

B R A G A N T I A

Boletim Científico do Instituto Agronômico do Estado de S. Paulo

Vol. 28

Campinas, janeiro de 1969

N.º 1

MORFOLOGIA DAS PARTÍCULAS DO VÍRUS DO ANEL DO PIMENTÃO (1)

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

SINOPSE

Partículas tubulares, ca. 25 $m\mu$ em diâmetro externo e com um canal axial de 4 $m\mu$ de largura, foram observadas em preparações rápidas ou purificadas e no interior de tecidos de plantas infetadas pelo vírus do anel do pimentão (VAP). Dois tipos de partículas, quanto ao comprimento normal, respectivamente 55 e 200 $m\mu$, foram notadas em preparações *in vitro*, e com infetividade associada somente às partículas longas.

Partículas, de preparações purificadas, quando incubadas com ribonuclease ou tripsina, não se alteravam, embora em algumas das experiências a tripsinização houvesse induzido uma agregação terminal das partículas. Quando aquecidas a temperaturas superiores a 65-70°C/10', há, paralelamente à redução da infetividade, uma decomposição dos virions, que se transformam em material pulverulento.

Em secções ultra-finas de tecidos infetados foram encontrados agregados ordenados de partículas similares àquelas encontradas *in vitro*, no citoplasma. Essas inclusões constituíam-se somente de partículas longas (ca. 200 $m\mu$), e a ausência de grupos de partículas curtas características sugere que estas representem fragmentos aproximadamente iguais a 1/4 das longas.

1 — INTRODUÇÃO

Uma moléstia de vírus afetando o pimentão foi recentemente encontrada no município de São Carlos, S.P. O vírus causador foi denominado vírus do anel do pimentão (VAP). Posteriormente outros isolados deste vírus foram encontrados em dife-

(1) Parte da tese para doutoramento apresentada pelo autor principal. Parcialmente subvencionada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (C. Agron. 66/107) e pelo Conselho Nacional de Pesquisas (TC 4827). Recebida para publicação em 7 de outubro de 1967.

rentes localidades. As características biológicas e determinações preliminares da morfologia e relações serológicas do VAP mostraram ser êle integrante do grupo do vírus do "rattle" do fumo (8).

No presente trabalho descrevem-se detalhes da morfologia das partículas do VAP, observados em preparações rápidas ou purificadas e no interior das células infetadas, bem como o efeito de certos tratamentos físicos e químicos sôbre a estrutura das partículas.

2 — MATERIAL E MÉTODOS

Virus — Quatro isolados do VAP — São Carlos, *Bidens*, Itapeva e Jacutinga (8) — mantidos na coleção da Seção de Virologia, Instituto Agrônômico, foram utilizados no presente estudo.

Plantas hospedeiras — As seguintes plantas, sadias ou infetadas com um dos isolados do VAP acima mencionados, foram empregadas nesta investigação: Solanaceae — fumo (*Nicotiana tabacum* L.)-s (2); *N. glutinosa* L.-s; maria-pretinha (*Solanum nigrum* L.)-s; pimenta (*Capsicum pendulum* Wild.)-s; pimentão (*Capsicum annuum* L.)-s; tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.)-s; *Physalis* sp.-s; Chenopodiaceae — *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn.-ll; *C. quinoa* Wild.-ll; *C. murale* L.-ll; Labiatae — cordão-de-frade (*Leonotis nepaetifolia* L.)-s; Amaranthaceae — perpétua (*Gomphrena globosa* L.)-s; Compositae — girassol (*Helianthus annuus* L.); emília (*Emília flammea* L.)-s; picão (*Bidens pilosa* L.)-s. Estas plantas-teste foram mantidas em estufa, após terem sido inoculadas mecânicamente com um dos quatro isolados do VAP, e utilizadas para microscopia electrónica, quando mostravam sintomas conspícuos da infecção.

Preparações rápidas para microscopia electrónica — Amostras de folhas de plantas, infetadas ou sadias, foram preparadas para microscopia electrónica pela técnica do "leaf-dip" convencional (1) ou combinada com a da contrastação negativa (21). As partículas observadas ao microscópio electrónico (3) foram fotografadas a 5.000 ou 20.000x e medidas a uma magnificação final de 50.000x. O comprimento das partículas foi distribuído em classes de 25 mμ

(2) s — infecção sistêmica; ll — lesões locais.

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

de intervalo. Em alguns casos, medições comparativas das partículas do VAP e do vírus do mosaico comum do fumo (VMCF) foram efetuadas para o controle dos resultados.

Contratação negativa e positiva de preparações purificadas — Preparações purificadas do VAP, obtidas a partir de suco de plantas de fumo, sistemicamente infetadas pelo isolado São Carlos, através de ciclos de ultracentrifugação diferencial e em gradiente de densidade (30), foram utilizadas para investigar a ultraestrutura de suas partículas após serem contrastadas negativa (4) ou positivamente (19), respectivamente com solução de ácido fosfotúngstico a 1% e solução saturada de acetato de uranila.

Tratamento enzimático do VAP — A fim de avaliar o efeito da tripsina e/ou ribonuclease sobre as partículas do VAP, preparações purificadas, antes ou depois da ultracentrifugação em gradiente de densidade, foram incubadas em presença destas enzimas, a concentração final de 1%, em banho-maria a 37°C, durante uma hora. Findo o tratamento, amostras do material incubado e do controle (aquecido ou não) foram examinadas ao microscópio eletrônico, antes e depois de serem ultracentrifugadas para eliminar as enzimas. Amostras do material ultracentrifugado foram testadas quanto à sua infetividade.

Tratamento térmico do VAP — O efeito do tratamento térmico sobre a estrutura das partículas do VAP foi verificado, examinando-se preparações purificadas e infetivas do VAP, antes e depois de serem aquecidas. Aliquotas do sobrenadante de preparações aquecidas à temperatura constante, durante 10 minutos, de 40°C a 90°C, a intervalos de 5°C e centrifugadas a 5.000 rpm/10', foram contrastadas negativamente e examinadas ao microscópio eletrônico, enquanto outra porção era testada quanto à sua infetividade.

Secções de partículas presentes em preparações purificadas e infetivas, sedimentadas por ultracentrifugação — Partículas presentes em preparações purificadas e infetivas do VAP foram sedimentadas (130.000 g/60') e fixadas em ácido ósmico (OsO₄) a 1%, em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7, durante 12-18 horas (28). A seguir foram desidratadas em série de concentração crescente de acetona e incluídas em Epon 812 (26). Os blocos obtidos foram seccionados em um ultramicrotomo Porter-Blum, modelo MT-1, utilizando-se navalhas de vidro. As secções foram contrastadas com citrato (32) ou hidróxido (20) de chumbo e acetato de uranila (37).

Secções de tecidos de plantas injetadas pelo VAP — Pequenos fragmentos de tecido foliar (tomateiro, picão, fumo, *Nicotiana glutinosa*, pimenta, pimentão, perpétua, *Chenopodium amaranticolor* e maria-pretinha), tecido radicular (tomateiro, fumo), tecidos da flor e do fruto (tomateiro) de plantas infetadas com um dos isolados do VAP foram fixados e processados para histologia electrónico-microscópica, como acima descrito para as partículas de preparações purificadas sedimentadas.

3 — RESULTADOS

Em tôdas as preparações rápidas (“leaf dip” convencional ou combinado com contrastação negativa) obtidas de plantas infetadas pelo VAP, partículas em forma de bastonetes rígidos, de 20-25 $m\mu$ de diâmetro, foram consistentemente encontradas (estampas 1, 2A, 2B). Em nenhum caso foram elas detectadas em plantas contrôles, não inoculadas. Estas partículas eram de dois tipos predominantes quanto ao comprimento, e a curva de distribuição dêste formava dois picos conspícuos nas classes de 50 e 200 $m\mu$ (figura 1). O comprimento normal (CN) destas partículas foi calculado baseado nesta curva de distribuição (2), obtendo-se os valores de 54 e 199 $m\mu$ para o total das partículas medidas (cêrca de 8 mil) (quadro 1). 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 (1) ou combinado com a contrastação negativa (21) (figura 2A e quadro 2A).

Determinação do CN das partículas do VAP e do VMCF, em condições comparativas, deu sistematicamente valores ao redor de 300 $m\mu$ para o VMCF e 55 e 200 $m\mu$, respectivamente, para as partículas curtas e longas do VAP (figura 2B e quadro 2B).

A proporção entre partículas longas e curtas, nas preparações rápidas, variava de um valor pouco inferior à unidade, até cêrca de 20 longas para 1 curta, tendo sido em média 2,5 (quadro 1). Deve-se contudo mencionar que para obtenção das micrografias electrónicas, para economia de tempo e material, seleccionavam-se áreas em que a concentração das partículas longas era maior que a usual (ca. 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, provâvelmente mitocôndrios (estampa 1-A, C, E).

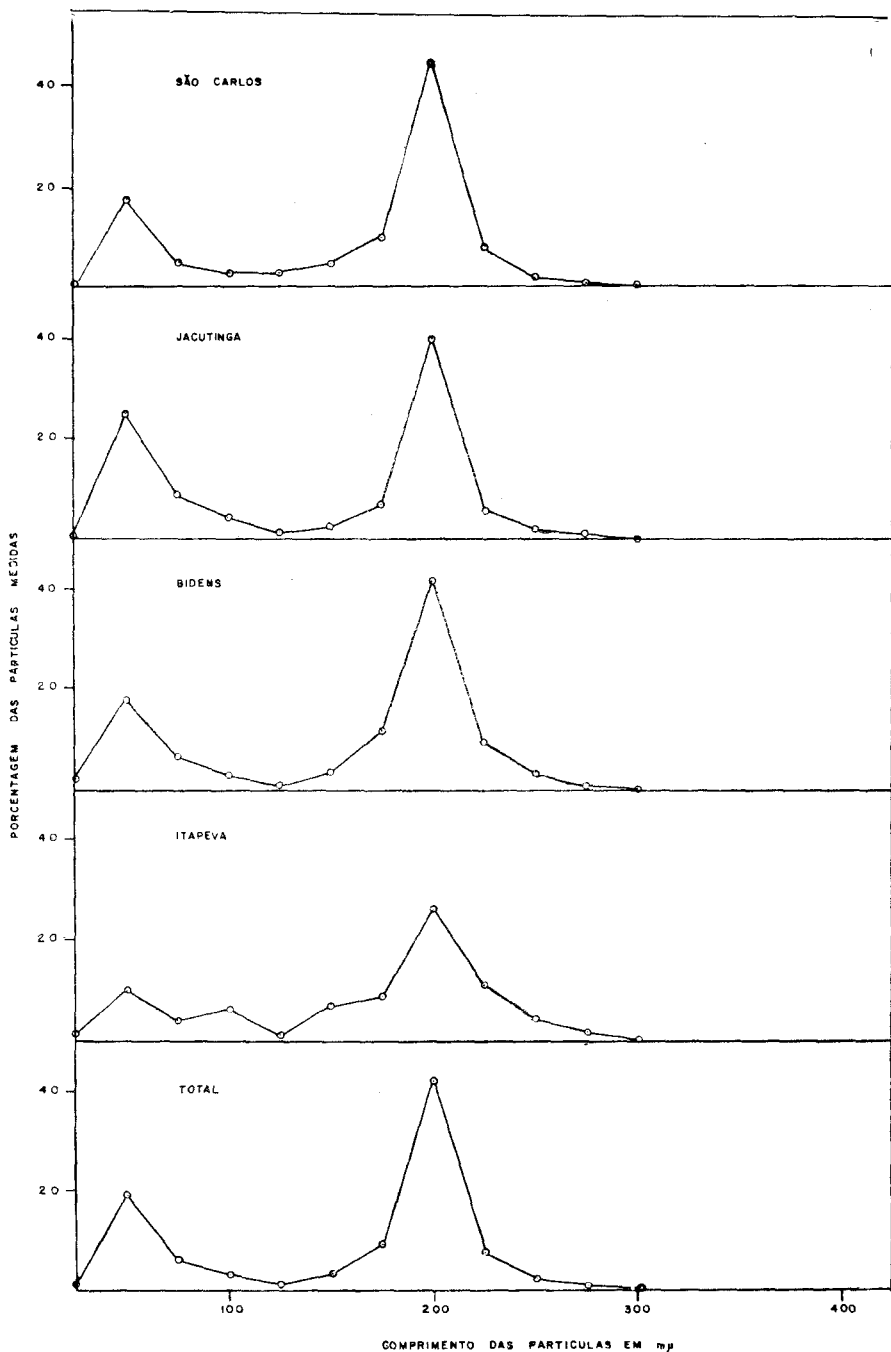


Figura 1. — Curva de distribuição dos comprimentos das partículas de diferentes isolados do VAP. Preparações feitas pelo método do "dipping" convencional ou combinadas com contrastação negativa.

QUADRO 1. — Resultado geral das determinações dos comprimentos normais plantas

Planta hospedeira	Isolado									
	São Carlos					Jacutinga				
	$n_1^{(1)}$	CN ₁	n_2	CN ₂	N	n_1	CN ₁	n_2	CN ₂	N
Fumo	346	53	565	199	1105	66	59	157	201	275
<i>N. glutinosa</i>	74	55	167	200	279	153	58	174	201	374
<i>Physalis sp</i>	24	55	56	198	104	---	---	---	---	---
Tomateiro	21	56	160	200	193	42	57	114	204	227
Maria-pretinha	--	--	---	---	---	---	---	---	---	---
Pimentão	16	55	77	204	106	31	56	159	202	220
Fimenta	98	53	309	199	469	60	55	173	197	251
Emília	5	50	125	198	169	---	---	---	---	---
Girassol	45	54	72	197	129	---	---	---	---	---
Picão	--	--	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>C. amaranticolor</i>	52	54	161	199	235	74	54	124	199	221
<i>C. quinoa</i>	51	58	163	200	254	284	52	180	196	502
<i>C. murale</i>	29	52	120	196	175	---	---	---	---	---
Perpétua	37	55	194	200	274	95	57	130	197	279
Cordão-de-frade	11	50	75	200	91	---	---	---	---	---
TOTAL	809	54	2244	199	3583	805	55	1211	199	2349

⁽¹⁾ n_1 — número de partículas nas classes de 25 a 75 mp, inclusives; n_2 — idem, respectivamente, comprimento normal das partículas curtas e longas, em mp.

de quatro isolados do vírus do anel do pimentão que infeta diferentes hospedeiras

Isolado										TOTAL				
Bidens					Itapeva									
n ₁	CN ₁	n ₂	CN ₂	N	n ₁	CN ₁	n ₂	CN ₂	N	n ₁	CN ₁	n ₂	CN ₂	N
98	54	83	202	217	25	54	72	200	116	530	54	877	199	1763
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	227	57	341	200	653
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	24	55	56	198	104
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	63	57	274	200	420
22	50	135	200	159	---	---	---	---	---	22	50	135	200	159
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	47	55	236	202	326
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	158	54	482	199	720
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	5	50	125	198	169
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	45	54	72	197	129
207	56	567	199	875	---	---	---	---	---	207	56	567	199	875
---	---	---	---	---	43	54	129	202	289	169	54	414	200	628
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	335	53	343	198	756
49	50	140	197	199	---	---	---	---	---	78	51	260	197	374
96	53	120	201	248	---	---	---	---	---	228	55	444	198	901
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	11	50	75	200	91
481	54	1198	198	1903	68	54	201	201	445	2163	54	4854	199	8280

nas classes de 175 a 200 μ : N — número total de partículas medidas: CN₁ e CN₂ —

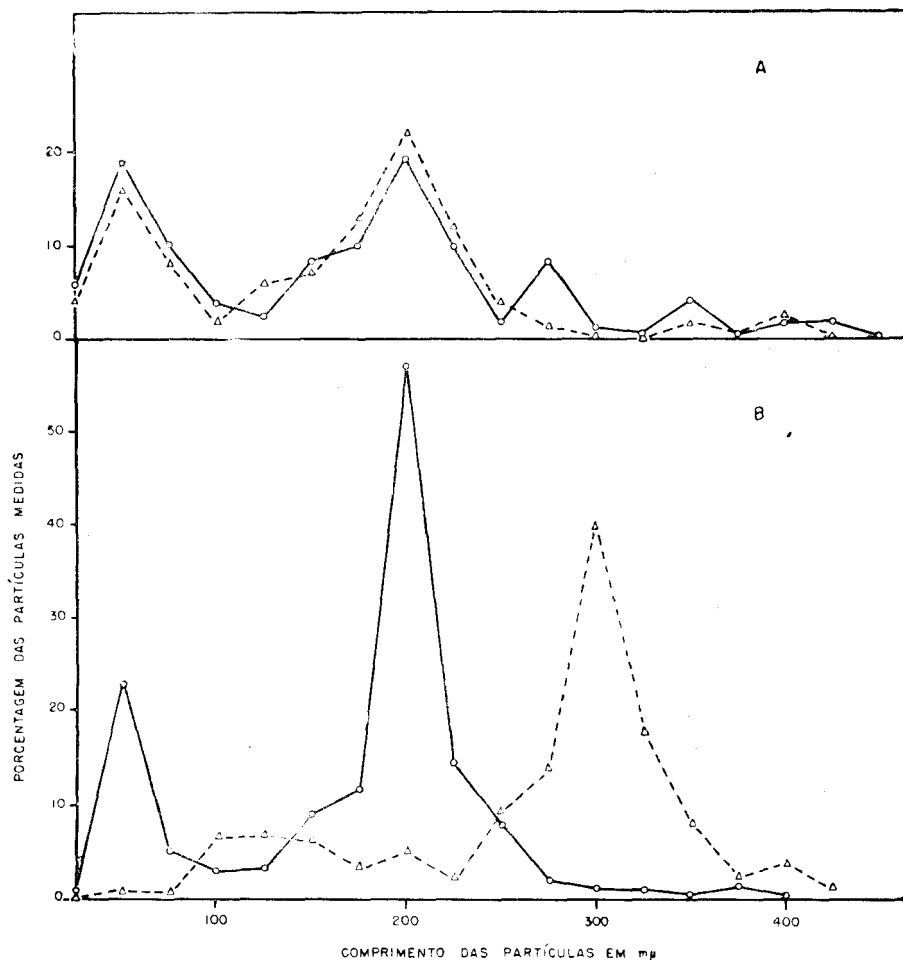


Figura 2. — A- Curva de distribuição dos comprimentos das partículas do isolado São Carlos do VAP, em preparações feitas pelo método do "dipping" convencional (o—o) ou combinado com contrastação negativa (Δ---Δ); B- idem, das partículas do isolado São Carlos do VAP (o—o) e do VMCF (Δ---Δ), obtidas de plantas de fumo, e medidas em condições comparativas.

Em preparações purificadas do VAP houve também predominância dos dois tipos de partículas quanto ao comprimento (estampa 6-A). Estas formavam uma curva de distribuição tipicamente bimodal, não tendo sido, os valores dos CN determinados, diferentes daqueles obtidos em preparações rápidas (figura 3-A e quadro 3). Nestas preparações houve contudo a prevalência das partículas curtas sobre as longas (figura 3-A).

QUADRO 2. — Comprimento normal das partículas do VAP. A — Preparações feitas pelo método do “leaf dip” convencional versus “leaf dip”-contrastação negativa; B — Medição comparativa das partículas do VAP (isolado de São Carlos) e do VMCF

Virus e/ou tratamento	n_1 ⁽¹⁾	CN ₁	n_2	CN ₂	N
A. Isolado São Carlos do VAP, fumo					
“leaf dip” convencional	40	52	40	200	116
“leaf dip”-contrastação negativa	64	52	109	199	233
B. Medição comparativa de partículas dos vírus					
VAP (fumo)	83	53	237	200	342
VMCF (fumo)	—	—	235 ⁽²⁾	301	344

(¹) n_1 — número de partículas nas classes de 25 a 75 μ m, inclusives; n_2 — idem, nas classes de 175 a 225 μ m; N — número total de partículas medidas; CN₁ e CN₂ — respectivamente, comprimento normal das partículas curtas e longas.

(²) Número de partículas nas classes de 250 a 350 μ m, inclusives.

A ultracentrifugação das preparações purificadas do VAP, em gradiente de densidade, produz duas camadas distintas (29, 33). Uma, a 25 mm do menisco, denominada de tópo, que contém predominantemente partículas curtas (estampas 2-C, 3-B; figura 3-B; quadro 3). A outra, mais abaixo, a 35 mm do menisco, designada de fundo, constituía-se quase exclusivamente de partículas longas (estampas 2-D, 3-C; figura 3-C; quadro 3). Usualmente a contaminação da camada de fundo pelas partículas curtas foi maior que a da camada de tópo, pelas longas (figura 3-B, C). Com um ciclo adicional de ultracentrifugação em gradiente de densidade (30), esta mistura diminuiu consideravelmente (quadro 3; figura 3-B, C).

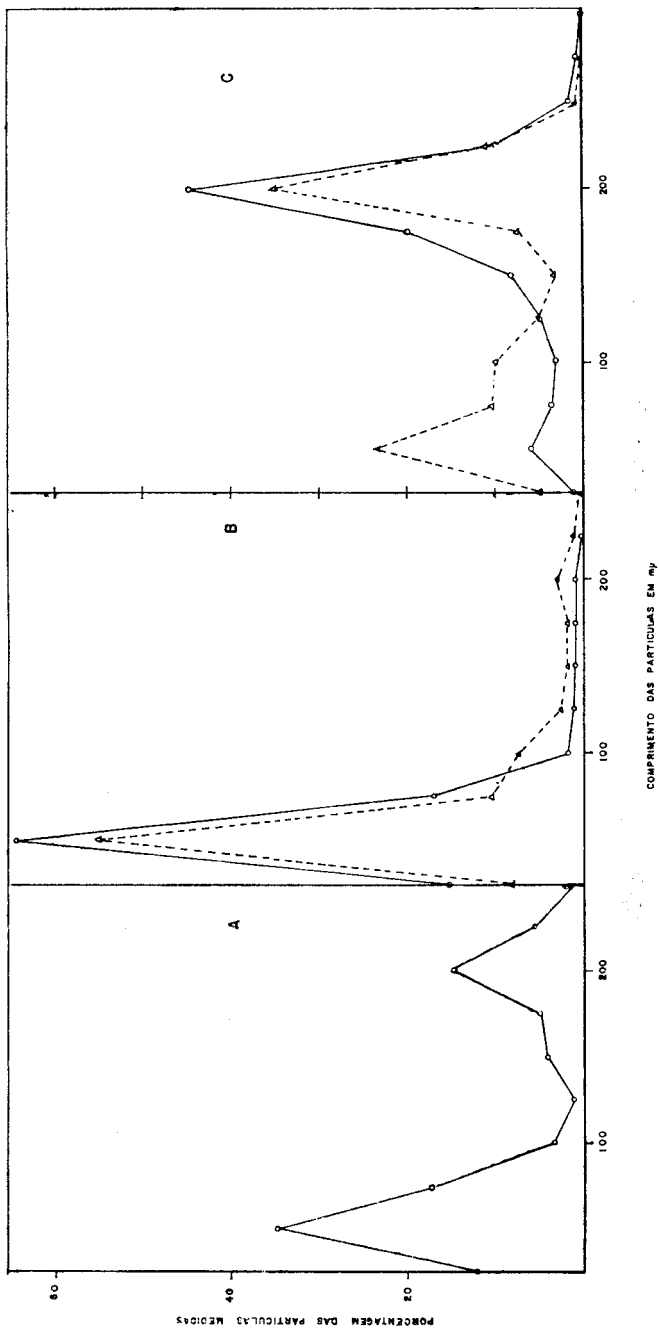


Figura 3. — Curva de distribuição dos comprimentos das partículas do VAP, em preparações purificadas, antes (A) e depois (B, C) de serem ultracentrifugadas em gradiente de densidade. B. Distribuição do comprimento das partículas na camada de tópo, e C- na de fundo (o—o com 2 ciclos, e A--Δ, com 1 ciclo de ultracentrifugação em gradiente de densidade).

QUADRO 3. — 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	$n_1^{(1)}$	CN ₁ (m μ)	n_2	CN ₂ (m μ)	N
Antes da ultracentrifugação em gradiente de densidade UCGD	185	52	69	201	284
Camada de tópo, após 1 ciclo de UCGD ..	197	51	15	198	270
Idem, após 2 ciclos	214	52	5	195	220
Camada de fundo, após 1 ciclo de UCGD	164	53	228	201	431
Idem, após 2 ciclos	77	56	534	198	712

(¹) n_1 — número de partículas nas classes de 25 a 75 m μ , inclusives; n_2 — idem, nas classes de 175 a 225 m μ ; N — número total de partículas medidas; CN₁ e CN₂ — respectivamente, comprimento normal das partículas curtas e longas.

Preparações purificadas e contrastadas negativa ou positivamente, revelaram certos detalhes ultraestruturais das partículas (estampa 3). Do ponto de vista estrutural, não houve diferenças entre as partículas curtas e longas, exceto obviamente o comprimento. Ambas são tubulares, com diâmetro externo de *ca* 25 m μ . O canal axial foi claramente visível nas preparações contrastadas negativamente, quando fragmentos anelares ficavam de tópo, e as mensurações mostraram que seu diâmetro era *ca.* 4 m μ . Ocasionalmente, a contrastação com acetato de uranila revelava bandas transversais ao longo das partículas, espaçadas de *cêrca* de 30-40 \AA (estampa 3-D). As extremidades das partículas não eram iguais, sendo uma delas ligeiramente convexa e a outra côncava; nesta, o canal axial comumente se alargava um pouco.

A incubação de preparações purificadas do VAP, com tripsina e/ou ribonuclease (RNase) a 37°C/60', não afetou sensivelmente a infetividade deste vírus e tampouco a estrutura de suas partículas. Mas, em 3 das 5 experiências realizadas, notou-se o

efeito da tripsina, traduzido pela agregação terminal, tanto nas preparações que continham partículas curtas como naquelas com partículas longas (estampa 4-A a F; figura 4-A, B). Testes indicaram que a tripsinização das preparações não infetivas, que continham partículas curtas somente, não as tornou capazes de iniciar infecção, mesmo com a agregação terminal e conseqüente aparecimento de partículas de 200 m μ ou mais de comprimento.

Os testes de infetividade mostram que a atividade do vírus em preparações aquecidas se mantém até cerca de 60-65°C, caindo sensivelmente a 70°C/10' e praticamente desaparecendo a 75°C/10' (8, 30).

O exame ao microscópio eletrônico de amostras de preparações que encerravam somente partículas curtas revelou que o tratamento a 60°C/10' já ocasionava a decomposição das partículas, o que se acentua a 65°C/10'; a 70°C/10' as partículas literalmente desaparecem (estampa 5-A a C).

Quanto às partículas longas, elas começam a degradar quando aquecidas a 65°C/10', acentuando-se esta decomposição até 80°C. A temperaturas superiores, as partículas decompõem-se totalmente (estampa 5-D a H).

A degradação térmica das partículas caracterizou-se pela sua transformação em um material pulverulento, constituído de grânulos de 30-40 $\overset{0}{\text{A}}$ de diâmetro. No início da decomposição, apareceram numerosas partículas semidegradadas, aglutinadas pelo material decomposto, formando massas que lembravam precipitados serológicos. A proporção das partículas, mantendo a integridade estrutural, nessas massas diminuía à medida que a temperatura aumentava. Também foi observada freqüentemente uma intensa fragmentação das partículas em pedaços mais curtos e mesmo anelares. Esta fragmentação foi usualmente conspícua nas preparações que continham partículas longas e na faixa de 70-75°C/10', e nas que encerravam as curtas, a 65°C. Por outro lado, em muitos casos puderam ser notadas partículas parcialmente degradadas, mas mantendo ainda a forma original, bem como uma certa intumescência em outras, resultantes do tratamento térmico (estampa 6-A 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 dispersou, formando pequenas massas esferoidais (estampa 5-I). Isso não sucedeu nas preparações em que o vírus estava suspenso em solução tampão.

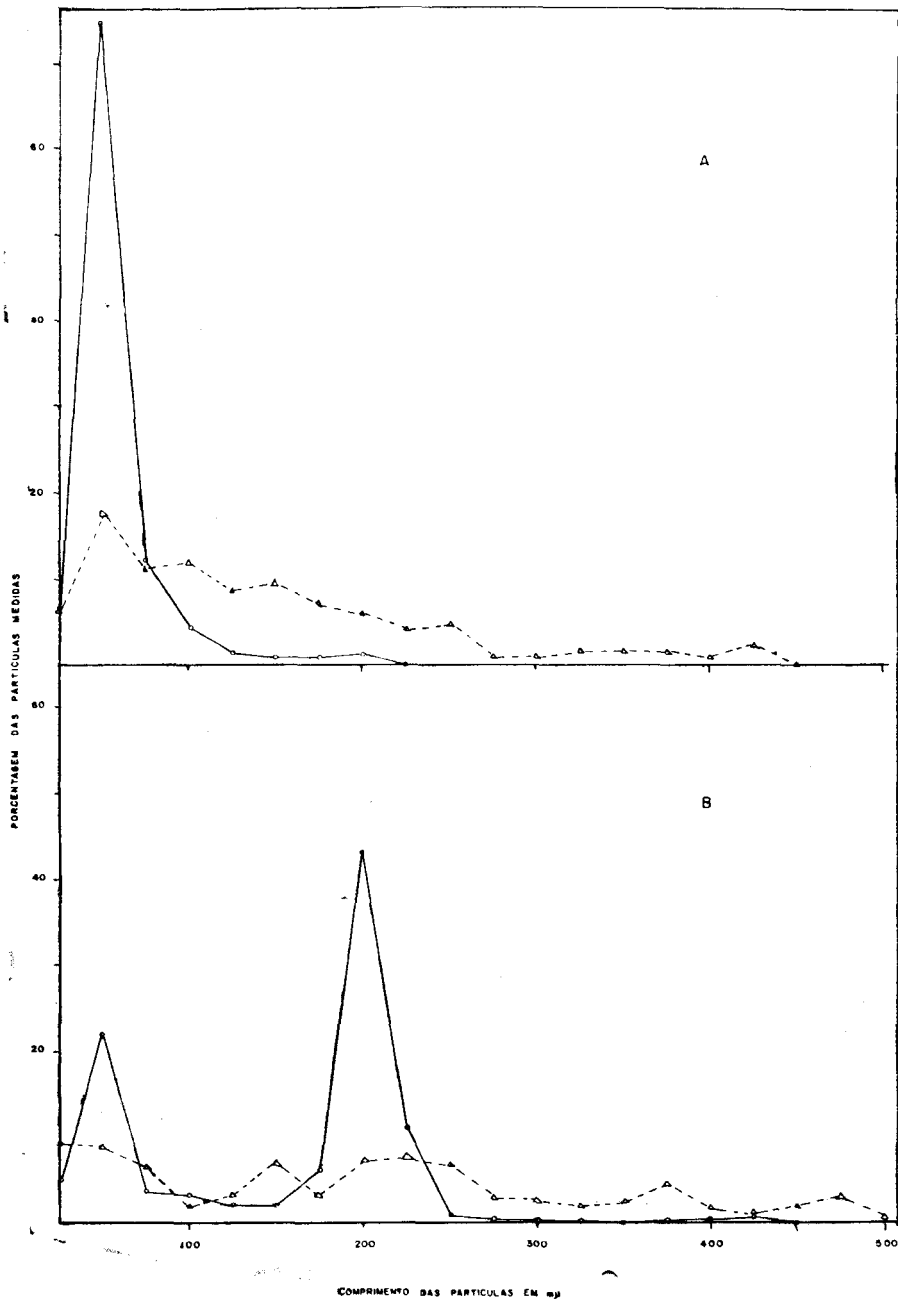


Figura 4. — Curva de distribuição dos comprimentos das partículas da camada de tópo (A) e do fundo (B), tratadas (Δ---Δ) ou não (o—o) com tripsina.

Em secções de partículas presentes em preparações purificadas e infetivas, sedimentadas por ultracentrifugação, foram também encontradas somente partículas alongadas, orientadas ao acaso (estampa 7-A, B). Seu diâmetro era ligeiramente inferior ao das partículas vistas *in vitro*. Nas secções transversais notava-se claramente o orifício central, e, freqüentemente, um anel denso, de ca. $20 \overset{0}{\text{Å}}$ de espessura, aparecia margeando este canal axial (estampa 7-B). O comprimento destas partículas era de difícil determinação. Foram notadas numerosas partículas, bastante longas, indicando ter havido uma agregação terminal. Mesmo assim, ocasionalmente, grupos de partículas de comprimento uniforme, de ca. 200 $\text{m}\mu$, puderam ser encontradas. Apesar da alta rotação necessária para sedimentação, não houve uma compactação muito acentuada das partículas.

Nas secções ultra-finas de tecidos de plantas infetadas pelo VAP foram encontradas sistematicamente inclusões formadas de partículas alongadas, de aspecto tubular, de morfologia geral idêntica àquelas encontradas nas secções de sedimentos de preparações purificadas e infetivas obtidos por ultracentrifugação (estampa 7-C a E). Estas partículas formavam inclusões, nas quais elas se achavam dispostas lado a lado, mais ou menos ordenadamente. Em praticamente todos os agrupamentos, as partículas tinham cerca de 200 $\text{m}\mu$ de comprimento. Em nenhum caso foram notados agregados de partículas mais curtas, sendo alguns possíveis casos atribuíveis à secção oblíqua ou tangencial de grupos de partículas longas. Detalhes das investigações histológicas serão relatados em outra publicação.

4 — DISCUSSÃO

O fato de a infetividade das preparações purificadas do VAP estar consistentemente associada à presença das partículas longas (200 $\text{m}\mu$), claramente demonstrada após serem separadas das partículas curtas por ultracentrifugação em gradiente de densidade, constitui evidência de que as partículas longas representam a forma infetiva do VAP. Como evidência complementar pode-se mencionar: a) constante presença das partículas longas em preparações rápidas obtidas de plantas hospedeiras de espécies e famílias diferentes, infetadas pelo VAP, mesmo daquelas plantas, das quais o vírus ainda não foi purificado, e sua ausência em preparações feitas de plantas sadias; b) A sistemática ocorrência das partículas longas no interior das plantas infetadas.

O CN das partículas curtas e longas do VAP, respectivamente ca. 55 e 200 m μ , determinado no presente estudo, confirma as determinações preliminares (8) e estão de acôrdo com as medições feitas por Harrison e Woods (14), com o isolado *Bidens* do VAP. Não houve variações significativas nos valores obtidos para o CN que pudessem ser atribuídas à diferença do isolado do VAP, da planta hospedeira ou dos métodos de preparo para microscopia electrónica. Isto corrobora as similaridades no comportamento biológico dos diferentes isolados e constitui evidência adicional de que êstes isolados representam estirpes de um mesmo complexo.

Os dados morfológicos do VAP são similares àqueles descritos para os diferentes isolados do vírus do "rattle" do fumo (VRF). Há naturalmente uma certa diferença no comprimento das partículas curtas e longas entre êstes vírus, mas uma determinação precisa sômente poderia ser feita em condições comparativas. Uma investigação neste sentido já foi feita (14), tendo sido verificadas pequenas diferenças no comprimento das partículas longas, e maiores em relação às curtas, nos diferentes isolados investigados. Além disso, verificou-se que o diâmetro do vírus do "early browning" da ervilha (*Pisum sativum* L.) era ca. 6,5% menor que o dos demais isolados do VRF.

A comprovação, ao microscópio electrónico, da simetria helicoidal dos vírus alongados, tem sido feita sômente nos casos em que o nucleocapsídeo helicoidal é menos compacto, como acontece com certos componentes dos myxovírus (17) e do vírus da estomatite vesicular (23, 25), ou com partículas do vírus do amarelo da beterraba (18) e da tristeza do citros (22). Mesmo num caso bastante investigado, como o do VMCF, embora muitos autores afirmassem ter demonstrado sua estrutura helicoidal, já comprovada através de difração de raio-X (16), apenas Finch (10), recentemente, apresentou evidências razoáveis a essa estrutura, ao microscópio electrónico. Deve-se lembrar que há inúmeros artefatos, relacionados ou não à estrutura helicoidal das partículas do vírus, que podem produzir imagens ao microscópio electrónico incompatíveis com a configuração deduzida pelo raio-X (27).

No caso do VAP e do VRF, os dados obtidos não são suficientes para confirmar a simetria helicoidal dos nucleocapsídeos, apesar de os dados preliminares, obtidos pela difração de raio-X, sugerirem tal estrutura (11). As estrias transversais observadas nas partículas do VRF (29, 31) e do VAP não definem perfeita-

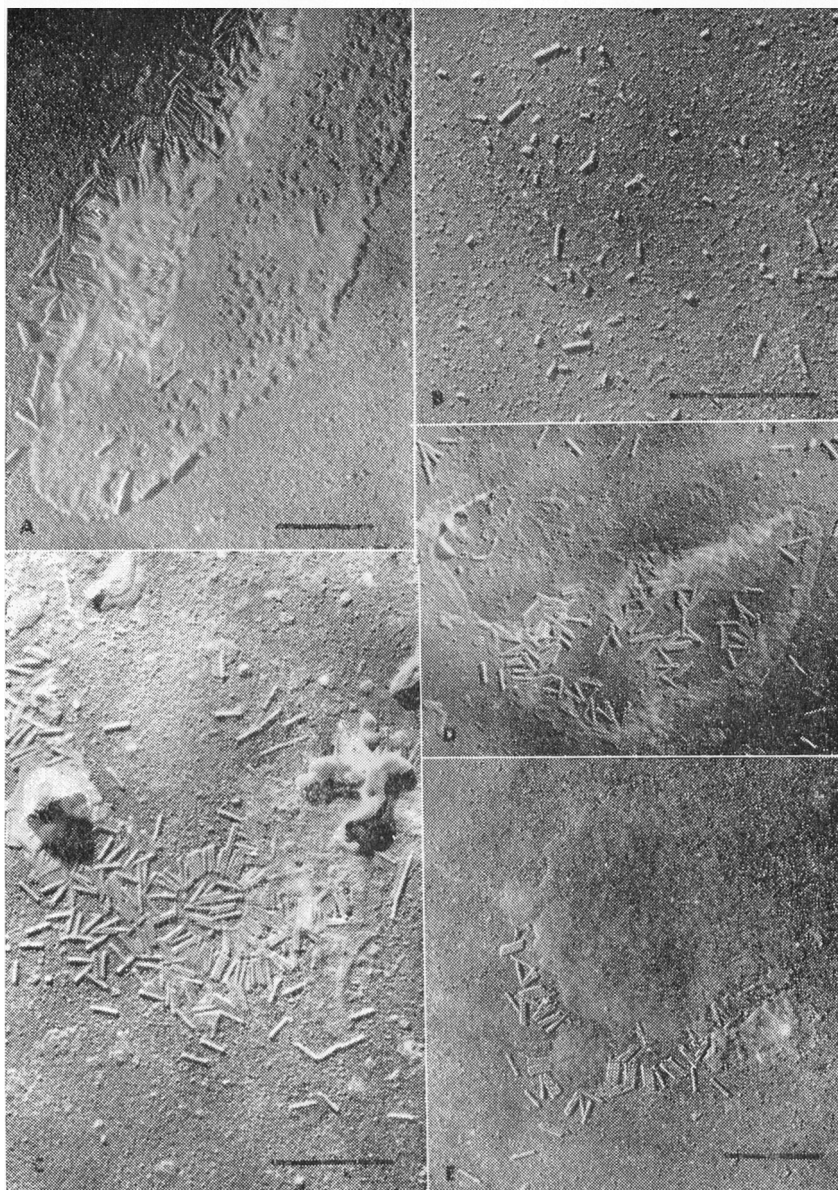
mente se a partícula é formada de subunidades dispostas em hélice ou de pilhas de unidades anelares. Quanto a uma possível configuração helicoidal que as partículas do VAP mostraram quando decompostas termicamente (37), o aspecto produzido é ambíguo, não permitindo tirar conclusões definitivas.

A pequena diferença entre as extremidades das partículas do VAP já fôra apontada para o VRF (14) e para o vírus do mosaico do trigo (3). Acredita-se que ela se deva à forma de banana dos capsômeros, que se dispõem com seu eixo maior ligeiramente inclinado em relação ao eixo maior das partículas (11).

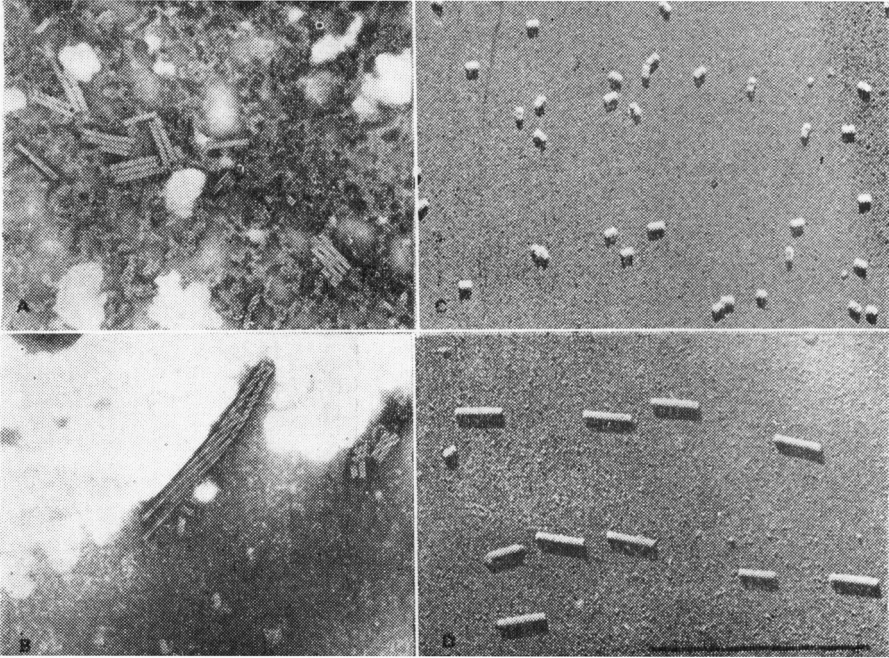
Embora as técnicas de coloração das partículas não trouxessem informações sobre a localização do ácido nucléico nas partículas do VRF, a secção transversal das partículas nos cortes ultra-finos mostrou uma zona anelar, margeando o canal axial, que se impregna bem com acetato de uranila. Como este corante tem marcada afinidade para material nucléico (19), parece provável que essa região anelar seja ocupada pelo ácido nucléico do VAP, o que é compatível com o sugerido para o VMCF (16). Offord (31) relata uma zona também anelar, a 80 \AA do centro das partículas do VRF, mas que, provavelmente, resulta da sobreposição dos capsômeros.

A pequena diferença nos diâmetros das partículas, determinada em preparações contrastadas negativamente e em secções ultrafinas parece ser atribuível à ligeira contração dessas partículas durante a fixação. É interessante mencionar que com um isolado californiano do VRF ocorreu um fenômeno inverso (9).

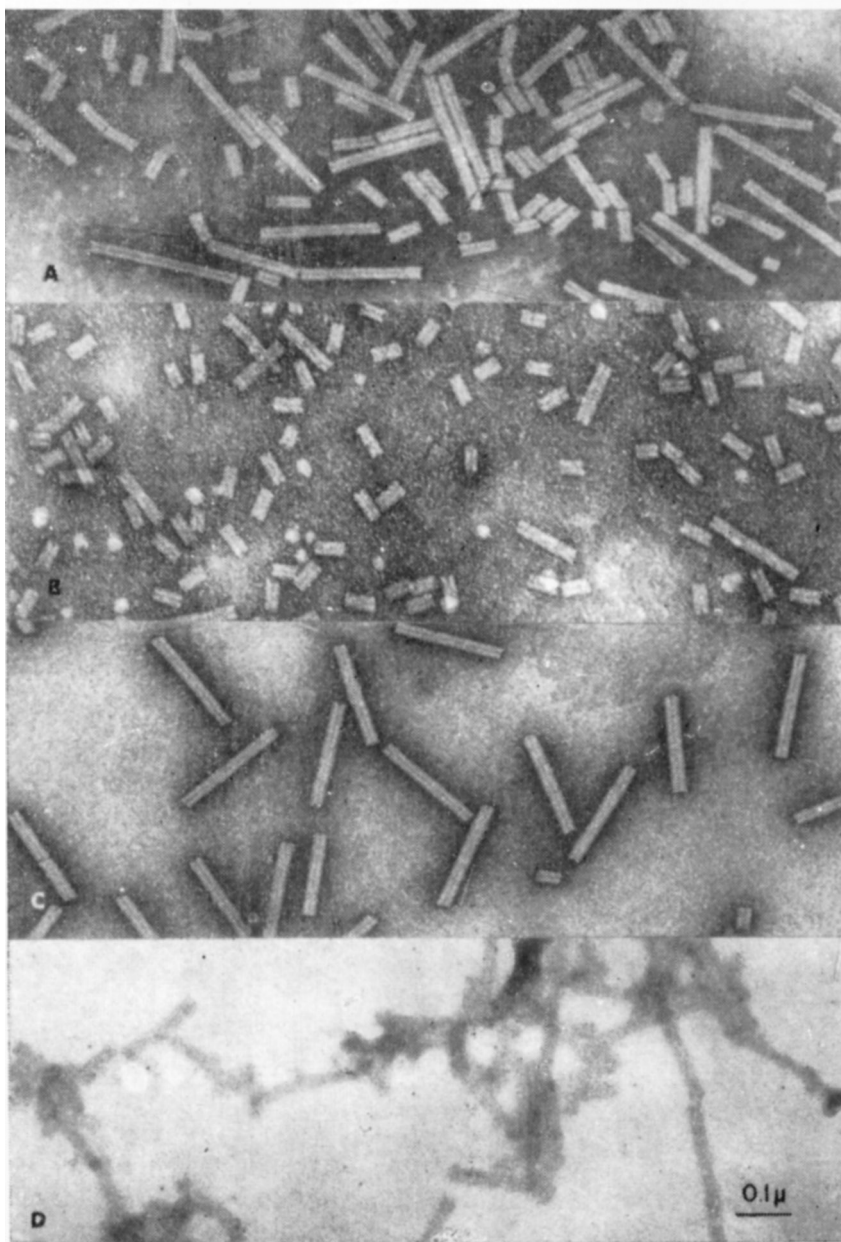
O efeito da tripsina e da RNase sobre a infetividade e estrutura das partículas do VAP foi quase nulo, confirmando o que fôra anteriormente observado para o VAP (34) e para o VRF (29). Todavia, em alguns casos, a tripsina induziu uma agregação terminal das partículas bastante acentuada. No VMCF isto pode ser provocado pela variação do pH do meio de suspensão (36), mas no presente caso não há uma explanação satisfatória. Uma sugestão seria de que a tripsina digeriria ligeiramente as extremidades das partículas, tornando-as suscetíveis de se unirem umas com outras pela extremidade. Os testes da inativação térmica das preparações purificadas do VAP concordam com os resultados obtidos anteriormente com suco de planta infetada (8), e o ponto de inativação térmica parece ser ligeiramente inferior ao do VRF (6).



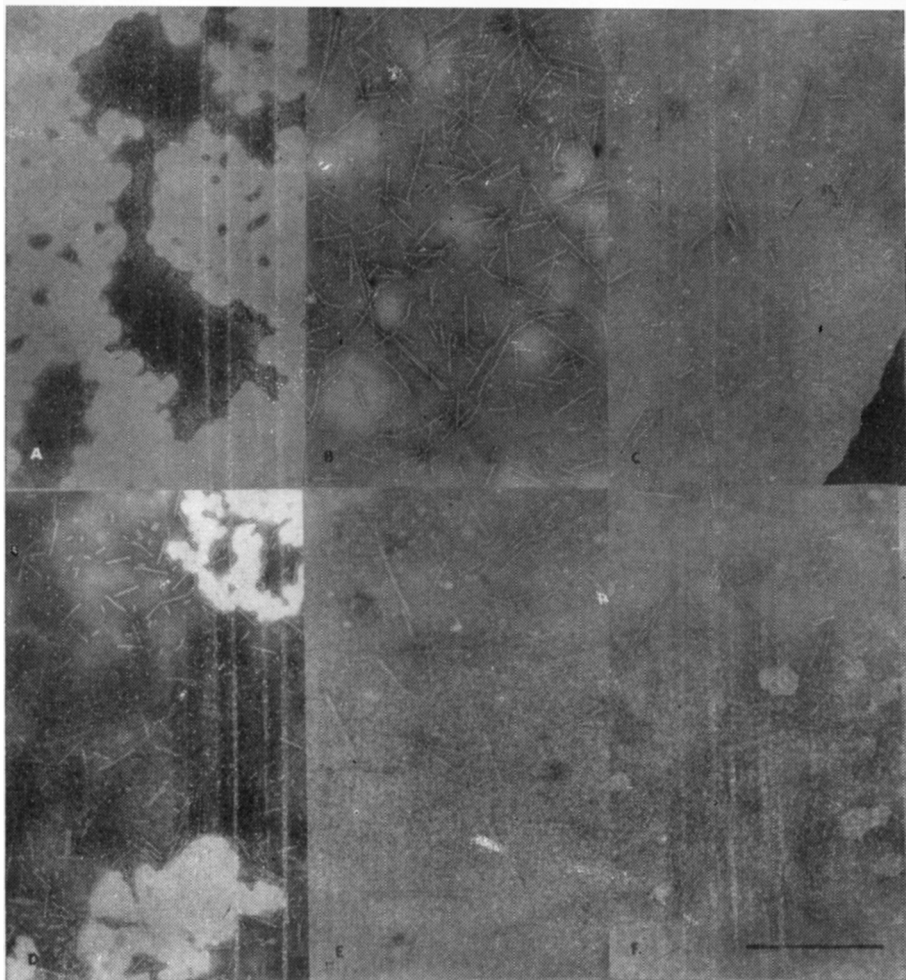
Micrografias electrônicas de preparações feitas pelo método do "dipping", respectivamente das seguintes plantas infetadas pelo VAP: **A** — Emilia; **B** — *Chenopodium quinoa*; **C** — *C. murale*; **D** — *Nicotiana glutinosa*; **E** — Picão. Notar nas figuras **A**, **C** e **E** a associação de partículas dispostas regularmente com uma estrutura, possivelmente mitocôndrio. Em **B** algumas partículas ficaram de tópo, mostrando indícios do canal axial (seta). Nesta e em outras figuras, quando não assinaladas, as escalas de cada micrografia representa 1 μ .



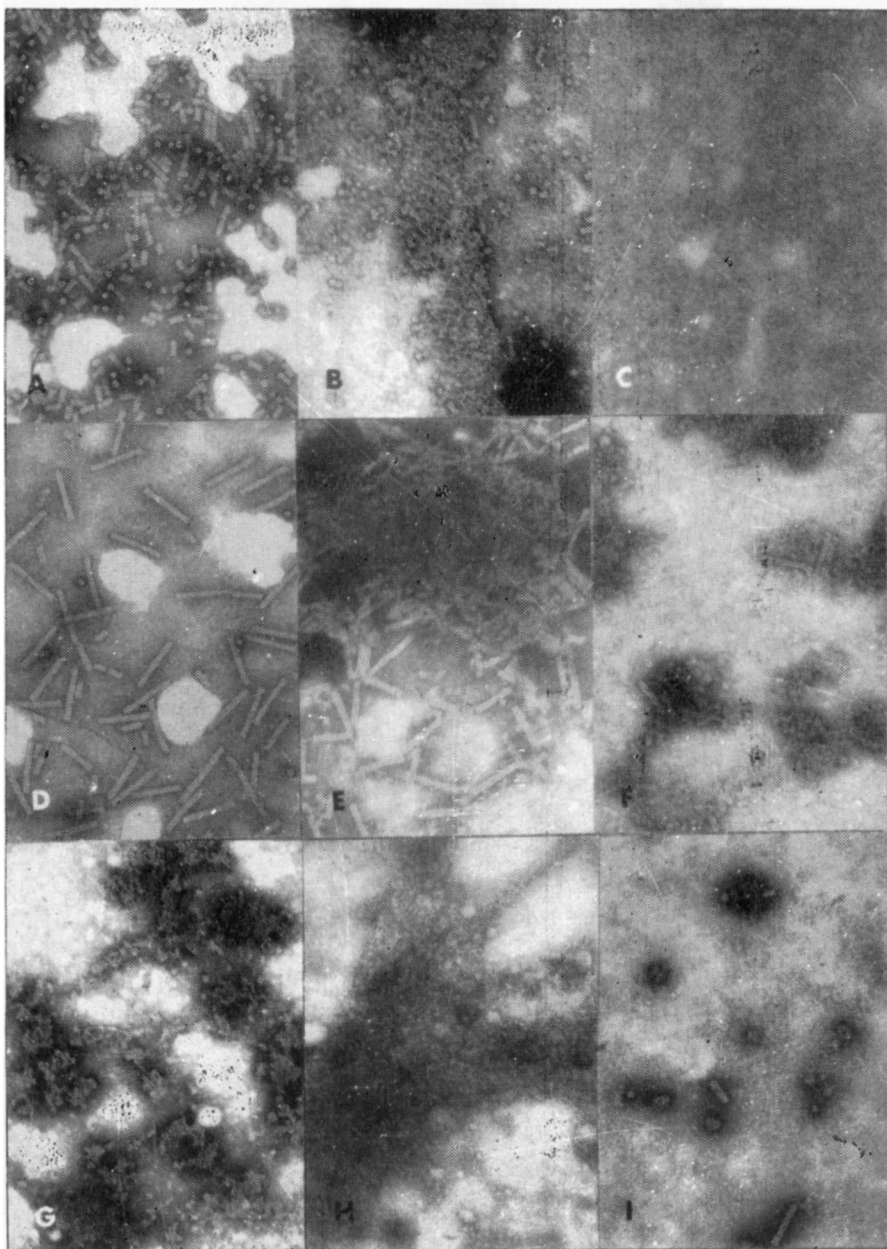
A e B- Preparações feitas pelo método do "dipping", contrastadas negativamente, de pimenteira e fumo, respectivamente. Em **B** aparentemente houve uma agregação terminal de partículas curtas; **C e D-** Preparações purificadas do VAP, em que as partículas curtas (**C**) foram separadas das longas (**D**)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



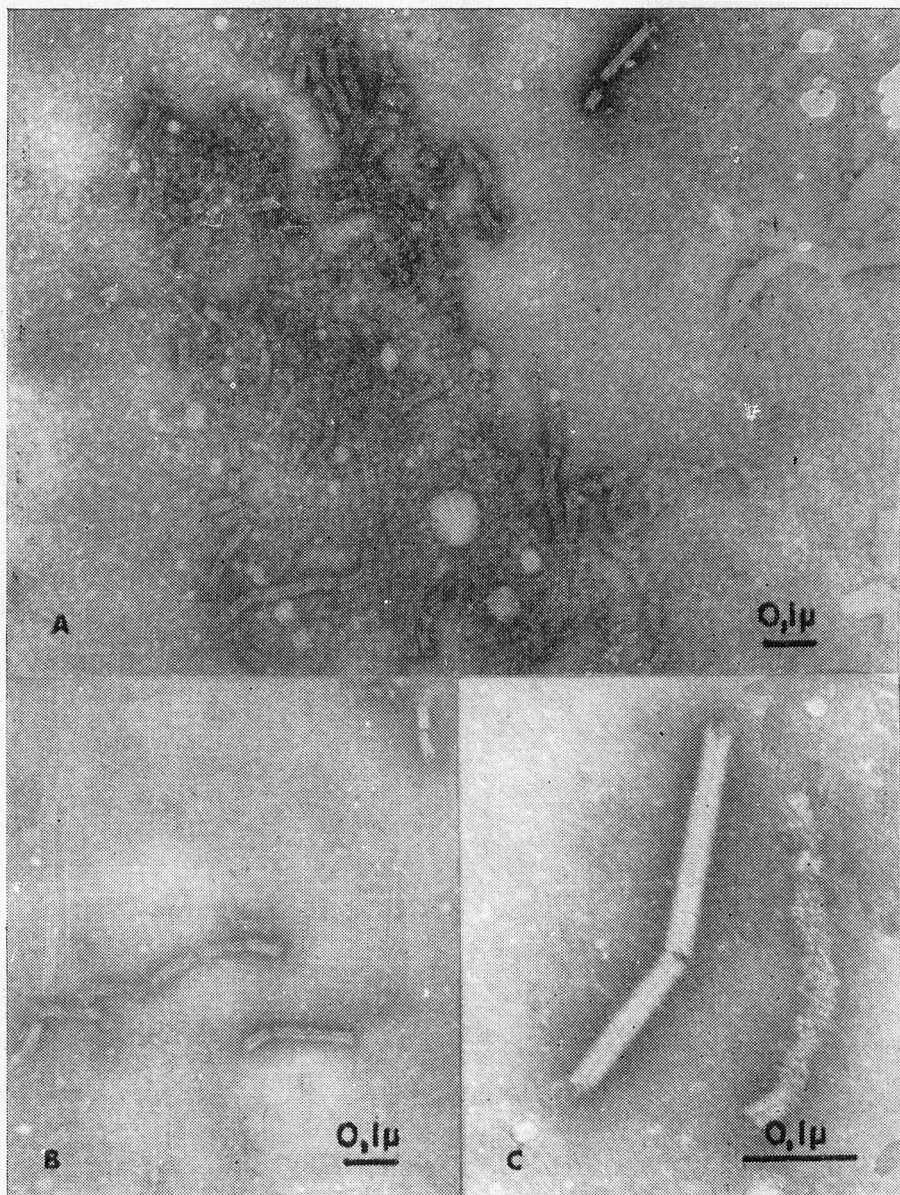
Preparação purificada do VAP contrastada negativamente antes (A) e depois (B e C) da ultracentrifugação em gradiente de densidade. Em B, amostra da camada de topo, constituída predominantemente de partículas curtas, e C, da camada de fundo, compostas quase que exclusivamente de partículas longas. D,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



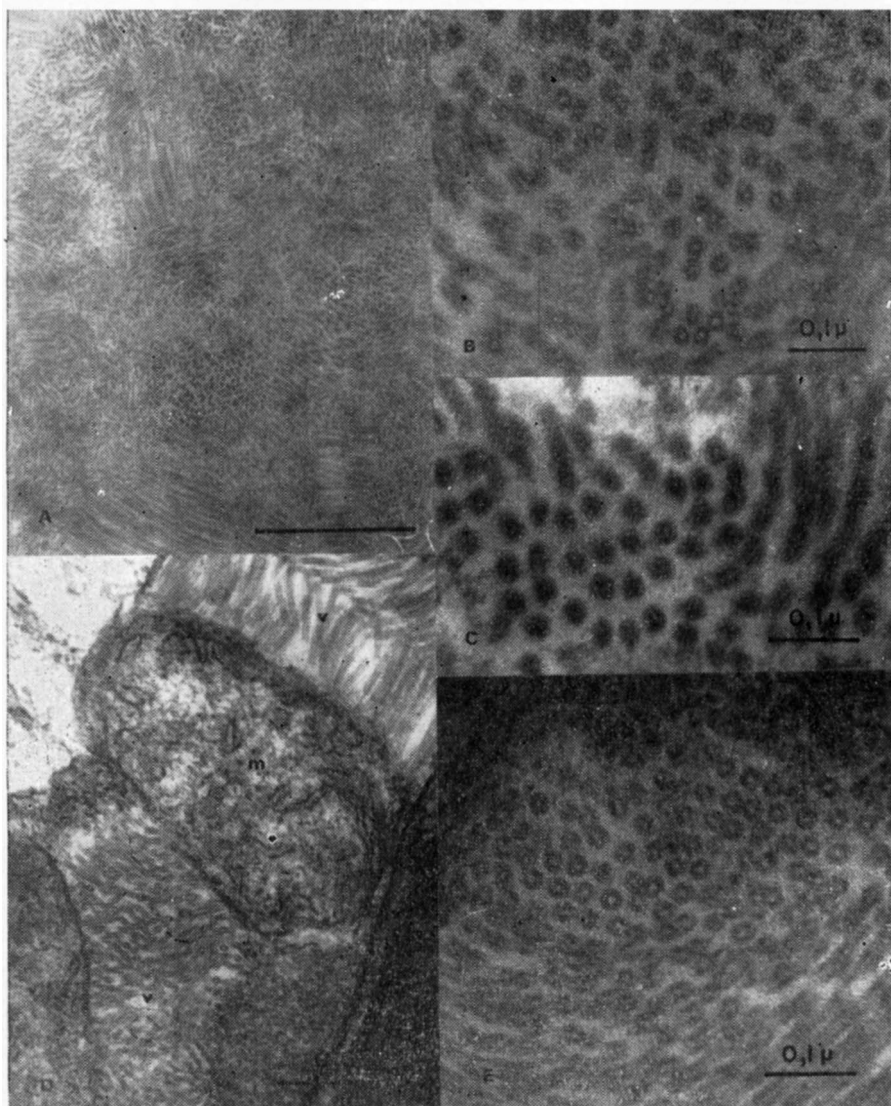
Preparações purificadas contendo partículas curtas (A) ou longas (D), incubadas com tripsina, com (D, F) ou sem (B, E) RNase. Observa-se claramente a ocorrência de uma intensa agregação terminal, tanto das partículas curtas (B, C) como das longas (E, F).



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 $80^{\circ}\text{C}/10'$.



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, finalmente granular de 30-40 Å de diâmetro.



A e B. Secções de sedimentos de preparações purificadas e infetivas 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.

Silva (34) descreve a ruptura de partículas do VAP em pequenos fragmentos anelares ou desorganização e inchamento ao longo das partículas como consequência do aquecimento a temperaturas superiores a 86°C/90". No presente trabalho, notou-se que a decomposição vai além, transformando as partículas em massas amorfas, constituídas de grânulos de 30-40 Å de diâmetro, e que possivelmente representariam um ou mais capsômeros. Embora não seja condição essencial, pois frequentemente as partículas se transformavam diretamente na massa amorfa, a fragmentação das partículas em pequenos pedaços e anéis usualmente precede esta decomposição e parece representar um estágio intermediário deste processo. Isto explicaria porque as preparações que contêm somente partículas curtas são mais sensíveis ao calor do que as que contêm partículas longas.

O aquecimento das partículas do VAP em presença de água destilada, ao invés da solução tampão fosfato, leva à formação de pequenas massas do material decomposto pelo calor, provavelmente decorrente da não dispersão desse material decomposto. Estas observações confirmam, com certos detalhes adicionais, os estudos feitos sobre degradação térmica do VMCF, de que a dispersão da porção decomposta das partículas do vírus seria facilitada pela presença de sais (15).

Além das partículas longas, infetivas, em todas as preparações do VAP e de outros vírus do grupo do VRF, acham-se presentes um ou mais tipos de partículas curtas. Sua natureza é ainda controversa, havendo divergências quanto à sua origem e função. Mas, os trabalhos publicados com diferentes isolados do VRF têm demonstrado consistentemente que partículas curtas, somente, não são capazes de iniciar a infecção, o que também sucede com o VAP. As possíveis alternativas para explicar a natureza das partículas curtas seriam: *a*) Elas representam fragmentos das partículas longas; *b*) As partículas curtas seriam formas intermediárias de um processo de síntese das partículas, por crescimento terminal, como sugerida por Commoner (7), para o VMCF. Uma variante dessa idéia é a de Köhler (24), que sugere pontos de ruptura ao longo das partículas em crescimento, alternadamente, a distâncias equivalentes ao comprimento das partículas curtas e longas; *c*) As partículas curtas seriam produtos colaterais não infetivos, da infecção pelos vírus do grupo do VRF, e portanto diferente das partículas longas (9); *d*) As partículas curtas e longas interagem-se simbioticamente (12, 25).

No presente trabalho, a primeira hipótese é julgada mais provável. Isso se baseia na ausência de inclusões intracelulares formadas de partículas curtas (55 m μ). Partículas de comprimentos variados, menores que 200 m μ , somente aparecem quando agregados de partículas longas se desorganizam, como consequência da decadência celular decorrente da infecção, sendo assim bastante forte a sugestão de que elas se originariam da ruptura das partículas longas nesse processo. Por outro lado, a proporção entre partículas longas e curtas do VAP *in vitro*, baseada em estimativas espectrofotométricas (34) e nas contagens em preparações rápidas, é ao redor de 3:1. Em preparações purificadas essa proporção pode chegar até 1:20 (13). Se as partículas curtas são realmente sintetizadas nas células, seria razoável esperar sua ocorrência intercelular, numa proporção aproximada.

A prevalência marcante de partículas de ca. 55 m μ e 200 m μ de CN torna difícil aceitar a teoria de que as partículas curtas seriam formas imaturas ou intermediárias de um processo sintético, por crescimento terminal, pois seria de esperar que partículas com diferentes comprimentos ocorressem numa proporção similar. Quanto à sugestão de Köhler (24), se válida, faria com que partículas curtas e longas ocorressem numa frequência igual, tanto *in vitro* como *in situ*, o que não acontece, particularmente no interior da célula.

De Zoeten (9) afirma ter encontrado partículas curtas e longas no interior de células de fumo, infetado por um isolado do VRF da Califórnia, e considerou o fato como evidência favorável à hipótese de que as partículas curtas seriam um produto colateral, da infecção por este vírus, mas sem atividade. Todavia aquele autor menciona grupos de partículas em arranjos ordenados, cristalinos, que aparecem logo no início da infecção sistêmica, os quais se desagregam com o decorrer da infecção. Embora De Zoeten não mencione claramente, parece provável que as partículas curtas apareceriam após esta desagregação dos arranjos cristalinos das partículas.

Lister (25) atribui uma função às partículas curtas do VRF, baseado no fato de que, quando no inóculo não há partículas curtas, dá-se o aparecimento de isolados, ditos instáveis (6), em maior frequência, nas subculturas das lesões formadas. Como nestes isolados instáveis admite-se que o VRF ocorra na forma de ácido ribonucléico (ARN) livre (33), Lister sugere que as partículas curtas têm em seu ARN informações que comandam o capeamento do ARN, tanto das partículas curtas como das

longas, pela proteína. Num trabalho recente, Frost *et al.* (12) reinvestigaram as observações de Lister, e sugerem que cada isolado do VRF seria um sistema de dois ou mais pedaços de ARN infetivo interagindo especificamente num processo simbiótico. Se realmente a interpretação destes autores estiver correta, uma das maneiras de conciliá-la com as observações relatadas no presente trabalho, i. e., ausência de inclusões de partículas curtas (55 m μ) nos tecidos infetados, seria a admissão de que as partículas curtas poderiam formar agregados em que quatro unidades se unem pelas extremidades, e estas por sua vez formariam inclusões indistinguíveis dos grupos de partículas longas.

MORPHOLOGY OF PEPPER RINGSPOT VIRUS (BRAZILIAN TOBACCO RATTLE VIRUS) PARTICLES

SUMMARY

Tubular particles, about 25 m μ wide, with an axial channel 4 m μ in diameter, were found in leaf dip or purified preparations and also within tissues, from plants infected with pepper ringspot virus (PRSV), but not in uninoculated control plants. The particle length determinations showed two prevalent types of particles *in vitro*, respectively with ca. 55 m μ and 200 m μ in normal length. These values were independent of the virus isolate, host plant or preparative procedures for electron microscopy employed. In thin section profiles, a dense rim was observed bordering the axial channel, in cross section of particles stained with uranyl acetate, which might represent the location of the viral nucleic acid in the virion. The long, 200 m μ , particles can be separated from the short, 55 m μ particles through sucrose gradient density ultracentrifugation, when it can be demonstrated that only the longer particles are infective.

Incubation of purified preparations with ribonuclease and/or trypsin, did not affect infectivity or the structure of the virions. However, in some experiments, the trypsin treatment induced an end-to-end aggregation of the particles.

Purified preparations lose infectivity after being heated for 10 minutes at 65-70°C. Simultaneously a generalized degradation of virions is noticeable. The end product of this degradation is a powdery material, composed of granules 30-40 Å in diameter.

In ultrathin sections of PRSV-infected tissues, ordered aggregates of particles, similar to those found *in vitro*, were observed in the cyto-

plasm. Such inclusions consisted of long (200 m μ) particles only. In no instance, groups of typical 55 m μ , short particles were found, and this suggests that they are fragments of the longer, 200 m μ particles, rather than products of self multiplication.

LITERATURA CITADA

1. BRANDES, J. Eine elektronenmikroskopische Schnellmethode zum Nachweis fäden- und stäbchenförmiger Viren, insbesondere in Kartoffeldunkelkeimen. NachrBl. dtsh. PflSchDienst (Braunschweig) 9:151-152, 1957.
2. ————— & WETTER, C. Classification of elongated plant viruses on the basis of particle morphology. Virology 8:99-115, 1959.
3. —————; PHILLIPE, M. R. & THORNBERRY, H. H. Electron microscopy of particles associated with soil-borne wheat mosaic. Phytopath. Z. 50:181-190, 1964.
4. BRENNER, S. & HORNE, R. W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. Biochim. Biophys. Acta 34:103-110, 1959.
5. CADMAN, C. H. Evidence for association of tobacco rattle virus nucleic acid with a cell component. Nature 193:49-52, 1962.
6. ————— & HARRISON, B. D. Studies on the properties of soil-borne viruses of the tobacco rattle type occurring in Scotland. Ann. Appl. Biol. 47:542-556, 1959.
7. COMMONER, B. Linear biosynthesis of tobacco mosaic virus: development and test of a model. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S. 48:2076-2085, 1962.
8. COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W. & OLIVEIRA, A. R. Vírus do anel do pimentão: um integrante do grupo do vírus do "rattle" do fumo. (Dados não publicados)
9. DE ZOETEN, G. A. California tobacco rattle virus, its intracellular appearance and the cytology of the infected cells. Phytopathology 56:744-754, 1966.
10. FINCH, T. Resolution of the substructure of tobacco mosaic virus in the electron microscope. J. Mol. Biol. 8:872-874, 1964.
11. —————. Preliminary X-ray diffraction studies of tobacco rattle and barley stripe mosaic viruses. J. Mol. Biol. 12:612-619, 1965.
12. FROST, R. R.; HARRISON, B. D. & WOODS, R. D. Apparent symbiotic interaction between particles of tobacco rattle virus. J. Gen. Virol. 1:57-70, 1967.
13. HARRISON, B. D. & NIXON, H. L. Separation and properties of particles of tobacco rattle virus with different length. J. Gen. Microbiol. 21:569-581, 1959.

14. HARRISON, B. D. & WOODS, R. D. Serotypes and particle dimensions of tobacco rattle virus from Europe to America. *Virology* 28:610-620, 1966.
15. HART, R. G. Morphological changes accompanying thermal denaturation of tobacco mosaic virus. *Biochim. Biophys. Acta.* 30:388-389, 1956.
16. HOLMES, K. C. & FRANKLIN, R. The radial distribution in some strains of tobacco mosaic virus. *Virology* 6:328-336, 1958.
17. HORNE, R. W. & WILDY, P. Virus structure revealed by negative staining. *Adv. Virus Res.* 10:101-170, 1963.
18. —————; RUSSEL, G. E. & TRIM, A. R. High resolution electron microscopy of beet yellows virus filaments. *J. Mol. Biol.* 1:234-236, 1959.
19. HUXLEY, H. E. & ZUBAY, G. Preferential staining of nucleic acid containing structures for electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11:273-296, 1961.
20. KARNOVSKI, M. J. Simple methods for staining with lead at high pH in electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11:729-732, 1961.
21. KITAJIMA, E. W. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. *J. Electron-microscopy (Tokyo)* 14:119-121, 1965.
22. —————; SILVA, D. M.; OLIVEIRA, A. R.; MÜLLER, G. W. & COSTA, A. S. Electron microscope investigations on tristeza. *In: Proc. 3rd. Conf. Int. Org. Citrus Virologists, 1965.* p.1-9.
23. KLIMENTKO, S. M.; UVAROV, V. N. & GUAJDAMOVICH, S. J. Spatial arrangement of ribonucleoprotein strand of vesicular stomatitis virus. *In: Proc. 6th Int. Conf. Electron Microscopy (Kyoto), 1966.* v.2. p.183-184.
24. KÖHLER, E. Versuch einer Deutung der Partikellängen pflanzlicher Virusarten. *Naturwissenschaften* 43:230-231, 1956.
25. LISTER, R. M. Possible relationship of virus-specific products of tobacco rattle virus infection. *Virology* 28:350-353, 1966.
26. LUFT, J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9:409-414, 1961.
27. MATTERN, C. F. T. Electron microscopic observations of tobacco mosaic virus structure. *Virology* 17:76-83, 1962.
28. MILLONIG, G. Studio sui fattori che determinano la preservazione della ultrastruttura. *In: From molecule to cell-Symposium on electron microscopy.* Buffa, P., ed. Roma, C.N.R., 1964. p.347-362.
29. NIXON, H. L. & HARRISON, B. D. Electron microscopic evidence on the structure of the particles of tobacco rattle virus. *J. Gen. Microbiol.* 21:582-590, 1959.

30. OFFORD, R. E. Electron microscopic investigations on the structure of the particles of tobacco rattle virus. *J. Mol. Biol.* 17:370-375, 1966.
31. OLIVEIRA, A. R. Serologia aplicada ao estudo do vírus do anel do pimentão. (Tese para doutoramento, E.S.A. "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1967) 40fls.
32. REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17:208-211, 1963.
33. SÄNGER, H. L. & BRANDENBURG, E. Über die Gewinnung von infektiösen Pressaft aus "Wintertype" Pflanzen des Tabak-Rattle-Virus durch Phenol Extraktionen. *Naturwissenschaften* 48:391, 1961.
34. SILVA, D. M. Estudos sobre purificação, composição e algumas propriedades do vírus do anel do pimentão. (Tese para livre docência, E.S.A. "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1965) 106fls.
35. SIMPSON, R. W. & HAUSER, R. W. Structural components of vesicular stomatitis virus. *Virology* 29:654-667, 1966.
36. TAKAHASHI, W.N. The effect of the high pH on the linear aggregation of the tobacco mosaic virus. *Am. J. Bot.* 36:642-645, 1949.
37. WATSON, M. L. Straining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4:475-478, 1958.