

BRAGANTIA

Boletim Científico do Instituto Agronômico do Estado de S. Paulo

Vol. 30

Campinas, fevereiro de 1971

N.º 4

MICROSCOPIA ELECTRÔNICA DE INCLUSÕES CITOPLASMÁTICAS E ALTERAÇÕES CELULARES ASSOCIADAS AO VÍRUS DO MOSAICO DA CENOURA (1)

I. J. B. CAMARGO (2), *biologista*, E. W. KITAJIMA (2) e A. S. COSTA (2), *engenheiros-agrônomo*s, *Seção de Virologia Fito-técnica*, Instituto Agronômico

SINOPSE

Exames electrónico-microscópicos de secções ultrafinas de tecidos foliares de cenoura (*Daucus carota* L.) e coentro (*Coriandrum sativum* L.) infetados pelo vírus do mosaico da cenoura (VMC) revelaram a ocorrência de inclusões em forma de bandas densas no citoplasma. Exames mais detalhados dessas bandas revelaram serem elas constituídas pela justaposição de lamelas delgadas (10-15 μ de espessura), as quais parecem eventualmente desprender-se e formar outros tipos de inclusão, como as de perfil circular e em forma de catavento, comumente associadas à infecção provocada por vírus do grupo Y da batata. Ocasionalmente, partículas do VMC foram observadas nas proximidades dessas inclusões.

As dimensões das bandas densas atingiram até 0,1-0,2 μ \times 3-4 μ , visíveis mesmo em exames ao microscópio convencional. Além da ocorrência dessas inclusões, pôde também ser observada a presença de grande número de vesículas no citoplasma, aparentemente associadas a uma atividade do complexo de Golgi.

1 — INTRODUÇÃO

Em culturas de cenoura (*Daucus carota* L.) na zona de Piedade, SP, foi constatada a ocorrência de um mosaico leve e malformação das folhas, induzidos por um vírus (3). Esse vírus, denominado de mosaico da cenoura (VMC), mede 15 μ

(1) Trabalho apresentado na XX Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, realizada em São Paulo, SP, em julho de 1968. Esta pesquisa recebeu auxílio da FAPESP (C. Agron. 69/878) CNPq (TC-12.275) e do convênio CAPES/BID/BNDE/. Recebido para publicação em 10 de agosto de 1970.

(2) Bolsista do CNPq.

× 740m μ (9), pertencendo portanto ao grupo do vírus Y da batata, na classificação de Brandes e Wetter (1) para os vírus alongados de planta.

Neste artigo acham-se relatados os resultados das investigações electrono-microscópicas das estruturas dos tecidos de plantas infetadas pelo VMC e particularmente sobre certas inclusões citoplasmáticas em forma de bandas densas.

2 — MATERIAL E MÉTODOS

Um isolado do VMC, obtido em Piedade, SP, e mantido em coleção na Seção de Virologia, foi inoculado mecânicamente em cenoura e coentro (*Coriandrum sativum* L.). Amostras de folhas de plantas exibindo sintomas típicos da infecção pelo VMC, além das de plantas não inoculadas, contrôles, foram fixadas em solução de ácido ósmico a 1%, em tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 7, durante 12 horas a 4°C (13). O material fixado foi desidratado em acetona e incluído em Epon (11). Os blocos foram seccionados em ultramicrotomo Porter-Blum (MT-1), com navilhas de vidro, e as secções obtidas, coradas com acetato de uranila (17) e citrato de chumbo (15). Os exames electrono-microscópicos foram efetuados em um instrumento da marca Siemens, Elmiskop I. Secções de 1-2 μ de espessura foram montadas em lâminas de vidro, coradas com uma mistura de Azur II e azul-de-metileno (16) e examinadas em microscópio convencional.

3 — RESULTADOS

De maneira geral, não se notaram grandes alterações celulares, nos exames ao microscópio electrónico, de secções ultrafinas de tecidos de plantas infetadas pelo VMC, em relação às sadias. Contudo, uma característica marcante dos tecidos infetados foi a presença de numerosas inclusões citoplasmáticas, densas ao feixe de elétrons, em forma de bandas (estampa 1). Essas bandas densas podiam alcançar dimensões relativamente grandes, e das observadas as maiores atingiam 0,1-0,2 μ de largura por 3-4 μ de comprimento. Exames de algumas secções mais delgadas, a magnificações maiores, revelaram uma estrutura organizada, nestas bandas, em que se alternavam linhas paralelas bem densas com outras menos densas, tendo a periodicidade cerca de 100 Å (estampa 2-A). Assim, essas bandas parecem representar secções de um conjunto de lamelas justapostas. Quando a secção era feita num plano aparentemente tangencial às lamelas com-

ponentes da inclusão, pôde-se notar também uma estrutura regular, periódica (periodicidade = 50\AA) (estampa 2-A), semelhante àquela observada nas inclusões lamelares associadas à infecção com alguns vírus do grupo Y da batata, evidenciadas em preparações contrastadas negativamente (5, 14). Ocasionalmente, junto às bandas densas podiam-se notar grupos de pontos densos ($120\text{-}150\text{\AA}$ em diâmetro) ou filamentos de similar grossura, dispostos paralelamente às bandas, e que provavelmente representariam vírions do VMC (estampa 2-B). Todavia, agregados de virions, como ocorre em tecidos infetados com outros membros do grupo, não foram encontrados. Também esporadicamente observaram-se inclusões em forma anelada ou com a forma de catavento, típicos em tecidos de plantas infetadas pelos vírus do grupo Y da batata (estampa 1) (12, 18, 19). Em alguns casos esses anéis ou cataventos achavam-se nas proximidades das bandas densas, às vezes sugerindo que se originam por desagregação das lamelas componentes da banda densa (estampa 1).

As bandas densas aparentemente eram dotadas de certa rigidez, pois em muitos casos notavam-se deformações nos orgânulos celulares que se achavam em contacto com elas; em particular o tonoplasto mostrava claramente evidências dessa rigidez das bandas (estampa 3-A).

Outro fato que chamou a atenção foi a ocasional ocorrência de numerosas vesículas no citoplasma, nas áreas adjacentes às bandas densas. Tais vesículas, com conteúdo de baixa densidade aos elétrons, tinham perfil circular, elipsoidal ou em meia-lua, limitadas por uma membrana unitária, seu diâmetro variando de $0,1$ a $1\text{-}2\mu$ ou mais. Em algumas secções notou-se certa associação entre essas vesículas e o complexo de Golgi (estampa 3-B).

A ocorrência das inclusões em forma de bandas densas, catavento, anéis, além da presença de vesículas no citoplasma, foi notada em praticamente todos os tipos de tecidos das folhas, com exceção dos vasos, sendo todavia mais conspícuas nos tecidos parenquimatosos.

Nos exames de secções mais espessas, coradas com Azur II e azul-de-metileno, ao microscópio óptico pôde-se também observar essas bandas densas no citoplasma.

4 — DISCUSSÃO

O exame de secções ultrafinas de tecidos de cenoura e coentro infetados pelo VMC demonstrou a ocorrência de inclusões citoplasmáticas, típicas de infecção causada pelos membros do chamado grupo do vírus Y da batata, e vem confirmar sua inclusão no referido grupo, baseado na morfologia de suas partículas (9).

Inclusões semelhantes às observadas em tecidos infetados pelo VMC foram descritas anteriormente por diversos autores, mas Edwardson (4) foi quem primeiro chamou a atenção ao fato de essas inclusões aparecerem consistentemente em tecidos de plantas afetadas pelos vírus, membros do grupo Y da batata. Sua interpretação, correntemente aceita, é que tais inclusões seriam formadas por lamelas, provavelmente protéicas, podendo individualmente ou em conjunto assumir diversas configurações que produzem perfis do tipo catavento, anéis concêntricos, linhas paralelas, bandas densas etc., nas secções. Observou ainda Edwardson, em preparações contrastadas negativamente, que tais lamelas teriam uma estrutura cristalina (5, 14).

Um retrospecto das observações existentes em relação às tais formações lamelares mostrou que em certos grupos de vírus há certa predominância de lamelas justapostas, aparecendo como bandas densas em secções, enquanto noutro grupo, aparentemente, as lamelas ocorrem mais individualizadas, notando-se nas secções prevalência de perfis em forma de catavento e anéis concêntricos. Os vírus do mosaico do nabo e do mosaico amarelo do feijoeiro (2) podem ser considerados como representando o primeiro grupo, e os vírus do mosaico comum do feijoeiro e Y da batata são exemplos do segundo (2). O VMC parece integrar o primeiro grupo, pois nota-se nítida predominância de bandas densas, tanto nos tecidos de cenoura como nos de coentro. Em muitos casos há óbvia sugestão de que as lamelas componentes do grupo justaposto podem desprender-se da banda, individualizando-se e originando, nas secções, outros tipos de perfis, como catavento e anéis.

O fato de as inclusões em bandas apresentarem em algumas secções ultrafinas uma estrutura periódica de 500Å , periodicidade igual à das lamelas observadas por Edwardson em preparações "leaf-dip" de tecido infetado por vírus do grupo Y da batata (5, 14), parece corroborar a tese da identidade existente entre ambas as estruturas.

Como nos casos anteriormente relatados, notou-se algumas vezes associação de partículas alongadas, consideradas como sendo as do VMC *in situ*, em razão de suas características morfológicas, com as formações lamelares (6, 12, 18, 19). Não há, nem nos casos já constantes em literatura e nem no presente, todavia, indícios que sugiram possível papel desempenhado pelas formações lamelares na síntese do vírus.

Quanto à ocorrência de numerosas vesículas em certas áreas do citoplasma, não há ainda explanação razoável. Em virtude de sua proximidade topológica com o complexo de Golgi é possível que tais vesículas derivem deste orgânulo celular. Aliás, atividade anômala do complexo de Golgi associada à infecção tem sido observada com outros vírus de planta, como o do mosaico da dália (10), algumas estirpes do vírus Y da batata (8) e certos vírus isométricos, pequenos. No caso da infecção pelo vírus da poliomielite, uma formação abundante de vesículas no citoplasma foi atribuída a uma intensa fosforilação de lipídios (7).

ELECTRON MICROSCOPY OF CYTOPLASMIC INCLUSION AND CELL MODIFICATION ASSOCIATED WITH CARROT MOSAIC VIRUS

SUMMARY

A virus, inducing mosaic and malformation of carrot leaves (*Daucus carota* L.), was found in Piedade, SP. It was termed carrot mosaic virus (CMV), and is both mechanically and aphid transmitted. Morphologically it belongs to the potato virus Y group (15 μ \times 740 μ).

Electron microscopic examination of thin sections of leaf tissues from carrot or coriander (*Coriandrum sativum* L.) infected with CMV demonstrated the presence of cytoplasmic inclusions, usually in the form of dense bands. They could reach sizes up to 0.2 μ \times 4 μ and were detectable even under light microscopic examination. These bands, at higher magnification, showed to be built up of thin lamella (10-15 μ thick), closely apposed. Occasionally individual or group of lamella appeared to loose from the bands, producing other type of profile, such as pin wheels and rings. CMV particles were sometimes observed in the vicinity of these inclusions, often laying parallel to their surface.

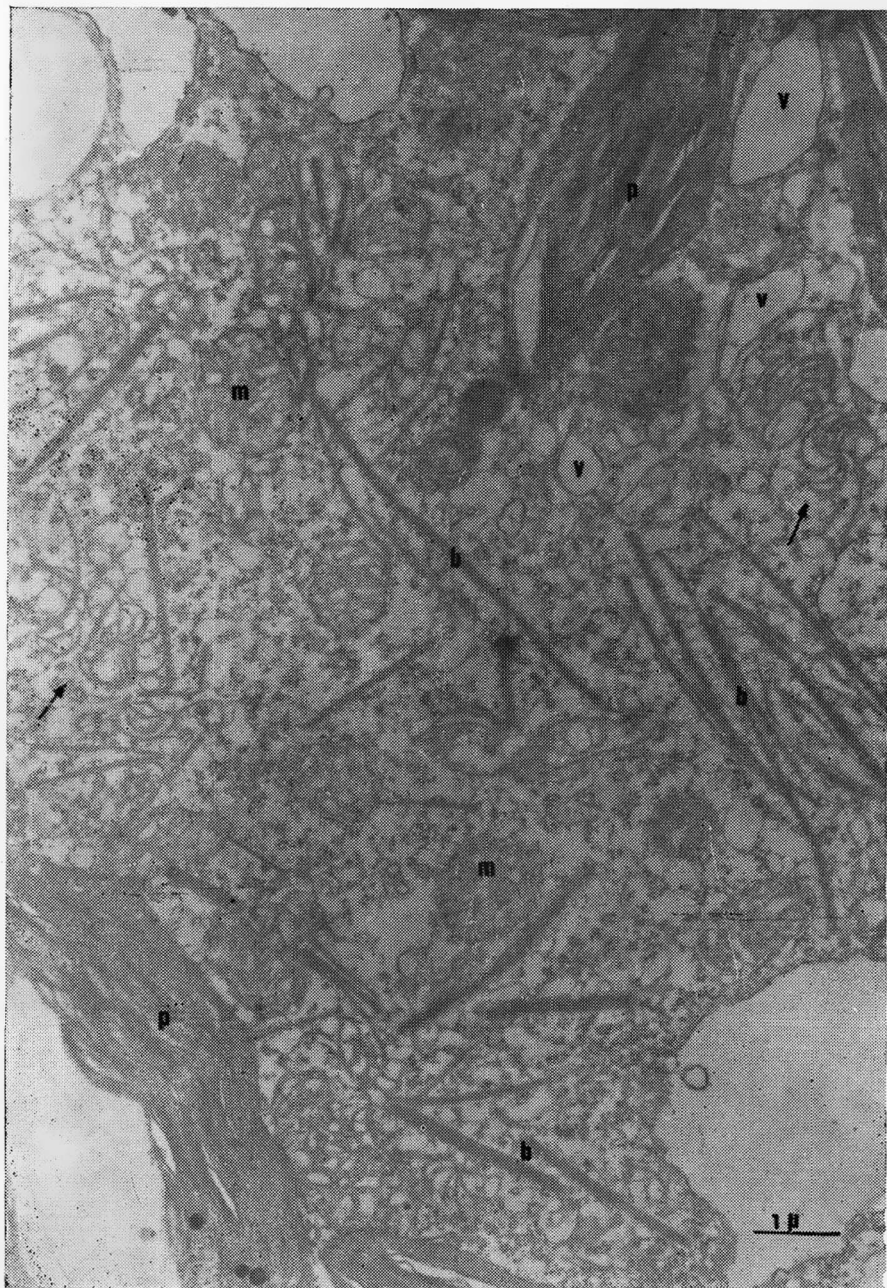
These inclusions are identical to those observed in tissues infected with other components of the potato Y virus group, and their detection seems to corroborate the previous inclusion of CMV in this group, based on particle morphology.

Besides these cytoplasmic inclusions, some cells contained a large number of vesicles in the cytoplasm, apparently associated with Golgi complex activity.

LITERATURA CITADA

1. BRANDES, J. & WETTER, C. Classification of elongated plant viruses on the basis of particle morphology. *Virology* 8:95-115, 1959.
2. CAMARGO, I. J. B.; KITAJIMA, E. W. & COSTA, A. S. Estudo ao microscópio eletrônico de tecidos de plantas infetadas pelo vírus do mosaico comum e amarelo de feijoeiro. *Bragantia* 27:409-420, 1968.
3. COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W. & CAMARGO, I. J. B. Ocorrência do mosaico em cenoura no Estado de São Paulo. Trabalho apresentado na IX Reunião Anual da Sociedade de Olericultura do Brasil, Goiânia, GO., 1969.
4. EDWARDSON, J. R. Cylindrical inclusions in the cytoplasm of leaf cells infected with tobacco etch virus. *Science* 153:883-884, 1966.
5. —————; PURCIFULL, D. E. & CHRISTIE, R. G. Structure of cytoplasmic inclusions in plants infected with rodshaped viruses. *Virology* 34:250-263, 1968.
6. HAYASHI, T.; MATSUI, C. & YAMAGUCHI, A. Electron microscopy of intracellular turnip mosaic virus. *Phytopathology* 55: 478, 1965.
7. KAZUMOBU, A. & DALES, S. Cytopathology of Mengovirus infection. II. Proliferation of membranous cisternae. *Virology* 32:201-215, 1967.
8. KITAJIMA, E. W.; CAMARGO, I. J. B. & COSTA, A. S. Intranuclear crystals and cytoplasmic membranous inclusions associated with infection by two Brazilian strains of potato virus Y. *Journal of Electron Microscopy* 17:144-153, 1968.
9. —————; ————— & —————. Morfologia do vírus do mosaico da cenoura. *Bragantia* 27:13-15, 1968.
10. —————; LAURITIS, J. & SWIFT, H. Fine structure of zinnia leaf tissues infected with dahlia mosaic virus. *Virology* 39: 240-249, 1969.
11. LUFT, L. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. biophys. biochem. Cytol.* 9:409-414, 1961.
12. MATSUI, C. & YAMAGUCHI, A. Electron microscopy of host cells infected with tobacco etch virus. I. Fine structure of leaf cells at later stages on infection. *Virology* 22:40-47, 1964.
13. MILLONING, G. Studio sui fattori che determinano la preservazione della ultrastruttura. In: Buffa, P. ed. From molecule to cell. Symposium on Electron Microscopy. Roma, 1964. p.363-366.
14. PURCIFULL, D. E. & EDWARDSON, J. R. Watermelon mosaic virus: Tubular inclusions in pumpkim leaves and aggregates in leaf extracts. *Virology* 32:393-401, 1967.

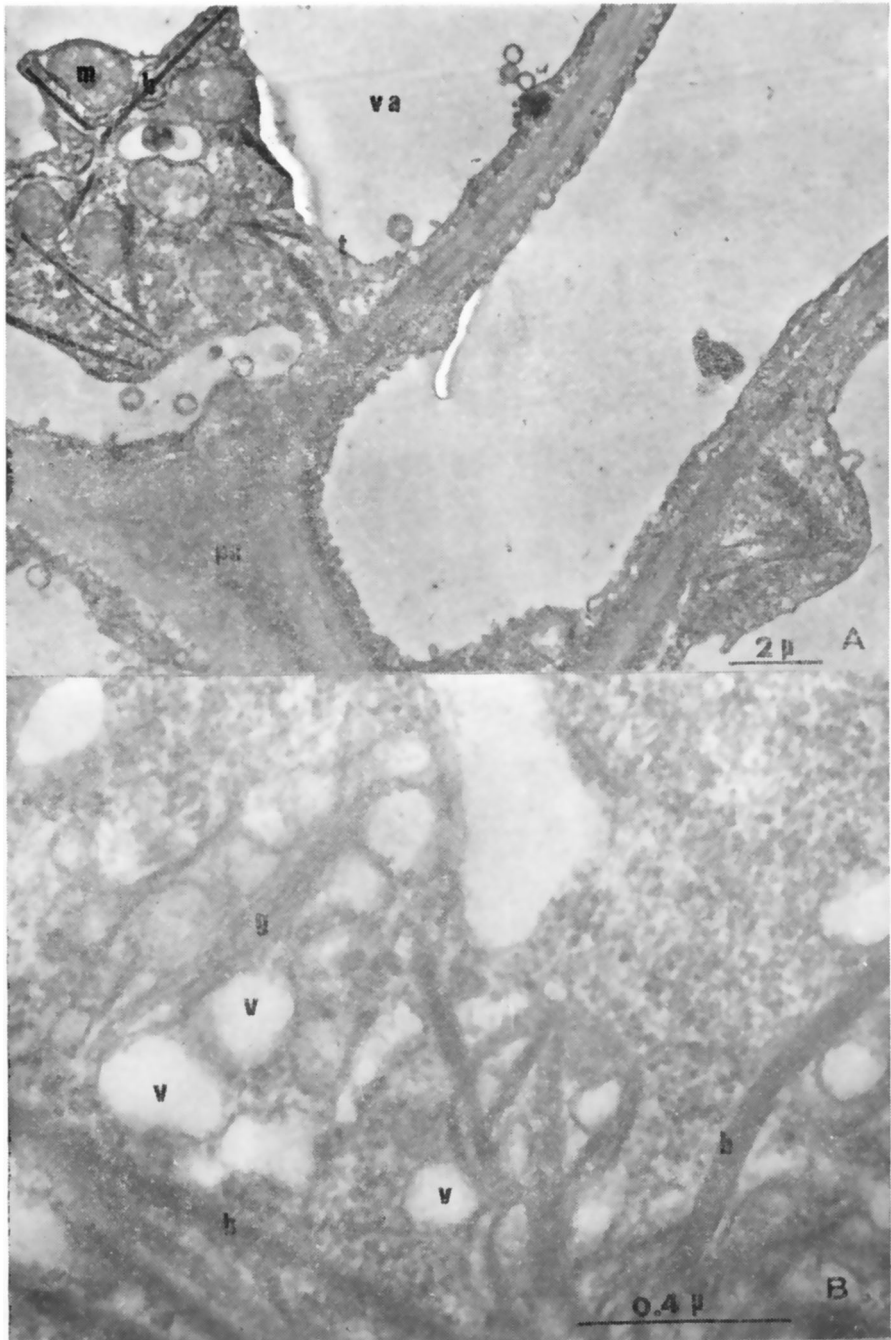
15. REYNOLDS, E. S. The use of leaf citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17:204-211, 1963.
16. RICHARDSON, N. K.; JARRET, L. & FINKE, H. Embedding in epoxy resins for ultra-thin section in electron microscopy. *Stain Technol.* 35:313-325, 1960.
17. WATSON, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. biophys. biochem. Cytol.* 4:475-478, 1958.
18. WEITRAUB, M. & RAGETLI, H. W. J. Fine structure of inclusions and organelles in *Vicia faba* infected with bean yellow mosaic virus. *Virology* 28:390-402, 1966.
19. YAMAGUCHI, A.; KIKUMOTO, T. & MATSUI, C. Electron microscopy of elongated particles associated with tulip mosaic. *Virology* 20:143, 1963.



Fotomicrografia de plantas infetadas pelo vírus do mosaico da cenoura:- Secção de fôlha de cenoura infetada com o VMC, vendo-se no citoplasma inclusões lamelares em forma de bandas densas (b) ou em perfil do tipo catavento (setas); p- plastídios, m- mitocôndrios, v- vesículas.



Fotomicrografia de tecidos de plantas infetadas com o vírus do mosaico da cenoura: **A** — Detalhe de inclusão lamelar em forma de banda densa, cortada perpendicularmente (b), mostrando as lamelas justapostas e cortadas quase paralelamente à sua superfície (setas), onde se vê uma estrutura cristalina. **B** — Detalhe de uma região do citoplasma com bandas densas (b), e entre elas partículas de vírus cortadas transversalmente (vi).



Fotomicrografia de tecidos de plantas infetadas com o vírus do mosaico da cenoura: **A** — Secção de célula de epiderme de coentro, vendo-se no citoplasma inclusões lamelares em forma de bandas densas (b), como que empurrando o tonoplasto (t), demonstrando sua rigidez; **m**. mitocôndrias, **pc**- parede celular, **va**- vacúolo. **B** — Parte do citoplasma de uma célula com bandas densas (b) e pequenas vesículas aparentemente associadas ao complexo de Golgi (g).