

# BRAGANTIA

Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo

Vol. 20

Campinas, agosto de 1961

N.º 33

## PURIFICAÇÃO E ESTUDO DE ALGUMAS PROPRIEDADES DO VÍRUS DA NECROSE BRANCA DO FUMO (1)

DARCY M. SILVA, AVELINO R. DE OLIVEIRA, ELLIOT W. KITAJIMA, ANA MARIA B. CARVALHO e A. S. COSTA, engenheiros-agrônomo, Seção de Virologia, Instituto Agrônomo

### RESUMO

Experimentos relativos à purificação do vírus da necrose branca do fumo, em geral instável aos processos de purificação, mostraram ser possível obter preparações razoavelmente homogêneas partindo-se de plantas por êle infetadas.

O processo de purificação constou de uma clarificação preliminar através da adsorção de diversos componentes do suco de planta, ao qual foi adicionado dietilditiocarbamato de sódio a 0,1 M e tampão de fosfato pH 8,0 e a 0,1 M em fosfato hidratado de cálcio, seguida de ultracentrifugações diferenciais. Os resultados das purificações a partir de *Nicotiana tabacum* L. var. *xanthi*, *Solanum nigrum* L. e *Datura stramonium* L. doentes, mostraram-se consistentes com respeito à presença de *pellets* após duas ultracentrifugações, o mesmo não acontecendo com as plantas controles. Tais preparações apresentaram infetuosidade até o terceiro dia após a extração do suco.

Exames ao microscópio eletrônico das suspensões das *pellets* acima mencionadas em água destilada, mostraram a existência de partículas esferóides com um diâmetro ao redor de 50 milimicra.

Injeções em coelho, via intravenosa, num total de 7 doses de 2-3 ml de suspensão do vírus da necrose branca do fumo, preparadas diariamente pelo processo já referido, mas com uma só ultracentrifugação, provocaram a formação de anticorpos para o mesmo, conforme se pôde constatar pelos testes de precipitina de difusão em ágar.

### 1 — INTRODUÇÃO

O vírus da necrose branca do fumo tem sido encontrado afetando diversas plantas de importância econômica no Brasil. Diversos trabalhos sobre identificação, transmissão, círculo de hospedeiras e algumas propriedades desse vírus, já foram publicados (1, 2, 3, 4). Os resultados de tais estudos têm aumentado o interesse pelo mesmo, não só por

(1) Recebido para publicação em 22 de junho de 1961.

razões de ordem prática como pela contribuição que os vírus menos estáveis possam oferecer para os problemas de caráter básico.

O vírus da necrose branca apresenta, quando inoculado em fumo, três fases distintas em sua sintomatologia e um círculo de hospedeiras mais ou menos semelhante ao do *tobacco streak* dos Estados Unidos e *tobacco ringspot virus* (10). Entretanto, as diferenças entre o vírus da necrose branca e os dois acima é de tal ordem que tem justificado uma classificação distinta ao vírus descrito neste trabalho (2).

Entre os vírus desse grupo, pelo que sabemos, apenas o *tobacco ringspot*, que é o mais estável, foi purificado por Stanley (11) e Steere (12).

Assim, pois, o propósito dos autores, isolando-o e concentrando-o, verificando-lhe a forma e a dimensão, constatando o seu poder antigênico, foi o de contribuir para o maior conhecimento de um vírus dotado de acentuada instabilidade aos tratamentos comuns de laboratório, e que já foi encontrado afetando diversas espécies de plantas cultivadas.

Nossos primeiros ensaios de purificação do vírus da necrose branca do fumo não foram satisfatórios devido à mencionada instabilidade às operações de purificação. Contudo, o uso do dietilditiocarbamato de sódio, propiciando maior estabilidade ao vírus, à semelhança do que sucedeu a alguns outros descritos por Fulton e Hampton (5, 6, 7), contribuiu para a obtenção do vírus em estado parcial de pureza e com poder infetante.

Simultaneamente foram levados a efeito trabalhos para a obtenção de informações preliminares sobre a forma e propriedade antigênica do vírus.

## 2 — MATERIAIS E MÉTODOS

Em geral, plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* var. *xanthi*) dotadas de 8 a 10 folhas foram inoculadas com o vírus da necrose branca. Após 5 a 8 dias de inoculação, as folhas exibindo lesões locais foram colhidas e submetidas a diversos tratamentos. Antes de moer, as folhas eram molhadas com tampão de fosfato de 0,1 M, pH 8,0 e igual volume de uma solução de dietilditiocarbamato de sódio a 0,01 M. Ao suco obtido era adicionado novamente igual volume de tampão de fosfato. Essa suspensão era a seguir centrifugada a 4000 rpm durante 10 mi-

nutos e ao sobrenadante era adicionado fosfato de cálcio hidratado preparado segundo o método descrito por Fulton (6).

Após homogeneização do fosfato de cálcio hidratado (FCH) com o suco antes clarificado nova centrifugação de 4 000 rpm, durante 15 minutos, permitia obter um sobrenadante pardo-claro que era submetido a pelo menos dois ciclos alternados de centrifugação. Em alguns casos, antes do tratamento com FCH, era feita uma centrifugação de 30 000 rpm, durante 75 minutos, com posterior suspensão das *pellets* em pequeno volume de fosfato com carbamato, nas proporções previamente indicadas, e nova centrifugação a 3 000 rpm, por 15 minutos. Ao sobrenadante obtido era então adicionado FCH e, após homogeneização, a suspensão era submetida a outra baixa centrifugação (3 000 rpm, 10 minutos). Este processo, que não parece prejudicar as características do produto final, foi utilizado em algumas preparações a fim de economizar o FCH. Paralelamente foi feito um teste que permitiu obter algumas informações com respeito ao processo de adsorção com FCH. Sucos de folhas de fumo com lesões locais e com vírus sistêmico eram tratados igualmente com FCH e, depois de separados em sobrenadante e precipitado, foram inoculados em fumo. Os resultados mostraram que no sobrenadante estava quase todo o vírus infetante.

A mesma seqüência no processo de isolamento do vírus, sem o uso do dietilditiocarbamato de sódio, deu, no final, *pellets* apenas com as plantas doentes, mas sem infetuosidade. Ultracentrifugações diferenciais de preparações diluídas em tampão de fosfato 0,1 M e sulfito de sódio a 0,01 M também não produziram *pellets* infetantes.

Além dos trabalhos com material proveniente de plantas com lesões locais, foram feitas duas preparações com folhas que estavam na fase de recuperação, período esse em que subsiste considerável quantidade de vírus, sem sintoma muito pronunciado.

O mesmo processo de purificação levado a efeito com plantas sadias, crescidas em igual situação, eliminou todo material normal após a primeira ultracentrifugação.

Idêntico processo utilizado a partir de plantas sadias e doentes de *Datura stramonium* e *Solanum nigrum*, produziu *pellets* apenas com o material procedente das doentes.

Os produtos das diversas preparações com ou sem suspensão de látex e em diversas diluições foram colocados em películas de colódio para exames ao microscópio eletrônico (2).

(2) Consignamos nossos agradecimentos aos Drs. A. Vallejo Freire e A. Bruner Jr. pelas facilidades proporcionadas aos exames eletron-microscópicos de nossas preparações.

Ao mesmo tempo, preparações provenientes de um total de 800 g de folhas de fumo com lesões locais causadas pelas estirpes I e II do vírus da necrose branca do fumo <sup>(3)</sup> e preparadas diariamente por meio do FCH e centrifugações diferenciais, foram injetadas em coelho. Sete injeções de 2 a 3 ml foram feitas pela via intravenosa e, após 10 dias de descanso, colheu-se o sangue e preparou-se o soro pelo processo comum.

Testes de precipitina em tubos foram procedidos com o soro obtido, sem resultado positivo. Diversas variações para a execução destes testes foram introduzidas. Diálise do soro contra água destilada e posterior suspensão em NaCl 0,14 N e precipitação com sulfato de amônio 0,5 saturado, seguido de uma diluição do precipitado em solução fisiológica, foram experimentados visando eliminar possíveis interferentes do soro ou melhorar as condições para a específica precipitação. Com o mesmo propósito absorveu-se o anti-soro com ágar, observando-se o mesmo resultado negativo.

Com respeito ao antígeno foram usados vírus de várias fontes, suspensão de vírus purificado e suco original.

Em virtude da alta sensibilidade do método de difusão em ágar, provado para diversos vírus de planta, inclusive para o do *red node* do feijoeiro <sup>(4)</sup>, dotado de características muito semelhantes ao vírus da necrose branca, realizou-se uma série de testes pelo método mencionado. Para isso, o meio para a reação foi preparado com ágar, segundo o processo descrito por Ouchterlony <sup>(8)</sup> e van Slogteren <sup>(9)</sup>, usando-se fenol a 2% em vez de mertiolato, recomendado para preservação do meio contra microrganismos.

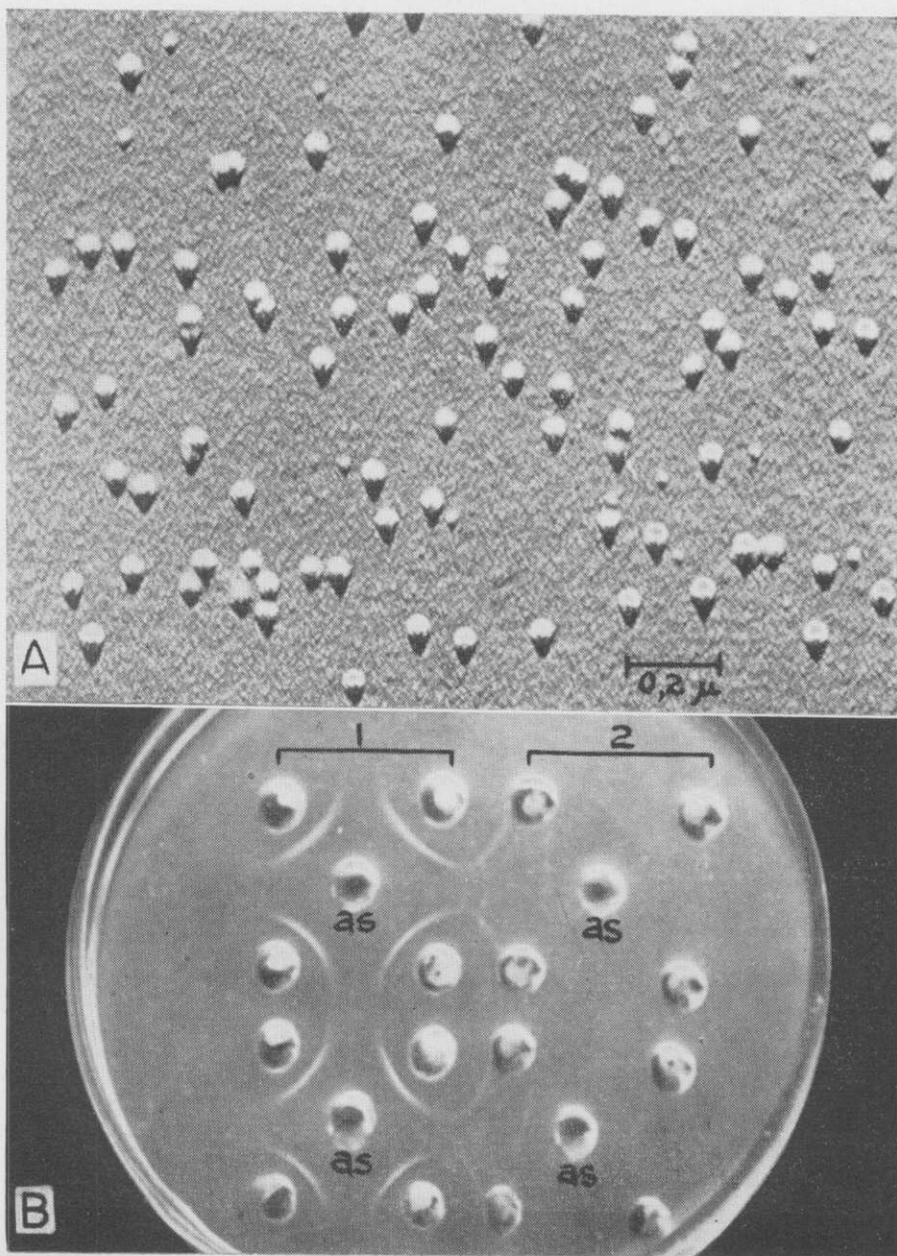
Os buracos para a colocação das amostras foram feitos no ágar depositado em caixas de Petri, por meio de perfurações com cilindros metálicos e posterior sucção a vácuo. Cada reservatório comportava mais ou menos 0,05 ml do anti-soro e das amostras. Essas placas, uma vez prontas para as provas, eram mantidas em câmara úmida e observadas periodicamente.

### 3 — RESULTADOS

As *pellets* obtidas de plantas de fumo em dois estágios de infecção com o vírus da necrose branca e as obtidas de *Datura stramonium* e

(3) Essas estirpes fazem parte da Coleção da Seção de Virologia, Instituto Agronômico, Campinas.

(4) Scott, H. A. Comunicação verbal.



Vírus da necrose branca do fumo. *A* — Partículas observadas ao microscópio eletrônico em preparações purificadas do vírus da necrose branca do fumo. *B* — Reação serológica de difusão em ágar. Nos orifícios com *as* foi depositado o anti-sôro e os orifícios sob as linhas 1 e 2 contêm suco de planta doente e sadia, respectivamente. As linhas de precipitação revelam reação entre antígeno do suco doente e seu anti-sôro.

*Solanum nigrum* doentes, conquanto apresentassem em algumas preparações uma tonalidade parda, mostraram, ao microscópio eletrônico, ser constituídas de partículas com um diâmetro de aproximadamente 50 milimicra e aspecto razoavelmente homogêneo, como se pode ver na estampa 1-A.

Em tais exames observou-se, ainda, que as partículas preparadas pela técnica descrita neste trabalho, sombreadas com cromo, se apresentavam, em geral, com razoável achatamento.

De maneira geral era bem mais fácil obterem-se *pellets* mais límpidas dos sucos provenientes de *Solanum nigrum* que das outras hospedeiras por nós usadas neste trabalho.

A suspensão das *pellets* em carbamato, demonstrou boa infetuosidade, mantendo-se assim infetantes pelo menos durante 3 dias, quando conservadas a mais ou menos 5°C. Uma preparação mais velha, mantida nas mesmas condições, já havia perdido seu poder infetante após 15 dias de envelhecimento.

Testes serológicos de difusão em ágar apresentaram linhas de precipitação, revelando o poder antigênico do vírus da necrose branca. A estampa 1-B mostra um dos testes de difusão em ágar.

Testes com as diversas estirpes dos vírus existentes na Seção de Virologia, foram positivos, havendo casos com duas e até três linhas de precipitação, observadas dentro de um período de 16 horas a 6 dias no máximo. A natureza das linhas suplementares não está bem estabelecida. Nestes testes não houve reação para as amostras provindas de plantas sadias. O vírus da necrose branca suspenso em dietilditio-carbamato de sódio e guardado em refrigerador a 5°C, muito embora houvesse perdido sua atividade após 15 dias, reagiu com seu anti-soro após 30 dias de envelhecimento.

Os testes realizados com amostras de *Datura stramonium* e *Solanum nigrum* doentes mostravam linhas de precipitação no ágar, o mesmo não se dando com as amostras sadias.

Ensaio usando anti-soro precipitado com solução 0,5 saturado de sulfato de amônio e suspenso em NaCl 0,14 N, demonstraram-se efetivos nos testes serológicos de difusão em ágar produzindo as esperadas linhas de precipitação quando posto a reagir contra uma suspensão de vírus.

Os resultados dos testes estão resumidos no quadro 1.

QUADRO 1. — Resultados obtidos nos testes serológicos de difusão em ágar com o vírus da necrose do fumo contra seu anti-soro

Hospedeira	Antígeno	Número de testes	Reação com material (1)	
			Doente	Sadio
<i>Nicotiana tabacum</i> .....	Suco purificado .....	4	+	—
	Suco não purificado ....	2	+	—
<i>Datura stramonium</i> .....	Suco purificado .....	1	+	--
	Suco não purificado ....	1	+	--
<i>Solanum nigrum</i> .....	Suco não purificado ....	1	+	—
	Suco não purificado .....	1	+	—

(1) + representa aparecimento de uma linha de precipitação; -- representa ausência da reação.

#### 4 — DISCUSSÃO

No decorrer dos trabalhos com o vírus da necrose branca obteve-se uma série de evidências que revelou ser possível isolá-lo e concentrá-lo em um estado de relativa pureza, suficiente para a sua identificação.

Com o desenvolver dos experimentos, a correlação entre as partículas esferóides, observadas ao microscópio eletrônico, e a causa da necrose branca do fumo, pareceu cada vez mais estreita.

Constituem, em resumo, argumentos razoáveis para se aceitar tais partículas como os agentes causais da necrose branca os seguintes fatos:

- a) sua presença em preparações infetantes;
- b) constatação das partículas providas de três espécies de plantas infetadas e a não obtenção de *pellets* nas preparações de plantas saudas, escolhidas para o contróle, após a primeira ultracentrifugação;
- c) relativa homogeneidade das partículas nas preparações ao microscópio eletrônico;
- d) testes serológicos positivos para as mais diversas preparações purificadas e negativos para as testemunhas.

Análises químicas, que exigem um produto de maior pureza, aguardam o melhoramento dos processos de purificação.

Aliás, a este respeito, a escolha da hospedeira parece ser um meio bastante promissor, de vez que as *pellets* obtidas a partir do *Solanum nigrum* têm-se mostrado bem mais claras, com aparente baixo teor de impurezas.

Diversos tratamentos químicos visando maior pureza foram tentados: agitação da suspensão do vírus em clorofórmio, álcool amílico ou n-butanol, precipitação com sulfato de amônio e diálise contra água destilada.

A desnaturação do vírus, entretanto, é tão rápida, que tem tornado os métodos de reconhecida eficácia para outros vírus, de pouca ou nenhuma eficiência no nosso caso.

A possibilidade de se obter o vírus da necrose do fumo com atividade após a extração do suco por um período bem mais longo em relação ao que se obtinha anteriormente, preservando o suco ou as preparações purificadas com sulfito de sódio e tampão de fosfato, constituiu ocorrência realmente encorajadora. Tal fato deve refletir, de maneira geral, a manutenção de sua integridade físico-química por espaço de tempo maior, quer pela eliminação de uma série de impurezas ativas contra o vírus, quer pela atuação benéfica dos solventes sobre ele ou, ainda, pela ação conjunta dessas duas causas.

A manutenção da atividade do vírus, embora se saiba não ser absolutamente necessária para a obtenção do anti-soro, parece ter tornado, em nosso caso, bem mais viável o êxito do processo de imunização.

Após os trabalhos de imunização foram realizados testes através do método de difusão em ágar, obtendo-se consistentemente a reação antígeno-anticorpo.

Repetidas provas de precipitina em tubos mostraram-se incapazes de revelar a reação esperada. É possível que a razão disso esteja na menor sensibilidade do teste, que não permite a observação de pequena quantidade do precipitado antígeno-anticorpo formado nas combinações com anti-soros pouco eficientes. Espera-se, pois, que melhoramentos no processo de imunização, acarretando formação de maior teor de anticorpo, torne viável o teste de precipitina em tubos.

Apesar da limitação existente com respeito ao uso de outros testes que não o de difusão em ágar, já é perfeitamente viável a aplicação de anti-soro obtido em trabalhos de natureza prática.

Nos exames eletrôn-microscópicos, pôde-se observar que as partículas do vírus da necrose branca do fumo apresentavam conformação

aproximadamente esférica e com um diâmetro em torno de 50 milimicras. Contudo, é de se esperar que determinações da forma e tamanho das partículas, com técnicas mais adequadas, venham comprovar ou não a suspeita sobre a pouca consistência das mesmas, assim como revelar valores mais exatos das suas dimensões.

### SUMMARY

This work presents the results of the purification of the Brazilian tobacco streak virus from material of different three host plant species.

The procedure consisted of a preliminar clarification through the adsorption of several components of the juice from diseased plants extracted with phosphate buffer at pH 8,0, 0,1, M and sodium diethyl dithio carbamate at 0,1 M on hidrated calcium phosphate and two or more ultracentrifugation cycles.

Pellets were obtained from diseased *Nicotiana tabacum* L. var. *xanthi*, *Solanum nigrum* L. and *Datura stramonium* and never from the healthy control plants after two ultracentrifugations. Suspension of such pellets in phosphate buffer and sodium diethyl dithio carbamate were infectious up to the third day after the juice extraction.

The purified preparations when examined under electron microscope showed particles approximately spherical with a diameter around 50 mn.

The preparations obtained after the clarification and one ultracentrifugation cycle when infected daily, intravenously, in one rabbit during 7 days promoted antibody formation to the Brazilian streak virus. The presence of antibody in the antiserum could be demonstrated in gel diffusion tests, but not in precipitin tests.

### BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. COSTA, A. S. The relationship between American tobacco streak and Brazilian «necrose branca» or «couve». *Phytopathology* 35:1 029-1 030. 1945.
2. ——— & ANA MARIA B. CARVALHO. Studies on Brazilian tobacco streak. *Phytopath. Z.* (No prelo).
3. ———, LIMA, A. R. & FORSTER, R. Necrose branca, uma moléstia de vírus do fumo (*Nicotiana tabacum* L.) e «fumo couve» como sintoma tardio. *J. Agron. Piracicaba* 15:133-140. 1940.
4. ———, PINTO, A. J. D'ANDRÉA & NEVES, O. S. Um mosaico do algodoeiro causado pelo vírus da necrose branca do fumo. *Bragantia* 13: I-III. 1954.
5. FULTON, R. W. A rapid method for partial purification of some unstable plant viruses (Abstract). *Phytopathology* 47:521. 1957.
6. ——— Purification of Sour Cherry Necrotic Ring Spot and Prune Dwarf viruses. *Virology* 9:522-535. 1959.
7. HAMPTON, R. E. & FULTON, R. W. Factors responsible for the instability of some labile plant viruses (Abstract). *Phytopathology* 49:540. 1959.

8. OUCHTERLONY, O. Antigen-antibody reactions in gels. Ark. Kemi. Mineral, Geol. 26B, n.º 14, 1. 1949.
9. SLOGTEREN, D. H. M. van. Gel diffusion of tobacco mosaic virus demonstrated by serological analysis of its components and by electron microscopy. Acta Botan. Neerl. 4:472. 1955.
10. SMITH, K. M. A text book of plant virus diseases. Boston, Little, Brown and Company, 1957. 652 p.
11. STANLEY, W. M. & WYCKOFF, R. W. G. The isolation of tobacco Ring Spot and other virus proteins by ultracentrifugation. Science 85: (n.º 2198):181-183. 1937.
12. STEERE, R. L. Purification and properties of tobacco Ring Spot virus. Phytopathology 46:60-69. 1956.