiva para êste tipo de associação entre as partículas do VAP e os mitocôndrios. Uma proposição bastante razoável seria de que se não integralmente, pelo menos uma das fases da síntese das partículas do VAP seria altamente endergônica, e a proximidade topológica com o mitocôndrio, a fonte da energia celular, seria bastante vantajosa. É possível que esta demanda extra de energia exija uma maior atividade do mitocôndrio, e que se refletiria no desenvolvimento das cristas e também no aumento de seu número, constituindo-se numa das causas -

da maior atividade respiratória dos tecidos infetados pelo VAP, fato este recentemente observado por Silva (1967).

#### Citologia das folhas de plantas infetadas pelo VAP

Nas folhas, as inclusões do VAP parecem ocorrer preferencialmente nas células do parênquima lacunoso e paliádico, embora também ocorram em menor frequência em outros tecidos, alguns bastante especializados como certas estruturas secretoras em Bidens (Fig. 18C, D). A translocação do VAP à curta distância provavelmente dar-se-ia através dos plasmodesmata. A distâncias maiores, deve ele ser transportado pelos vasos crivados; a presença de partículas isoladas ou agregadas em seu interior constitui-se numa evidência direta à última hipótese (Fig. 14C, E), embora não esclareça definitivamente a possibilidade de o VAP se multiplicar em seu interior. Nos vasos lenhosos em nenhum caso foi constatado a presença do VAP, não obstante o parênquima adjacente usualmente se achar infetado.

Recentemente houve uma controvérsia em torno da identificação das partículas do VMCF em células necrosadas de lesões de Nicotiana glutinosa (Hayashi & Matsui, 1963, 1965; Weintraub & Ragetli, 1964). No caso do VAP, a identificação de agregados de suas partículas é facilmente feita mesmo em células completamente necrosadas, em lesões locais ou nas necroses sistêmicas (Fig. 16). Se nessas condições, as partículas permanecem infetivas, é uma questão aberta, todavia o fato demonstra cabalmente a sua estabilidade morfológica, suportando mesmo as alterações mais ou menos drásticas que ocorrem no interior das células em processo necrótico.

A necrose sistêmica nas folhas, induzida em certas plantas pelo VAP, não parece ser um processo lítico, uma vez que as diferentes estruturas celulares mantêm de certa maneira sua integridade durante todo o processo, sendo um adensamento geral a alteração mais visível.

A intumescência de certos pontos da parede celular foi considerada como um dos sinais da degenerescência celular (Fig. 17). Todavia, sua exata causa ainda não se acha esclarecida, podendo ela decorrer de um aumento de volume do material que compõe a parede celular, ou da deposição de uma substância produzida pela célula, entre a parede celular e a membrana plas-

mática. Esta última hipótese encontra apoio em observações feitas por Mollenhauer *et al.* (1961), em células da epiderme da ponta de raiz de milho (*Zea mays* L.), em que um material denso, secretado pela estrutura de Golgi, é ali depositado. Contudo, nos presentes estudos, não se pôde constatar fases intermediárias deste processo de deposição, e tão pouco uma inusitada atividade da estrutura de Golgi. Por outro lado, as razões pelas quais, o intumescimento deixa de ser observado em fases avançadas da necrose não são conhecidas.

Em seções ultra-finas de folhas de perpétua infetadas pelo VAP, por razões ainda não compreendidas, as inclusões deste vírus ocorriam raramente. Contudo uma particularidade marcante foi a ocorrência de formações cristalinas, aparentemente sem relação alguma com as partículas do VAP, contidas em estruturas membranosas, e em muitos casos, no espaço perinuclear das células do parênquima do floema (Fig. 22B). Observações feitas pelo autor em tecidos foliares de perpétua, infetada ou não com alguns outros vírus, não revelaram até agora tais cristais. As evidências disponíveis não permitem estabelecer sua natureza e tão pouco uma relação definitiva entre a ocorrência destes cristais e a infecção com o VAP.

A presença de inclusões do VAP nos tecidos florais anômalos (Fig. 18 A, B) e também em tecidos de fruto de tomateiro (Fig. 19D), atesta a variedade dos tecidos susceptíveis de serem alcançados por este vírus.

As células infetadas, exceto quando em vias de necrose, ou nas adjacências do tecido necrosado, além das alterações na disposição e estrutura dos mitocôndrios e a presença de inclusões, não se apresentam profundamente modificadas. Porém, os plastídeos parecem ser a estrutura mais sensível à infecção, particularmente nos casos em que esta resulta em sintomas de mosaico. Ele sofre alterações (Fig. 19 C) do mesmo tipo já relatado em plantas infetadas pelo VMCF (Shalla, 1964) e o vírus de vira-cabeça (Kitajima, 1965a), por exemplo.

A presença do VAP nas zonas meristemáticas apical e radicular

Os resultados dos exames de secções de ponta de raiz de tomateiro e fumo e do ápice vegetativo e dos primórdios foliares de fumo, ao microscópio electrónico, mostraram que pelo menos nestas plantas, as partículas do VAP ocorriam bastante próximas e provavelmente no interior da zona constituída de células meristemáticas destes órgãos (Figs. 20 e 21). Apesar das dificuldades ~~havidas~~ em se identificar claramente as diferentes partes componentes, particularmente da extremidade apical da raiz, a caracterização das células meristemáticas baseou-se além da topologia, na sua morfologia. Quanto a esta última, foram considerados os critérios estabelecidos por Whaley et al. (1960) e em muitos casos, sua natureza meristemática era obviamente demonstrada pelo fato de as células se encontrarem em plena mitose (Figs. 20 A, D; 21 A). Esta observação sugere que aparentemente a infecção da célula meristemática pelo VAP não interfere com as atividades normais daquela, ligadas à divisão.

Tem sido uma idéia bem aceita e generalizada, fundamentada em numerosos dados experimentais, que a região meristemática acha-se normalmente livre de vírus (Crowley & Hanson, 1960; Smith & Schlegel, 1964; Kitajima, 1965a). Porém, as razões deste fenômeno - se o movimento do vírus não é capaz de superar a multiplicação das células, ou se o vírus não é capaz de vencer a competição das atividades metabólicas das células meristemáticas para se estabelecer - ainda não se acham esclarecidas (Schlegel, 1965). O VAP parece constituir-se na primeira exceção a esta regra. Deve-se contudo lembrar que o número de vírus até agora testado quanto à possibilidade de invadir o tecido meristemático é relativamente pequeno, o que torna esta generalização bastante questionável.

As raízes primárias e os ápices vegetativos possivelmente seriam infectados pelo VAP que se translocara das folhas infectadas, pelos vasos crivados e daí, de célula para célula, até atingir o meristema. As raízes adventícias, contudo, originam-se do desenvolvimento de células do caule que se desdiferenciam, tornando-se meristemáticas (Esau, 1953). Como aquelas células provavelmente já estariam infectadas quando se transformaram em meriste-

matricas, o VAP teria simplesmente permanecido em seu interior, multiplicando-se simultaneamente nas divisões subsequentes da célula. Todavia, como o VAP consegue se manter em seu interior, enquanto o vírus de viracabeça, por exemplo, não o faz (Kitajima, 1965a) é uma questão que no momento não tem resposta. Quando infectando células meristemáticas, o VAP teria aparentemente sua taxa de multiplicação reduzida a julgar pelo pequeno número de inclusões por célula na zona meristemática, número este que aumenta gradativamente à medida que se afasta desta região. Também parece provável que na chamada zona quiescente da ponta de raiz (Jensen & Kravalgian, 1958) o VAP não ocorra.

Uma consequência prática desta ocorrência do VAP no meristema, se comprovada que o mesmo se dá em outras plantas hospedeiras, seria a impossibilidade de se obter clones livres de vírus por cultura do meristema apical do caule, como se faz com batata e algumas outras plantas, a partir de plantas infectadas (Hollings, 1965).

#### Infeção mista de plantas com o VAP e com o vírus Y da batata (VYB)

A presença de inclusões intracelulares características à infecção com o VAP e o VYB (Fig. 19 B), mostra que a infecção mista chega realmente ao nível celular. No presente caso, aparentemente não houve efeito sinérgico ou de interferência de um vírus em relação ao outro, podendo ambos se multiplicarem numa mesma célula, independentemente.

#### e. Histologia de plantas infectadas pelo VAP ao microscópio convencional

Ao lado das investigações electrónico-microscópica dos tecidos de plantas infectadas por diferentes vírus, como programa normal dos trabalhos da Seção de Virologia do Instituto Agronômico, investiga-se a possibilidade de algumas das alterações observadas ao microscópio electrónico serem detectáveis ao microscópio convencional, como um método de diagnose, principalmente nos casos em que não se dispõe daquele instrumento.

No caso do VAP, apesar de as inclusões citoplasmáticas serem facilmente constatadas ao nível do microscópio electrónico, não se obteve nenhuma indicação sobre sua detectabilidade ao nível do óptico, e por ora, utilizando-se os métodos descritos no presente trabalho, a microscopia convencional não serviria para fins de diagnose.



6 - RESUMO

O presente trabalho descreve os resultados das investigações sobre a morfologia das partículas de 4 diferentes isolados do vírus do anel do pimentão (VAP) e a ultraestrutura dos tecidos por eles infetados.

Em síntese, foram seguintes as observações e conclusões feitas:

(a) Partículas tubulares, de cerca de 25  $\mu$ m de diâmetro externo e com o canal axial de 4  $\mu$ m de largura, foram consistentemente encontradas em preparações rápidas ou purificadas e em seções de tecidos de plantas infetadas pelo VAP. A mensuração dos comprimentos destas partículas indicaram a existência de dois tipos predominantes, respectivamente com 54 e 199  $\mu$ m de comprimento normal. Estes valores eram independentes do isolado do vírus, da planta hospedeira ou dos métodos de preparo do espécime utilizados. Contudo, em seções ultra-finas de tecidos infetados, foram encontradas inclusões citoplasmáticas, constituídas apenas de partículas longas. Estas podem ser separadas das curtas in vitro, através da ultracentrifugação em gradiente de densidade, quando então demonstra-se que somente elas são infetivas.

(b) Estas partículas quando contrastadas negativa ou positivamente, ou em seções, revelavam claramente sua natureza tubular. Um anel denso, margeando o canal axial, observado em partículas seccionadas transversalmente, deve representar a situação do ácido nucléico do vírus.

(c) Quanto às partículas curtas, as evidências obtidas são sugestivas de que elas representariam fragmentos equivalentes a 1/4 das longas.

(d) O tratamento de preparações infetivas com ribonuclease e/ou tripsina, não afetou sensivelmente sua infetividade, ou a estrutura das partículas que as compõe. Em algumas experiências, por razões ainda não compreendidas, a tripsinização induziu uma agregação terminal das partículas.

(e) O aquecimento de uma preparação infetiva do VAP, à temperatura superior a 65-70°C durante 10 minutos, faz decrescer sensivelmente e mesmo eliminar totalmente sua infetividade. Simultaneamente ocorre uma degradação generalizada das partículas, precedida ou não de uma fragmentação das mesmas em um material pulverulento, constituído de grânulos de 30-40  $\mu$ m

de diâmetro, e que possivelmente representam grupos de capsômeros denaturados.

(f) Exames de secções ultra-finas de tecidos de plantas infetadas por qualquer um dos isolados do VAP, mostraram consistentemente a ocorrência de inclusões citoplasmáticas, constituídas de agregados ordenados de partículas tubulares, de ca. 200 m $\mu$  de comprimento. Estas são consideradas representando o VAP in situ, dada sua identidade com aquelas encontradas em secções de sedimentos de preparações purificadas e infetivas, obtidas por ultracentrifugação.

(g) Em geral as células invadidas pelo VAP não mostravam alterações profundas. Todavia, em certas plantas hospedeira, em que há uma necrose sistêmica decorrente da infecção, nas células em vias de necrose ou naquelas adjacentes à parte necrosada, as inclusões frequentemente apareciam desorganizadas, aparecendo partículas menores do que aquelas de 200 m $\mu$ , dispersas no citoplasma. Este fato constitui-se numa das evidências favoráveis à consideração de que as partículas curtas representam fragmentos das longas, podendo a ruptura dar-se mesmo no interior das células.

(h) Um fato marcante foi a associação constante das partículas do VAP, formando inclusões, com a superfície lateral dos mitocôndrios. É o primeiro caso descrito, em que partículas de um vírus de planta se associa com esta estrutura celular. Esta associação sugere que o mitocôndrio desempenharia um papel importante em pelo menos uma das fases da síntese do VAP, possivelmente atendendo a uma eventual elevada demanda de energia. Certas alterações na estrutura do mitocôndrio estariam relacionadas com esta atividade.

(i) As inclusões do VAP foram encontradas em praticamente todos os tipos de tecidos das plantas infetadas pelo VAP, e mesmo no interior das células necrosadas, elas mantêm sua integridade morfológicas. Contudo uma constatação importante foi a de que partículas do VAP ocorriam na região meristemática do ápice vegetativo, do primórdio foliar e da ponta de raiz, o que constitui-se na primeira demonstração visual deste fato.

(j) As evidências electrôno-microscópicas não demonstraram diferenças -

EWK

entre os 4 isolados do VAP investigados, e, que, juntamente com dados de patologia e serologia, indicam serem êles o mesmo vírus, ou estirpes de um mesmo complexo. Por outro lado, apesar de o complexo do VAP ter certas peculiaridades morfológicas, patológicas e serológicas, o conjunto destas propriedades justifica a sua inclusão no grupo do vírus do "rattle" do fumo.

MORPHOLOGY OF THE PARTICLES OF PEPPER RINGSPOT VIRUS (BRAZILIAN TOBACCO RATTLE VIRUS) AND THE ULTRASTRUCTURE OF THE INFECTED TISSUES

7 - SUMMARY

Tubular particles, about 25  $\mu$  in diameter and with the axial channel 4  $\mu$  wide, were consistently found in crude or purified preparations, as well as within cells, from plants infected with each one of the 4 different isolates of the pepper ringspot virus (Brazilian tobacco rattle virus). Measurements of the length of these particles in vitro, indicated the existence of 2 prevalent types of particles, respectively with 54 and 199  $\mu$  in normal length. These values depended of the virus isolate, host plant or preparative method used. Infected cells, contained cytoplasmic inclusions consisted of long particles only. These were easily separated from the short particles in vitro, through density gradient ultracentrifugation, being then demonstrated that only they are infective.

Negative or positively stained, or ultra-thin sectioned particles, revealed clearly their tubular nature. In sections, a dense rim, bordering the axial channel was considered to represent the site of the ribonucleic acid in the pepper ringspot virus (PRSV) particles.

Concerning the nature of the short particles, although the evidences collected were not entirely conclusive, these are suggestive that they must represent fragments, roughly equivalent to 1/4 of the longer one.

Trypsin and/or ribonuclease treatment did not affect either the infectivity or the structure of PRSV particles. However in some instances, trypsinization induced and end-to-end aggregation of the particles, due to still unknown reasons.

Purified and infective preparations heated at a constant temperature above 65-70°C during 10 minutes, lose their activity. Simultaneously, a degradation of the PRSV particles occurs, characterized by their transformation into tiny powdery material about 30-40 A in diameter, which probably represents denatured protein subunits. Such decomposition was usually preceded by an intense fragmentation of the particles into shorter units or even

ElvK  
Examination of ultra-thin sections of tissues from PRSV infected plants showed consistently the presence of characteristic intracellular inclusions, formed by ordered aggregation of tubular particles. These are considered as representing PRSV in situ because of their identity with those particles found in thin sections of pellets obtained by ultracentrifugation of purified and infective PRSV preparation.

Inclusions were often found associated with mitochondrion. This association was such that groups of PRSV particles appeared disposed perpendicularly on the lateral surface, but not at the ends of this cell structure. In some instances, there were indications that virus particles might surround completely the lateral surface of mitochondrion. This close relationship between PRSV and mitochondrion strongly suggests that the latter might play an important role in at least one of the steps of the virus synthesis, probably satisfying a high energetic requirement. Certain structural changes of the mitochondrion might be related with such activity. No other plant or animal virus so far investigated is known to have such association.

Viral inclusions were found in practically every type of tissues of the plants infected with PRSV except xylem vessels. Even in completely necrotic cells, PRSV inclusions were identified, pointing out to their relative morphological stability.

An important finding was the occurrence of PRSV inclusions within the meristematic zone of shoot apex, leaf primordium or root tip, which seems to be the first visual demonstration of this fact.

Usually PRSV-infected cells did not present pronounced changes, except those related to mitochondrion, quoted above. But in some cases, in which infection results in necrosis, cells in necrotic process as well as in those neighboring necrotic areas, PRSV inclusions commonly appeared disorganized, and the particles shorter than the 200 m $\mu$  type, were seen scattered in the cytoplasm. This fact is considered as favorable evidence for the concept that short particles of PRSV represent broken pieces of longer particles, rather than products of infection.



EVA

There was no electron microscopical difference among the 4 isolates of PRSV investigated, which complements the pathological and serological evidences pointing out that they are the same virus, or strains of the same complex. On the other hand, despite some morphological, pathological and serological peculiarities, the bulk of these properties justify the inclusions PRSV within the tobacco rattle virus group.

EwK

8 - LITERATURA CITADA

- Allen, Jr., T.C. 1963a. Electron microscopy of tobacco rattle virus  
Phytopathology 53: 1137 (Abstr.).
- Allen, Jr., T.C. 1963b. Tobacco rattle virus from Oregon compared with pea  
early browning virus. Phytopathology 53: 1431 (Abstr.).
- Baudet, J., Creissant, O., Dervichian, D.G., Joly, M. & Mossé, J. 1951.  
Variation of the size and of the size distribution of tobacco mosaic  
virus particles, depending on the method of preparation. Disc.  
Faraday Soc. 11: 236-246.
- Behrens, J. 1899. Weitere beiträge zur Kenntinis der Tabakpflanze. XIV.  
Die Mauche (Mauke) des Tabaks. Landw. VerStat. 52: 422-447.
- Benedetti, E.W. & Bernhardt, W. 1959. Recherches ultrastructurales sur  
le virus de la leucemie erythroblastique du poulet. J. Ultrastruct.  
Res. 1: 309-336.
- Bode, O. & Paul, H.L. 1956. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über  
Kartoffelviren. III. Vermessung an Teilchen des Kartoffel-Y-Virus.  
Phytopath. Z. 27: 107-112.
- Bonar, R.A., Parsons, D.F., Beaudreau, G.S., Becker, C. & Beard, J.W. 1959  
Ultrastructure of avian myeloblasts in tissue culture. J. Natl.  
Cancer Inst. 23: 199-210.
- Böning, K. 1931. Zur Ätiologie der Streifen- und Kräuselkrankheit des -  
Tabaks. Z. Parasitenk. 3: 103-141.
- Bos, L. & van der Want, J.P.H. 1958. Virusziekten van vlinderbloemigen,  
Landbouwvoorlichting 15: 550-558.
- Bos, L. & van der Want, J.P.H. 1962. Early browning of pea, a disease -  
caused by a soil- and seed borne virus. Tijdschr. PlZiekten 68:368-390.
- Brakke, M.K. 1953. Zonal separation by density-gradient centrifugation.  
Arch. Biochem. Biophys. 54: 275-290.
- Brandes, J. 1957. Eine elektronenmikroskopische schnell Methode zum Nachweis  
faden- un stäbchenförmiger Viren, insbesondere in Kartoffeldunkelkeimen.  
Nachr. Bl. dtsh. PflSchDienst (Braunschweigen) 9: 151-152.
- Brandes, J. 1961. Einige Bemerkungen über den Nachweis von Kartoffelviren  
mit hilfe des Elektronenmikroskops. Proc. 4th Conf. Potato Virus Dis.,  
Braunschweigen, 1960:170-175.
- Brandes, J. 1964. Identifizierung von gestreckten pflanzenpathogen Viren  
auf morphologischer Grundlage. Mitt. Biol. Bund. Land-u. Fortwirt.,  
Berlin-Dahlem, 110: 5-130.
- Brandes, J. & Bercks, R. 1965. Gross morphology and serology as a basis for  
classification of elongated plant viruses. Virus Res. 11: 1-24.
- Brandes, J. & Wetter, C. 1959. Classification of elongated plant viruses  
on the basis of particle morphology. Virology 8: 99-115.
- Brandes, J., Phillippe, M.R. & Thornberry, H.H. 1964. Electron microscopy  
of particles associated with soil-borne wheat mosaic. Phytopath. Z.  
50: 181-190.

- EWK
- Breese, S. & De Boer, C. 1962. Examination of rinderpest virus in tissue culture. Proc. 5th Int. Conf. Electron Microscopy. Philadelphia, 2: V-7.
- Brenner, S. & Horne, R.W. 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. Biochim. Biophys. Acta. 34: 103-110.
- Cadman, C.H. 1962. Evidence for association of tobacco rattle virus nucleic acid with a cell component. Nature 193: 49-52.
- Cadman, C.H. 1963. Biology soil-borne viruses. Ann. Rev. Phytopath. 1: 143-172.
- Cadman, C.H. & Harrison, B.D. 1959. Studies on the properties of soil-borne viruses of the tobacco rattle type occurring in Scotland. Ann. Appl. Biol. 47: 542-556.
- Caulfield, J.B. 1957. Effects of varying the vehicle for OsO<sub>4</sub> in tissue fixation. J. Biophys. Biochem. Cytol. 3: 827-831.
- Choppin, P.W. & Stoecknius, W. 1964. The morphology of SV 5 virus. Virology 23: 195-202.
- Commoner, B. 1962. Linear biosynthesis of tobacco mosaic virus: development and test of a model. Proc. Natl. Acad. Sci., US. 48: 2076-2083.
- Costa, A.S. & Kitajima, E.W. Isolado do vírus do anel do pimentão afetando tomatal em Itapeva. Dados não publicados.
- Costa, A.S., Kitajima, E.W. & Oliveira A.R. 1960. Vírus do anel do pimentão: um integrante do grupo do "rattle" do fumo. Dados não publicados.
- Cronshaw, J., Hoeffert, L. & Esau, K. 1966. Ultrastructural features of Beta leaves infected with beet yellows virus. J. Cell Biol. 3: 429-443.
- Crowley, N.C. & Hanson, J.B. 1960. The infection of apical meristems of tomato roots with tobacco mosaic virus after treatment with ethylene-diaminotetracetic acid. Virology 12: 603-606.
- Dalton, A.J. 1955. A chrome-osmium fixative for electron microscopy. Anat. Record 121: 281 (Abstr.).
- De Zoeten, G.A. & Shalla, T.A. 1966a. Purification and characterization of California tobacco rattle virus. Phytopathology 56: 738-743.
- De Zoeten, G.A. & Shalla, T.A. 1966b. California tobacco rattle virus, its intracellular appearance, and the cytology of the infected cells. Phytopathology 56: 744-754.
- Edwardson, J.R. 1966. Electron microscopy of cytoplasmic inclusions in cells infected with rod-shaped viruses. Am. J. Bot. 53: 359-364.
- Eibner, R. 1959. Untersuchungen über die "Eisenfleckigkeit" der Kartoffel in Deutschland. Dissertation Giessen, 1959.
- Esau, K. 1953. Plant anatomy. Wiley, New York.
- Finch, T. 1964. Resolution of the substructure of tobacco mosaic virus in the electron microscope. J. Mol. Biol. 8: 872-874.
- Finch, T. 1965. Preliminary X-ray diffraction studies of tobacco rattle and barley stripe mosaic viruses. J. Mol. Biol. 12: 612-619.
- Gardner, W. & Shalla, T.A. 1966. Electron microscopic evidence for the presence of barley stripe mosaic in the nuclei of mature leaf cell. Phytopathology 56: 878 (Abstr.).

- E.W.K.
- Gibbs, A.J. & Harrison, B.D. 1964. A form of pea early browning virus found in Great Britain. *Ann. Appl. Biol.* 54: 1-11.
- Glauert, A.M. & Glauert, R.M. 1958. Araldite as an embedding medium for electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4: 191-194.
- Gold, A.H., Grogan, R. & Bardin, R. 1963. An apparent strain of tobacco rattle virus associated with a yellow spotting of lettuce. *Phytopat.* 53: 1139 (Abstr.).
- Harrison, B.D. 1960. The biology of soil-borne viruses. *Adv. Virus Res.* 7: 131-161.
- Harrison, B.D. 1961. Na discussão do trabalho de Sanger, H.L. 1961. Untersuchungen ber schwer bertragbare Formen des Rattle-Virus. *Proc. 4th Conf. Potato Virus Dis., Braunschweigen.* 1960: 22-29.
- Harrison, B.D. & Klug, A. 1966. Relation between length and sedimentation coefficient for particles of tobacco rattle virus. *Virology* 30:738-740.
- Harrison, B.D. & Nixon, H.L. 1959a. Separation and properties of particles of tobacco rattle virus with different lengths. *J. Gen. Microbiol.* 21: 569-581.
- Harrison, B.D. & Nixon, H.L. 1959b. Some properties of infective preparations made by disrupting tobacco rattle virus with phenol. *J. Gen. Microbiol.* 21: 591-599.
- Harrison, B.D. & Woods, R.D. 1966. Serotypes and particles dimensions of tobacco rattle viruses from Europe and America. *Virology* 28: 610-620.
- Hart, R.G. 1956. Morphological changes accompanying thermal denaturation of tobacco mosaic virus. *Biochim. Biophys. Acta* 30: 388-389.
- Hayashi, T. & Matsui, C. 1963. Electron microscopy of tobacco mosaic virus particles in necrotic local lesions. *Virology* 21: 525-527.
- Hayashi, T. & Matsui, C. 1965. Fine structure of lesion periphery produced by tobacco mosaic virus. *Phytopathology* 55: 387-392.
- Hollings, M. 1965. Disease control through virus-free stock. *Ann. Rev. Phytopath.* 3: 367-396.
- Holmes, K.C. & Franklin, R.E. 1958. The radial distribution in some strains of tobacco mosaic virus. *Virology* 6: 328-336.
- Horne, R.W. & Wildy, P. 1963. Virus structure revealed by negative staining. *Adv. Virus Res.* 10: 101-170.
- Horne, R.W., Russell, G.E. & Trim, A.R. 1959. High resolution electron microscopy of beet yellows virus filaments. *J. Mol. Biol.* 1: 234-236.
- Huxley, H.E. & Zubay, G. 1961. Preferential staining of nucleic acid containing structures for electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11: 273-296.
- Jensen, W.A. & Kravalgian, L.G. 1958. An analysis of cell morphology and the periodicity of division in root tip of Allium cepa. *Am. J. Bot.* 45: 365-372.
- Johnson, J. 1927. The classification of plant viruses. *Wisc. Agr. Exp. Sta. Res. Bull.* 76.



- Johnson, J. 1951. Virus particles in various plant species and tissues. *Phytopathology* 41: 78-93.
- Karnovsky, M.J. 1961. Simple methods for staining with lead at high pH in electron microscopy, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11: 729-732.
- Kitajima, E.W. 1965a. Electron microscopy of vira-cabeça virus (Brazilian tomato spotted wilt virus) within the host cell. *Virology* 26: 89-99.
- Kitajima, E.W. 1965b. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. *J. Electronmicroscopy (Tokyo)* 14: 119-121.
- Kitajima, E.W. 1967. Ultraestrutura de células secretoras de fôlhas de Bidens. Em preparo.
- Kitajima, E.W. & Costa, A.S. 1967. Inclusões intranucleares associadas ao vírus do mosaico amarelo do salsaõ. la Reunião Soc. Bras. Fitopat., Piracicaba.
- Kitajima, E.W., Silva, D.M., Oliveira, A.R., Müller, G.W. & Costa, A.S. 1965. Electron microscopical investigations on tristeza. Proc. 3rd Conf. Int. Org. Citrus Virologists, 1-9.
- Klimenko, S.M., Uvarov, V.N. & Gajdamovich, S.J. 1966. Spatial arrangement of ribonucleoprotein strand of vesicular stomatitis virus. Proc. 6th Int. Cong. Electron Microscopy (Kyoto) 2: 183-184.
- Köhler, E. 1956. Versuch einer Deutung der Partikellagen pflanzlicher Virusarten. *Naturwissenschaften* 43: 230-231.
- Kolehmainen, L., Zech, H. & von Wettstein, D. 1965. The structure of cells during tobacco mosaic virus reproduction. Mesophyl cells containing virus crystals. *J. Cell Biol.* 25: 77-97.
- Leberman, R. 1965. Use of uranyl formate as a negative stain. *J. Mol. Biol.* 13: 606.
- Lihnell, D. 1958. Investigations on spraing. Proc. 3rd Conf. Potato Virus Dis., Lisse- Wageningen, 1957: 184-188.
- Lister, R.M. 1966. Possible relationship of virus-specific products of tobacco rattle virus infection. *Virology* 28: 350-353.
- Luft, J.H. 1958. Permanganate, a new fixative for electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2: 799-801.
- Luft, J.H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9: 409-414.
- Lwoff, A. & Tournier, P. 1966. The classification of viruses. *Ann. Rev. Microbiol.* 20: 45-74.
- Lwoff, A., Horne, R. & Tournier, P. 1962a. Un système des virus. *C.R. Acad. Sci.* 254: 4225-4227.
- Lwoff, A., Horne, R. & Tournier, P. 1962b. A system of viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27: 51-55.
- Maat, D.Z. 1963. Pea early browning virus and tobacco rattle virus- two different but serologically related viruses. *Neth. J. Plant Path.*
- Saito, Y. 1966. Comunicação pessoal.

ENK

Markham, R., Frey, S. & Hills, G.J. 1963. Methods of enhancement of image detail and accentuation of structure in electron microscopy. *Virology* 20: 88-102. Citado em Horne, R.W. & Wildy, P. 1963. *Adv. Virus Res.* 10: 101-170.

Mattern, C.F.T. 1962. Electron microscopic observations of tobacco mosaic virus structure. *Virology* 17: 76-83.

Millonig, G. 1964. Studio sui fattori che determinano la preservazione della ultrastruttura. In "From molecule to cell- Symposium on electron - microscopy", P. Buffa ed., p. 347-362, C.N.I., Roma.

Mollenhauer, H.H. 1959. Permanganate fixation of plant cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 6: 431-435.

Mollenhauer, H.H., Whaley, W.G. & Leech, J.H. 1961. A function of the Golgi apparatus in outer rootcap cells. *J. Ultrast. Res.* 5: 193-200.

Nixon, H.L. & Harrison, B.D. 1959. Electron microscopic evidence on the structure of the particles of tobacco rattle virus. *J. Gen. Microbiol.* 21: 582-590.

Noordam, D. 1956. Waardplanten en toetsplanten van het ratelvirus van de tabak. *Tijdschr. PlZiekten* 62: 219-225.

Offord, R.E. 1966. Electron microscopic investigations on the substructure of tobacco rattle virus. *J. Mol. Biol.* 17: 370-375.

Oliveira, A.R. Investigações serológicas sobre o vírus do anel do pimentão. Dados não publicados.

Oswald, J.W. & Bowman, T. 1958. Studies on a soil-borne potato virus disease in California. *Phytopathology* 48: 396 (Abstr.).

Palade, G.E. 1962. A study of fixation for electron microscopy. *J. Exptl. Med.* 95: 285-298.

Paul, H.L. & Bode, O. 1955. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Kartoffel-Viren. II. Vermessungen der Teilchen von drei Stämmen des Rattle-Virus. *Phytopath. Z.* 24: 341-351.

Paulus, A.O., Thomason, I.J. & Weathers, L.G. 1963. A soil borne virus disease of pepper in California. *Phytopathology* 53: 885-886 (Abstr.).

Quanjer, H.M. 1943. Bijdrage tot de kennis van de in Nederland voorkomende ziekten van tabak en van de tabaksteelt op kleigrond. *Tijdschr. PlZiekten* 40: 37-51.

Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17: 208-211.

Richardson, N.K., Jarret, L. & Finke, E.H. 1960. Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol.* 35: 313-323.

Rozendaal, A. 1947. Ziekten van het stengelbont-type bij de aardappel. *Tijdschr. PlZiekten* 53: 93-101.

Sabatini, D.D., Bensch, K.G. & Barnett, R.J. 1963. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.* 17: 19-58.

Saito, Y. 1966. Comunicação pessoal.

- Sänger, H.L. & Brandenburg, E. 1961. Über die Gewinnung von infektiösen Presssaft aus "Wintertyp" Pflanzen des Tabak-Rattle-Virus durch Phenolextraktion. *Naturwissenschaften* 48: 391.
- Sänger, H.L., Allen, M.W. & Gold, A.H. 1962. Direct recovery of tobacco rattle virus from its nematode vector. *Phytopathology* 52: 750 (Abstr.).
- Schlegel, I.R. 1965. Introduction, translocation and distribution of viruses in plants. *Adv. Virus Res.* 11: 163-221.
- Schmelzer, K. 1957. Untersuchungen über den Wirtspflanzenkreis des Tabakmauche-Virus. *Phytopath. Z.* 30: 281-314.
- Semancik, J.S. 1966. Purification and properties of 2 isolates of tobacco rattle virus from pepper in California. *Phytopathology* 56: 1190-1193
- Shalla, T.A. 1961. Degradation of tobacco mosaic virus by potassium permanganate. *Virology* 13: 383-386.
- Shalla, T.A. 1964. Assembly and aggregation of tobacco mosaic virus in tomato leaflets. *J. Cell Biol.* 21: 253-264.
- Silva, D.M. 1965. Estudos sobre purificação, composição e algumas propriedades do vírus do anel do pimentão. Tese para Livre-Docência. E.S.A. "Luiz de Queiroz", U.S.P., Piracicaba, 1-106.
- Silva, D.M. 1967. Distúrbios nutricionais e fisiológicos provocados pelos vírus de planta. *la Reunión Soc. Bras. Fitopat.*, Piracicaba.
- Simpson, R.W. & Hauser, R.E. 1966. Structural components of vesicular stomatitis virus. *Virology* 29: 654-667.
- Smith, K.M. 1937. A textbook of plant virus diseases. *la Ed.*, F. & A. Churchill, Londres.
- Smith, K.M. 1943. A virus disease of Atropa belladonna. *Parasitology* 35: 159-160.
- Smith, S.H. & Schlegel, D.E. 1964. The distribution of clover yellow mosaic virus in Vicia faba root tips. *Phytopathology* 54: 1273-1274.
- Takahashi, W.N. 1949. The effect of the pH on the linear aggregation of the tobacco mosaic virus. *Am. J. Bot.* 36: 642-645.
- Tomaru, K. 1964. Sobre o vírus do "rattle" do fumo (Em japonês). *Shokubutsu byoeki* 18: 350-354.
- Uschdrewit, H.A. & Valentin, H. 1956. Das Tabakmauche virus and Zierpflanzen. *NachrBl. dtsh. PflSchDienst (Braunschweigen)* 8: 132-133.
- van der Want, J.P.H. 1952. Some remarks on soil-borne potato virus. *Proc. 1st. Conf. Potato Virus. Dis., Wageningen-Lisse, 1951: 71-74.*
- van der Want, J.P.H. & Rozendaal, A. 1948. Electronenmicroscopische onderzoek van het virus, dat de ratelziekten van de tabak en het stengelbont van de aardappel veroorzaakt. *Tijdschr. Pflziekten* 54: 134-141.
- van Slogteren, D.M. 1958. Ratel virus als oorzaak van ziekten in bloembolgewassen en de mogelijkheden de infectie door middel van grondontsmetting te bestrijden. *Tijdschr. Pflziekten* 64: 452-462.
- Walkinschaw, C.H. & Larson, R.H. 1958. A soil-borne virus associated with the corky ringspot disease of potato. *Nature* 181: 1146.

- EWK
- Walkinschaw, C.H. & Larson, R.H. 1958. Corky ringspot of potato, Univ. - Wisconsin, Madison, Research Bulletin 217: 32 pp.
- Warmke, H.E. & Edwardson, J.R. 1966. Use of permanganate as a fixative for virus particles in plant tissues. Virology 28: 693-700.
- Watson, M.L. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4: 475-478.
- Weintraub, M. & Ragetli, H.W.J. 1964. Tobacco mosaic virus lesions in Nicotiana glutinosa. J. Cell Biol. 23: 499-509.
- Wetter, C. & Brandes, J. 1956. Untersuchungen über das Kartoffel-S-Virus. Phytopath. Z. 26: 81-92.
- Whaley, W.G. Mollenhauer, H.H. & Leech, J.H. 1960. The ultrastructure of the meristematic cell. Am. J. Bot. 47: 401-449.