

BRAGANTIA

Boletim Científico do Instituto Agrônomo do Estado de S. Paulo

Vol. 31

Campinas, junho de 1972

N.º 18

CITOQUÍMICA DE INCLUSÕES INTRANUCLEARES ASSOCIADAS AO VÍRUS DO MOSAICO AMARELO DO SALSÃO ⁽¹⁾

NEUSA D. DA CRUZ, *biologista*, e DIXIER M. MEDINA, *engenheira-agrônoma*, *Seção de Citologia*, E. W. KITAJIMA e A. S. COSTA, *engenheiros-agrônomo*s, *Seção de Virologia Fitotécnica*, Instituto Agrônomo, e CARMINDA C. LANDIN, *livre-docente*, *Cadeira de Biologia Geral e Educacional*, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro ⁽²⁾

SINOPSE

Estudos citoquímicos, ao nível do microscópio óptico, foram efetuados para determinar a natureza química de inclusões intranucleares, de aspecto fibroso, induzidas pelo vírus do mosaico amarelo do salsão na maioria de suas hospedeiras.

Os testes citoquímicos foram conduzidos em material foliar fresco ou fixado (aldeído glutárico, Carnoy 3:1 ou Bouin), tendo sido feitas as seguintes reações: hematoxilina férrica (testemunha); Sudan IV e Azul do Nilo (lipídios); iodo-iodeto (amido); Feulgen, Azur B e verde-de-metila-pironina (ácidos nucleicos); ninidrina-Schiff e "Fast Green", este último em soluções ácida e alcalina (proteínas). Os testes com verde-de-metila-pironina, Azur B e ninidrina-Schiff foram combinados com digestão enzimática pela ribonuclease ou pepsina.

Os dados obtidos sugerem que, dentro da sensibilidade dos testes realizados, a inclusão contenha proteína, mas não tenha amido, lipídios ou ácidos nucleicos. Isso permite supor, portanto, que essas inclusões não sejam formadas de partículas de vírus.

⁽¹⁾ Este trabalho recebeu auxílios financeiros do CNPq e da FAPESP. Apresentado na XX Reunião Anual da S.B.P.C., em julho de 1968, em São Paulo. Recebido para publicação em 30 de dezembro de 1971.

⁽²⁾ Com bolsas de suplementação do CNPq.

I — INTRODUÇÃO

Recentemente, um vírus causando mosaico amarelo em folhas de salsaõ (*Apium graveolens* L.) foi encontrado em diversas regiões do Estado de São Paulo. Esse vírus, denominado mosaico amarelo do salsaõ (VMAS), é transmissível mecanicamente e por afídios a algumas outras umbelíferas (10).

Exame comparativo do material infetado e não infetado revelou ao microscópio eletrônico a presença de partículas alongadas e flexíveis de ca. 15 m μ de diâmetro nas plantas afetadas. Partículas similares foram encontradas em preparações parcialmente purificadas e infetivas (3). O comprimento normal destas partículas é de ca. 760 m μ . Dadas as suas propriedades biológicas e morfológicas sugeriu-se que o VMAS, se não idêntico, pertenceria ao mesmo complexo do vírus do mosaico do salsaõ, descrito na Alemanha, e do mosaico ocidental do salsaõ, dos Estados Unidos (10).

Ao microscópio óptico, o exame da epiderme inferior das folhas de várias plantas afetadas pelo VMAS revelou a presença de inclusões intranucleares fibrosas, alongadas e refringentes. Essas inclusões geralmente formam figuras anelares acompanhando a periferia do núcleo ou se apresentam eventualmente em configurações mais complexas (9). Estudos preliminares ao microscópio eletrônico indicaram realmente estarem essas inclusões no interior do núcleo.

O presente artigo relata os resultados de uma investigação citoquímica ao nível do microscópio óptico, realizada para determinar a natureza química e possivelmente virosa dessas inclusões intranucleares induzidas pelo VMAS.

2 — MATERIAL E MÉTODO

Para o presente estudo utilizaram-se folhas de salsaõ selvagem (*Apium* sp.) e de coentro (*Coriandrum sativum* L.), sadias e infetadas pelo VMAS.

Nos testes de Sudan IV, Azul do Nilo e Iodo-iodeto, empre-

(3) MATIELLO, J. B.; KITAJIMA, E. W.; CAMARGO, I. J. B. & COSTA, A. S. Dados não publicados.

gou-se material fresco (pedaços da epiderme inferior das folhas). Para os demais testes o material foliar foi fixado em Carnoy 3:1, Bouin ou aldeído glutárico (3%, em tampão fosfato, 0,1M, pH 7). Os tecidos foram incluídos em parafina pelo processo usual do álcool butílico e cortados à espessura de 6 a 8 micros.

Em cada teste, lâminas do tecido foliar das plantas doentes e sadias eram coradas simultaneamente. Nos tratamentos enzimáticos, as lâminas controles foram deixadas em solução-tampão pelo mesmo tempo e à mesma temperatura daquelas incubadas com as enzimas.

As reações citoquímicas empregadas foram as seguintes:

A — Testemunha: *Hematoxilina férrica de Heidenhein* — Utilizou-se o método comumente empregado na Seção de Citologia, Instituto Agrônômico (15), e o material corado por este processo constituiu-se numa testemunha geral.

B — Amido: *Iodo-iodeto de potássio* — Os pedaços da epiderme foram imersos por 5 minutos numa solução de iodeto de potássio a 2% e iodo a 0,2%, e a seguir, lavados e montados em água (7).

C — Lipídio: a) *Azul do Nilo* — As porções da epiderme foram colocadas numa solução de Azul do Nilo a 1%, a 37°C por 1 minuto, diferenciadas em ácido acético a 1% a 37°C, lavadas e montadas em água (3); b) *Sudan IV* — As porções da epiderme inferior foram imersas em solução saturada de Sudan IV em álcool 70% durante 30 minutos, a seguir em álcool a 50% e finalmente montadas em água (2).

D — Proteína: a) *Ninidrina-Schiff* (19) — Utilizou-se a mesma variação feita por Robb em seu estudo com as inclusões do vírus do mosaico da dália (16). As lâminas após serem desparafinadas foram colocadas em uma solução de ninidrina a 0,5% em álcool absoluto a 37°C durante um tempo que variou de 20 a 30 horas, lavadas em álcool absoluto e em água, e colocadas no reagente de Schiff (leucofucsina) por 30 minutos. Após serem rapidamente lavadas em água, foram imersas em solução de metabissulfito de sódio a 2% por 5 minutos, novamente passadas em água, seguindo-se uma desidratação e montagem em bálsamo; b) *Teste*

para arginina. Um modo prático de testar a presença de arginina é descrito no livro de Humason (6). Uma solução-estoque de alfa naftol a 1% em etanol 100% é preparada e mantida em refrigerador. A partir dessa solução-estoque prepara-se, no momento do teste, uma solução aquosa a 5% (solução A). A solução B é preparada dissolvendo-se 15 ml de uma solução molar de hipoclorito de sódio em 80 ml de água destilada, adicionando-se ainda 5 ml de KOH N. A terceira solução, C, é constituída de 10 g de uréia dissolvidas em 15 ml de água destilada, à qual juntam-se 5 ml de KOH N.

Os cortes hidratados até álcool 70% foram passados na solução A por 30 minutos, na B, 1 minuto e meio, e na C, 2 vezes, 10 segundos e 2 minutos respectivamente. As três soluções foram mantidas a 5°C. Em seguida foram transferidos para butanol terciário, xilol, e montados em bálsamo; c) *“Fast green” em meio ácido, para proteína total* (4): As seções, após serem hidratadas, foram tratadas com solução de *“fast green”* a 0,01%, de pH corrigido para 2, com HCl N, durante 1 hora. Após terem sido coradas, foram lavadas com água destilada, de pH também corrigido a 2 com HCl N, em dois banhos de 15 minutos cada um. Seguiram-se desidratação e montagem pelos métodos convencionais; d) *“fast green” em meio alcalino, para histonas* (1): Os cortes hidratados permaneceram em solução a 5% de ácido tricloroacético (ATC), em banho-maria fervente, durante 15 minutos, para hidrolizar os ácidos nucleicos. O ATC foi eliminado em três lavagens em álcool 70%, 10 minutos cada lavagem, seguidas de imersão rápida em água destilada. A seguir, os cortes foram tratados à temperatura ambiente, por uma solução de *“fast green”* a 0,1% de pH corrigido para 8-8,2 com NaOH N. Após o tratamento, as lâminas foram lavadas por 5 minutos em água destilada e montadas pelo processo usual; f) *Pepsina ninidrina-Schiff* — O tratamento com pepsina foi feito após os tecidos terem sido fixados em Carnoy. A digestão, em solução de pepsina 0,1%, de pH 1,5 corrigido com HCl N, durou 15 horas a 38°C. A seguir, o tecido foi desidratado, incluído em parafina, e os cortes corados com ninidrina-Schiff, como já anteriormente descrito.

(4) SWIFT, H. — Comunicação pessoal.

E — Ácidos Nucleicos: a) *Azur B* — Esta coloração foi feita de acordo com o método descrito por Flax e Himes (4), segundo o qual a condição ideal para coloração diferencial dos ácidos nucleicos é conseguida na concentração de 0,25 mg/ml de corante em pH 4. As lâminas, depois de desparafinadas, permaneceram por 2 horas a 40°C no corante dissolvido em tampão Mc Ilvaine devidamente ajustado. A seguir, elas foram passadas rapidamente em água, butanol terciário (três passagens de 10 minutos), e montadas pelo método usual: b) *Reação de Feulgen* — Utilizou-se o método descrito por Lison (12), em material fixado em Carnoy 3:1. Os cortes, depois de hidrolizados em solução de HCl 5N a frio, por 12 minutos, foram imersos em leucofucsina por uma hora. A seguir, as lâminas foram lavadas em água sulfurosa, desidratadas e montadas em bálsamo; c) *Verde-de-metila-pironina* — Depois de algumas dificuldades relacionadas com a procedência da pironina, bons resultados foram conseguidos com pironina Merck. Para o preparo do corante, dissolveram-se 0,5 g de pironina em 25 ml de tampão acetato pH 4,4 e 0,85 g de verde-de-metila em 15 ml do mesmo tampão. A mistura destas soluções foi purificada através da extração do violeta-de-metila pelo clorofórmio, e finalmente o volume foi completado para 100 ml. Os cortes, já hidratados, foram imersos nessa solução depois de passados pela solução-tampão por 10 minutos. A coloração durou 15 minutos após o que as lâminas foram passadas duas vezes, por 5 minutos, em álcool butílico normal, três vezes em xilol, e montadas em bálsamo (11, 12, 18); d) *Ribonuclease, verde-de-metila-pironina ou Azur B* — Basicamente seguiu-se o processo utilizado por Robb (16). Solução aquosa de ribonuclease (RNase) foi ajustada a pH 6,8 com NaOH N. Os cortes desparafinados e hidratados foram imersos na solução enzimática por 17-24 horas a 40°C. Depois de lavadas e transferidas para o respectivo tampão, as lâminas foram tratadas com verde-de-metila-pironina ou *Azur B*, como atrás descrito, desidratadas e montadas em bálsamo. A RNase foi utilizada em duas diferentes concentrações: 0,01% e 0,1%.

3 — RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em material fresco, tanto de coentro como de salsão selvagem, o iodo-iodeto de potássio não produziu reação alguma no núcleo. Quando se empregou Sudan IV ou Azul do Nilo, embora algumas es-

truturas citoplasmáticas se tenham corado, não se observou coloração alguma na inclusão nuclear causada pelo VMAS.

No quadro 1 acham-se sintetizados os resultados com os diferentes testes empregados em material fixado.

Nas lâminas testemunhas, de coentro e salsão selvagem coradas com hematoxilina, as inclusões se mostraram muito bem coloridas, mesmo após uma diferenciação prolongada. Como anteriormente descrito (9), as inclusões tinham aparência de anéis ou eram de conformação mais complexa, imitando novelos ou figuras em 8 (estampa 1, **A**, **B**).

O teste de ninidrina-Schiff foi positivo para a inclusão que se coloriu de rosa-violáceo. O núcleo e o citoplasma reagiram positivamente a esse teste, o que indica presença de proteína (estampa 1 **C**). A composição protéica dessas estruturas foi confirmada pelo desaparecimento de qualquer reação após o tratamento enzimático com a pepsina. Nas lâminas controles, imersas na mesma solução e nas mesmas condições, omitindo-se apenas a enzima, a coloração permaneceu.

O teste com "fast green", em meio ácido, confirmou o resultado com ninidrina-Schiff, corando todo o núcleo de um verde intenso. Procurou-se pesquisar se, da mesma forma que as nucleo-proteínas, a inclusão conteria proteínas básicas, do tipo histonas, estabelecendo-se, assim, uma possível relação entre inclusão e cromatina. No teste para arginina, a coloração foi extremamente fraca e não permitiu qualquer conclusão. Todavia, através do "fast green" em meio alcalino, a cromatina se coloriu, enquanto a inclusão manteve-se incolor, indicando que provavelmente a proteína da inclusão não seja de natureza básica.

Nas lâminas submetidas à reação de Feulgen, o material cromático do núcleo coloriu-se de modo característico. Na inclusão, porém, é bem evidente a ausência de qualquer coloração contra o fundo rosa-violáceo da cromatina (estampa 1, **D**). Para a sensibilidade desse teste, a inclusão não conteria, pois, ADN.

O Azur B atua como corante metacromático, e num pH entre 3 e 5 tingi os ácidos nucleicos de maneira distinta e específica, isto é, ortocromaticamente o ADN de azul-esverdeado, e metacromati-

QUADRO 1. — Reações de coloração em materiais fixados de salsão selvagem e coentro infestados pelo VMAS

Teste	Coloração (*)			
	Cromatina	Núcleo	Citoplasma	Inclusão
Ninidrina-Schiff	rosa-violácea	rosa-violácea	rosa-violácea	rosa-violácea
Pepsina + Ninidrina-Schiff	rosa-violácea fraca	—	—	—
"Fast-green", meio ácido	verde	verde	verde-clara	verde
"Fast-green", meio alcalino	verde	—	—	—
Feulgen	rosa-violácea	—	—	—
Azur B	azul-esverdeada forte	roxa	roxa	azul-esverdeada clara
RNase + Azur B	azul-esverdeada forte	—	—	azul-esverdeada clara
Verde-de-metila-pironina	verde-azulada	rosa-forte	rosa	rosa-forte
RNase + Verde-de-metila-pironina ..	verde-azulada	—	—	rosa-forte
Pepsina + verde-de-metila-pironina	verde-azulada	rosa-forte	rosa-forte	—
Hematoxilina (testemunha)	violeta	violeta	cinza	violeta

(*) O traço (—) indica falta de coloração.

camente o ARN de roxo ou azul-escuro (4). Nas lâminas de plantas sadias notou-se que a coloração foi bastante satisfatória. O núcleo e o citoplasma coloriram-se de roxo, enquanto a cromatina no núcleo tingiu-se de azul-esverdeado-escuro. Nas lâminas de plantas doentes, a inclusão corou-se de um azul-esverdeado-claro, coloração esta que não foi afetada pelo tratamento com RNase, o que poderia indicar ocorrência de ADN nas inclusões.

Nas lâminas coradas pelo verde de metila-pironina, as reações para o ADN e ARN foram muito evidentes, tingindo-se a cromatina do núcleo de verde-azulado, e o nucléolo de rosa-forte (estampa 1, **E**, **F**). O citoplasma apresentava-se róseo, e a inclusão apresentava-se rosa-forte similarmente ao nucléolo, o que implicaria na ocorrência de ARN na inclusão. Todavia, em material digerido pela RNase, a inclusão continuou rósea, ao mesmo tempo que o nucléolo e o citoplasma não mais se coloriram. Já é bastante conhecido na literatura o fato de a pironina também corar proteínas (8), o que sugere que a coloração da inclusão se deva a componente protéico e não necessariamente à presença de ARN. O fato de o tratamento com pepsina precedendo a coloração pelo verde-de-metila-pironina eliminar a coloração rósea da inclusão parece apoiar essa hipótese.

A presença de proteína e a ausência de amido e lipídios na inclusão intranuclear induzida pelo VMAS parecem ser bem evidentes. Contudo, os resultados das reações para indicar a presença e o tipo de ácido nucleico foram conflitantes. A ausência de reação para o teste de Feulgen não implicaria necessariamente em ausência de ADN (5), como sugere a tênue reação para o Azur B. Por outro lado, a coloração obtida com verde-de-metila-pironina é característica de ARN, embora esta coloração não tenha sido eliminada com uma digestão preliminar com RNase. A coloração obtida com Azur B poderia ser inespecífica, e a cor rósea decorrente do tratamento com verde-de-metila-pironina, ser devida a proteína (8). Se este for o caso, a inclusão não conteria ácido nucleico, seja ADN ou ARN.

Dificuldades similares foram encontradas por Littau e Black (13) quando investigaram citoquimicamente as inclusões citoplasmáticas induzidas pelo vírus do "wound-tumor" do trevo. Através de testes de coloração associados a tratamentos enzimáticos os autores não puderam obter dados conclusivos sobre a existência de ácido ribonucleico. Trabalhos posteriores de microscopia eletrô-

nica comprovaram, porém, a ocorrência de partículas de vírus com ARN em cadeia dupla nessas inclusões (17).

4 — CONCLUSÃO

Com base nas reações efetuadas pode-se concluir que, dentro da sensibilidade dos testes utilizados, as inclusões fibrosas, intranucleares, não contêm amido nem lipídios, e têm proteína como componente principal. As reações para detectar a presença e o tipo dos ácidos nucleicos não produziram resultados conclusivos, sugerindo serem eles ausentes da inclusão. Todavia, a ocorrência de um ARN especial (por ex., em cadeia dupla ou suficientemente protegido por uma capa protéica), resistente à digestão enzimática, é perfeitamente possível. Mesmo a possibilidade da presença de ADN não pode ser inteiramente eliminada. Se confirmada a ausência de ácido nucleico, fica eliminada a possibilidade de essas inclusões intranucleares serem formadas de partículas de vírus.

A ocorrência de cristais de proteínas no interior nuclear associada à infecção com certos vírus de planta é conhecida, embora a sua origem e relação com o vírus ainda não esteja esclarecida (14). No presente caso, também nada se sabe da relação desta inclusão com o vírus.

Investigações sobre essas inclusões para estudar sua ultraestrutura e composição química ao nível do microscópio eletrônico estão em andamento.

CYTOCHEMICAL STUDIES OF THE INTRANUCLEAR INCLUSIONS ASSOCIATED WITH THE CELERY YELLOW MOSAIC VIRUS (CYMV)

SUMMARY

Cytochemical studies at optical microscopic level were made to determine the chemical nature of intranuclear inclusions with fibrous aspect which were induced by the celery yellow mosaic virus (CYMV) in most of its hosts.

The cytochemical tests were carried on fresh as well on fixed foliar material, fixation being in glutaric aldehyd, Carnoy 3:1 or Bouin. The following reactions were tried: ferric haematoxylin (control); Sudan IV and Nile blue (for lipids); iodine ioduret (for starch); Feulgen, azur B and methyl green-pyronin (for nucleic acids); ninhydrin-Schiff and fast-green, the latter in acid and in alkaline solution (for protein). The tests with methyl green-pyronin, azur B and ninhydrin-Schiff were combined with enzymatic digestion with RNase or pepsin.

The results suggest that, within the sensibility of the tests, the inclusion contains protein but does not contain starch, lipids or nucleic acids. This permit to suppose, therefore, such inclusions not to be formed of virus particles.

LITERATURA CITADA

1. ALFERT, M. & GESCHWIND, I. I. A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.. 39:991-999, 1953.
2. BAKER, J. R. Further remarks on histochemical recognition of lipids. Q. J. microsc. Sci. 88:463-465, 1947.
3. CAIN, A. J. The use of Nile-blue in the examination of lipids. Q. J. microsc. Sci. 88:383-392, 1947.
4. FLAX, M. H. & HIMES, N. H. Microspectrophotometric analysis of metachromatic staining of nucleic acids. Physiol. Zoöl. 25:297-320, 1952.
5. GERSCH, I. Fixation and staining. In: BRACHET, J., ed. The cell: biochemistry, physiology, and morfology. New York, Academic Press, 1959. v. 1.
6. HUMASON, L. Animal tissue techniques. San Francisco, Freeman, 1962. 468p.
7. JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill, 1940. 523p.
8. KASTEN, F. H. Cytochemical studies with acridine orange and the influence of dye contaminants in the staining of nucleic acids. Int. Rev. Cytol. 21:142-197, 1967..
9. KITAJIMA, E. W. & COSTA, A. S. Morfologia do vírus do mosaico amarelo do salsaõ. Bragantia 27:VII-VIII, 1968. Nota 3.
10. ——— & ———. Inclusões fibrosas intranucleares em plantas infetadas pelo vírus do mosaico amarelo do salsaõ. Bragantia 27:IX-XI, 1968. Nota 4.
11. KURNICK, N. B. Pyronin Y in the methyl-green-pyronin histological stain. Stain Technol. 30:213-230, 1955.
12. LISON, L. Histochemie et cytochemie animales. Paris, Gauthier-Villars, 1953. 2v.
13. LITTAU, V. C. & BLACK, L. M. Spherical inclusions in plant tissues caused by a virus. Am. J. Bot. 39:87-95, 1952.
14. MCWHORTER, F. P. Plant virus inclusions. A. Rev. Phytophat. 3:287-312, 1965.
15. MEDINA, D. M. & CONAGIN, C. T. T. M. Técnica citológica. Campinas, Instituto Agronômico, 1964. 107p. (Publicação 2610)
16. ROBB, S. M. Location, structure and cytochemical staining reactions of the inclusion bodies found in *Dahlia variabilis* infected with Dahlia mosaic virus. Virology 23:141-144, 1964.
17. SHIKATA, E. & MARAMOROSCH, K. Electron microscopy of wound tumor virus assembly sites in insect vectors and plants. Virology 32:367-377, 1967.
18. TAFT, N. B. The problem of a standartized technique for the methyl green pyronin stain. Stain Technol. 26:205-212. 1951.
19. YASUMA, A. & ICHIKAWA, T. Ninhydrin-Schiff and alloxan-Schiff staining. A new histochemical staining method for proteins. J. Lab. clin. Med. 41:296-299, 1953.