

BRAGANTIA

Boletim Científico do Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo

Vol. 24

Campinas, maio de 1965

N.º 21

MORFOLOGIA DO VÍRUS DO MOSAICO COMUM DA MANDIOCA (1)

E. W. KITAJIMA, C. WETTER (2), A. R. OLIVEIRA, D. M. SILVA e A. S. COSTA, engenheiros agrônomos, Seção de Virologia, Instituto Agrônomo

RESUMO

Exames no microscópio eletrônico de preparações feitas pelo método do «dipping», de plantas infetadas com o vírus do mosaico comum da mandioca (VMCM), demonstraram a presença de partículas alongadas e flexíveis, com 13 m μ de diâmetro e cerca de 500 m μ de comprimento normal (CN) nas plantas infetadas, mas não nas sadias (contrôles). Partículas similares, em grande quantidade, foram as únicas presentes em preparações altamente purificadas e infetivas. Essas partículas, quando contrastadas negativamente, não mostraram possíveis detalhes ultra-estruturais.

Medições comparativas entre o VMCM e o vírus X da batatinha (VXB), que se assemelham morfológicamente, demonstraram que o CN do VMCM foi consistentemente menor que o do VXB em cerca de 17 m μ .

Em testes serológicos cruzados, com antissôro para VMCM e VXB de títulos relativamente altos (1/4096), nenhum grupo antigênico aos dois vírus pôde ser demonstrado.

Devido à morfologia das partículas, o VMCM pode ser incluído entre os vírus relacionados com o VXB, dos grupos 4 a 6 da classificação dos vírus de planta de forma alongada, proposta por Brandes e Wetter. As partículas desses vírus têm sido descritas como filamentosas e flexíveis, de CN entre 480 e 580 m μ .

A pequena mas perceptível diferença na morfologia, o fato de que grupos antigênicos comuns não puderam ser demonstrados, e as grandes diferenças no comportamento em relação às moléstias causadas pelo VMCM e o VXB, indicam não serem eles próximamente relacionados. O VMCM poderia ser considerado como uma entidade distinta dentro do grupo taxonômico dos vírus de planta alongados, representado pelo VXB.

1 — INTRODUÇÃO

Uma forma de mosaico em mandioca (*Manihot utilissima* Pohl.) é de ocorrência ocasional no Estado de São Paulo (18). Este vírus de-

(1) Trabalho apresentado na XV Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, realizada em Campinas, julho de 1963. Recebido para publicação em 25 de março de 1965.

(2) Professor de Botânica, Botanisches Institut, Univ. Saarbrücken, Alemanha.

nominado mosaico comum da mandioca (VMCM), já foi purificado (24), e sua natureza antigênica acha-se estabelecida (23).

Preparações rápidas para microscopia electrónica (8, 21) revelaram a presença de partículas alongadas associadas a essa moléstia, cuja morfologia se assemelha à do vírus X da batatinha (*Solanum tuberosum* L.). A suspeita de que o VMCM e o vírus X da batatinha (VXB) fôsem relacionados, dada esta semelhança, embora do ponto de vista patológico difiram consideravelmente (19), foi investigada no microscópio electrónico, procurando-se detectar diferenças na morfologia e, paralelamente, estudos serológicos foram efetuados para verificar relações de parentesco.

O propósito dêste trabalho é relatar os resultados dessas investigações.

2 — MATERIAL E MÉTODOS

a) Determinação do comprimento normal (7, 26) do VMCM e medicações comparativas com o VXB.

Fôlhas de diversas plantas com VMCM foram preparadas para microscopia electrónica pelo método do «dipping» (9). Tais preparações foram metalizadas com paládio ou cromo e examinadas no microscópio electrónico (Siemens Elmiskop I) (3), fotografando-se as partículas observadas a 5.000x e, para se efetuarem as mensurações, os negativos foram ampliados ópticamente 10x. O comprimento normal (CN) foi determinado com base no histograma de distribuição dos comprimentos das partículas (8, 11, 12, 26): para obtenção mediram-se de 100 a 300 partículas por preparação, e os valores obtidos foram distribuídos em classes de 25 m μ de intervalo.

Medições comparativas entre partículas do VMCM e do VXB foram feitas em condições as mais similares possíveis. Em geral, para estas medições o VXB provinha de plantas de fumo Turkish (*Nicotiana tabacum* L.), mas, em alguns casos, utilizaram-se plantas hospedeiras da mesma espécie para os dois vírus. A fim de reduzir a influência das flutuações na magnificação dada pelo microscópio electrónico, a preparação de um dos vírus era examinada e fotografada, e imediatamente a do outro vírus, sem mudar os contrôles do aparelho.

(*) Doação conjunta do Conselho Nacional de Pesquisa e Fundação Rockefeller.

b) Preparações purificadas.

Preparações do VMCM, altamente purificadas e infetivas, foram obtidas a partir de amendoim bravo (*Euphorbia prunifolia* Jacq.) infetado (24). Tais preparações foram examinadas no microscópio electrónico após serem contrastadas negativamente com ácido fosfotúngstico a 1% (16).

c) Serologia.

Antissoros contra o VMCM e o VXB foram obtidos injetando-se, em coelhos, preparações clarificadas pelo método do éter-tetracloro de carbono, seguidas de um ciclo de ultracentrifugação (25), de plantas de mandioca, infetadas com VMCM, e de fumo, com VXB. Injeções intravenosas foram aplicadas em doses médias de 2 ml, diariamente, durante uma semana. Cêrca de dois meses após a última aplicação foi feito um «booster» via intramuscular, tendo sido a preparação de vírus injetada com adjuvante Freund incompleto (25). O antissôro foi então obtido, extraíndo-se o sangue do coelho imunizado e separando-se os elementos figurados por centrifugação a baixa rotação. O sôro normal, para contrôle, foi obtido de coelhos não imunizados. As reações foram verificadas em testes de precipitina em tubo, em banho-maria a 37°C.

3 — RESULTADOS

Partículas alongadas e flexíveis, com cêrca de 15 m μ de diâmetro (figura 1-A), foram observadas em tôdas as preparações feitas pelo método de «dipping», provenientes de plantas infetadas com VMCM, mas não nas de plantas não inoculadas (contrôle). Partículas semelhantes foram observadas em preparações purificadas e infetivas.

Os CN destas partículas, determinados em diferentes preparações, apresentaram valores aproximadamente iguais (quadro 1), sendo a média das doze determinações, 498 m μ . O histograma de distribuição dos comprimentos das partículas acha-se representado na figura 2. Em preparações purificadas, as partículas ocorriam em grande quantidade. Entretanto, o comprimento dessas partículas foi bastante variado, indicando ter havido agregações e rupturas. Em preparações contrastadas negativamente com ácido fosfotúngstico, as partículas apresentaram-se como filamentos maciços, sem evidenciar detalhes ultraestruturais.

QUADRO 1. — Resultado das determinações do comprimento normal (1) das partículas do vírus do mosaico comum da mandioca em sete hospedeiras diferentes

Planta hospedeira	Número de partículas medidas	Comprimento normal em $m\mu$
Mandioca (<i>Manihot utilissima</i> Pohl.)	77	499
Idem	221	498
Idem	211	502
Amei-boim bravo (<i>Euphorbia prunifolia</i> Jacq.)	178	496
Idem	120	494
Idem	255	499
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste & Reyn. ...	122	499
Idem	258	492
<i>Chenopodium quinoa</i> L.	230	502
Maria preta (<i>Solanum nigrum</i> L.)	314	491
Caruru gigante (<i>Amaranthus</i> sp.)	269	495
Perpétua (<i>Gomphrena globosa</i> L.)	249	505
Total	2.522	498(2)

(1) Comprimento normal determinado considerando-se as partículas compreendidas entre as classes 425 a 575 $m\mu$, inclusive.

(2) Comprimento normal calculado a partir da curva de distribuição de todas as partículas medidas.

turais, à semelhança do que foi observado pelos autores com o VXB (figura 3).

Quando as partículas do VMCM foram medidas em condições comparativas com as do VXB, observou-se nas treze comparações efetuadas que o CN do VMCM foi consistentemente menor que o do VXB em cerca de 17 $m\mu$ (quadro 2), tendo sido o CN médio dessas determinações 494 e 511 $m\mu$, respectivamente para o VMCM e VXB. Sobrepondo-se as curvas de distribuição dos comprimentos das partículas, obtidas nessas medições comparativas, pode-se notar que o pico principal da curva de distribuição do VMCM está quase uma classe abaixo do VXB (Figura 4). Por outro lado, nessas medições comparativas notou-se que houve, realmente, pequenas flutuações na magnificação dada pelo microscópio eletrônico; entretanto, a diferença nos CN determinados para o VMCM e VXB em cada comparação efetuada, manteve-se mais ou menos constante.

Os resultados dos testes serológicos cruzados entre VMCM e VXB

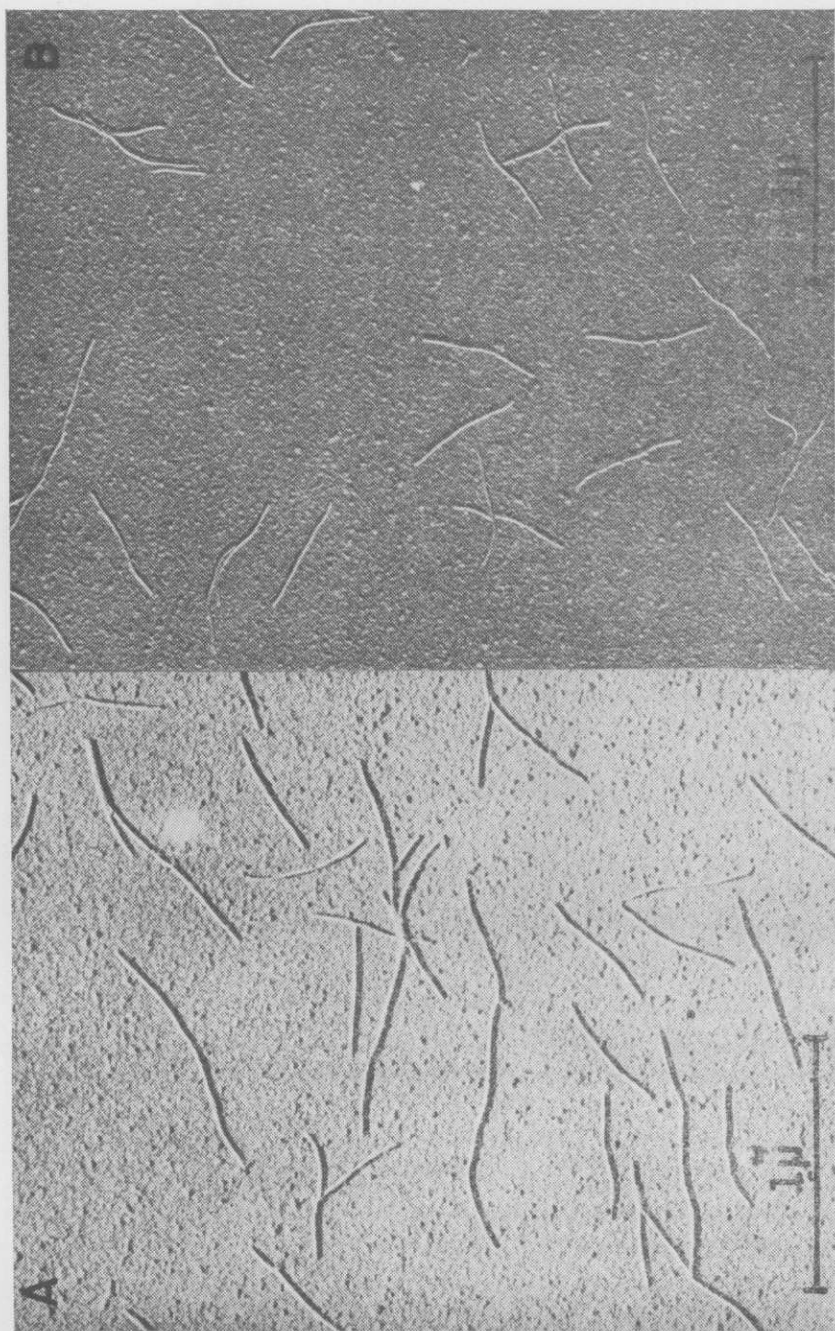


FIGURA 1. — Fotomicrografias electrónicas de preparações feitas pelo método de "dipping". A. Vírus do mosaico comum da mandioca, em *Chenopodium amaranticolor*. B. Vírus X da batatinha em *Nicotiana tabacum*.

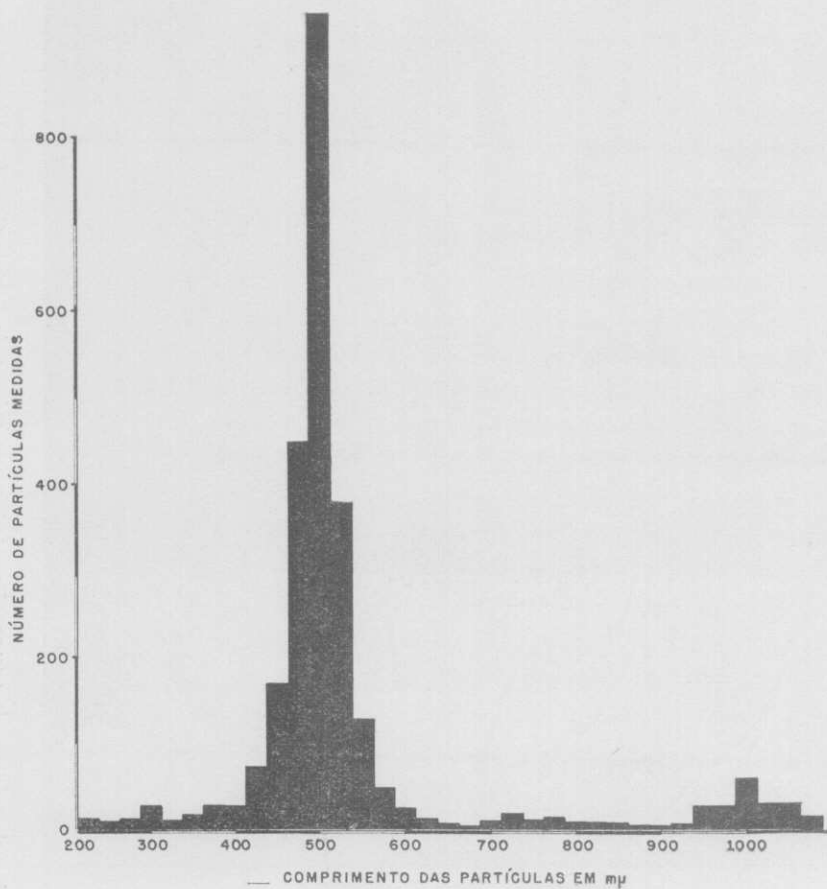


FIGURA 2. — Histograma da distribuição dos comprimentos das partículas do vírus do mosaico comum da mandioca.

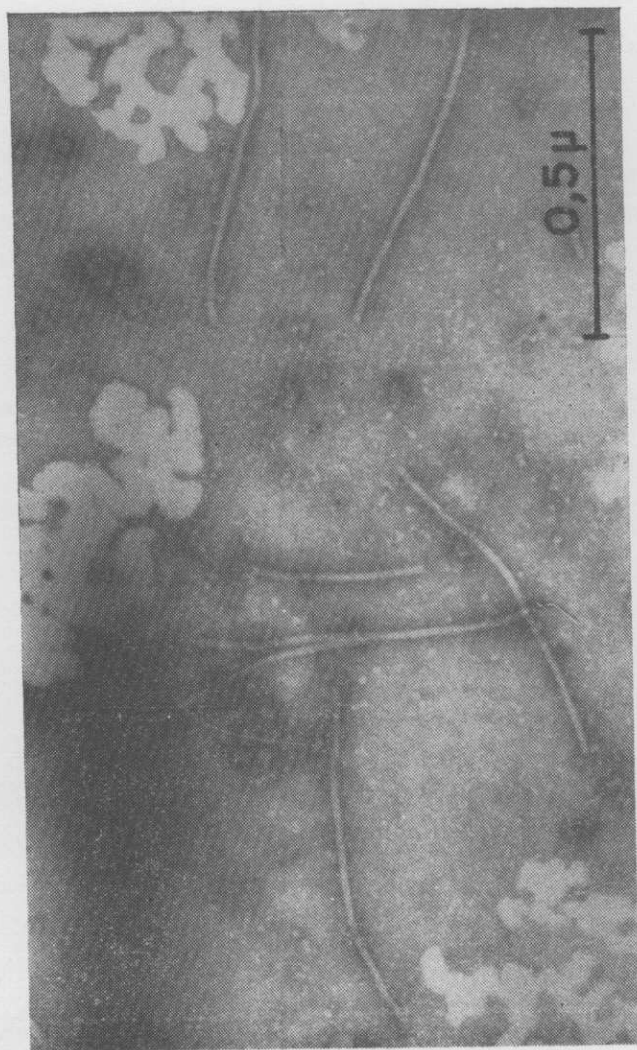


FIGURA 2. — Fotomicrografia electrónica do vírus do mosaico comum da mandioca, contrastada negativamente com ácido fofotungstático.

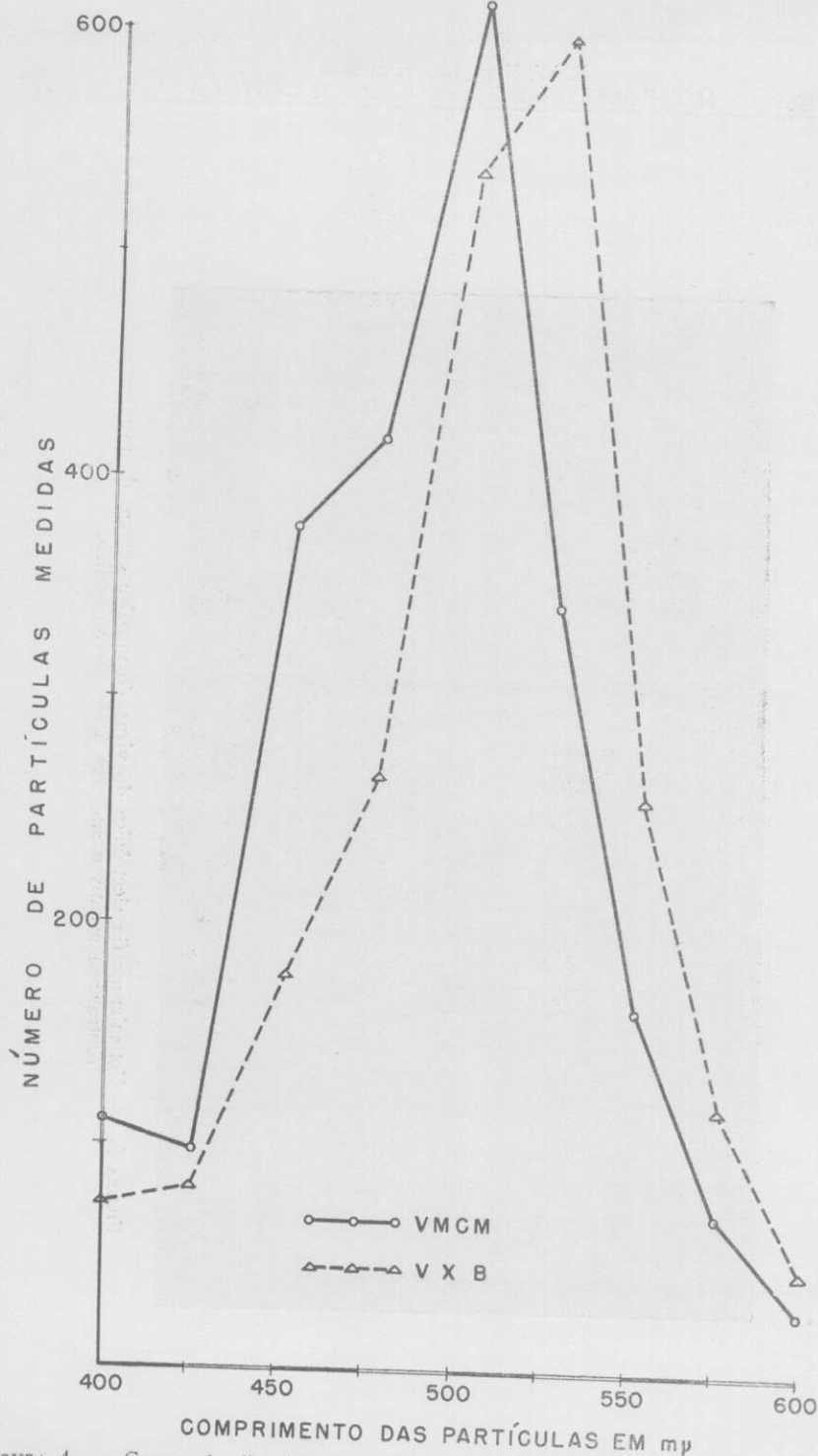


FIGURA 4. — Curvas de distribuição dos comprimentos das partículas dos vírus do mosaico comum da mandioca e X da batatinha, sobrepostas, mostrando a ligeira mas perceptível diferença entre elas.

QUADRO 2. — Resultado das medições comparativas entre as partículas do VMCM e do VXB

VMCM		VXB	
Planta hospedeira	CN	Planta hospedeira	CN
	<i>m_μ</i>		<i>m_μ</i>
1. Mandioca	498	Fumo (<i>Nicotiana tabacum</i> Q .	519
2. Idem	489	Idem	504
3. Idem	502	Idem	517
4. Idem	502	Idem	516
5. Idem	494	Idem	512
6. Idem	494	Idem	509
7. Idem	487	Idem	501
8. <i>Chenopodium amaranticolor</i> ...	505	Idem	521
9. Perpétua	491	Idem	506
10. Amendoim bravo	491	Idem	506
11. <i>Chenopodium quinoa</i>	476	Idem	489
12. Malva (<i>Malva peruviflora</i> L.) .	500	Malva	519
13. <i>Chenopodium amaranticolor</i>	497	<i>C. amaranticolor</i>	515
Média	494,3	Média	511

foram negativos, embora os títulos dos antissoros tivessem sido relativamente altos (quadro 3). Por outro lado, êsses testes revelaram a existência de uma substância antigênica nas plantas de mandioca, mesmo sadias, que não é completamente eliminada durante a clarificação.

QUADRO 3. — Título dos antissoros contra VMCM e VXB nas reações serológicas cruzadas

Antissôro	Cœelho n.º	Material usado para absorção (¹)	Título do antissôro na reação com			
			VMCM	MS	VXB	FS
VMCM	60	-----	4096	32	0	0
		MS	4096	0	0	0
		VXB	4096	0	0	0
		VMCM	0	0	0	0
	64	-----	512	16	0	0
		MS	512	0	0	0
		VXB	512	0	0	0
		VMCM	0	0	0	0
PVX	24	-----	0	0	4096	0
		MS	0	0	4096	0
		VXB	0	0	0	0
		VMCM	0	0	4096	0
	31	-----	0	0	1024	0
		MS	0	0	1024	0
		VXB	0	0	0	0
		VMCM	0	0	1024	0

(¹) MS — suco de mandioca sadia clarificado; FS — suco de fumo sadia clarificado.

4 — DISCUSSÃO

A constante presença de partículas alongadas, de 13 $m\mu$ de diâmetro e cêrca de 500 $m\mu$ de CN, em plantas pertencentes a espécies de várias famílias, quando infetadas com o VMCM, e o fato de serem essas partículas as únicas presentes em preparações altamente purificadas e infetivas, indicam representarem elas o VMCM.

Embora as partículas do VMCM se assemelhem morfológicamente às do VXB, medições em condições comparativas demonstraram que

elas são mais curtas que as do VXB em cêrca de 17 m μ . O CN das partículas do VXB obtido em tais condições concorda com os valores mencionados na literatura (7, 17), o que permite estabelecer como 500 m μ o CN das partículas do VMCM.

Quando contrastadas negativamente, as partículas do VMCM apresentaram-se como filamentos maciços, à semelhança do VXB, sem evidenciar a existência de subestruturas, tais como canal ou estrutura helicoidal. Entretanto, isto não implica na inexistência de qualquer organização interna nas partículas, pois estudos de difração de raio-X de partículas do VXB sugerem uma disposição helicoidal de suas subunidades, à semelhança das partículas do vírus do mosaico do fumo (3).

A variação nos valores dos CN obtidos nas medições comparativas foi da ordem de 5% entre os extremos; entretanto, as diferenças entre os CN do VMCM e do VXB, de cêrca de 17 m μ , mantiveram-se mais ou menos constantes. Assim, medições comparativas têm a virtude de permitir o confronto de vírus de CN muito próximos, independentemente das flutuações que normalmente ocorrem na magnificação dada pelo microscópio eletrônico.

O VMCM pode ser incluído entre os vírus relacionados ao VXB, que compreendem os vírus pertencentes aos grupos 4 a 6 da classificação dos vírus alongados proposta por Brandes e Wetter (15). De acôrdo com a forma e CN, os seguintes vírus pertencem a êste círculo de relações: VXB, 512 m μ (7, 17); vírus da mancha anular da hortência (*Hydrangea hortensis* Seybold), 493 m μ (5); vírus do mosaico do trêvo branco (*Trifolium* sp.), 478 m μ (5, 14); vírus X do cactus (*Opuntia* sp.), 519 m μ (2, 13); vírus do mosaico do Cymbidium, 490 m μ (20); vírus do mosaico amarelo do trêvo (*Trifolium repens* L.), 530 m μ (1, 6); e vírus do aucuba da batata 580 m μ (22).

Relações serológicas foram já estabelecidas entre os seguintes vírus: mosaico do trêvo branco, mancha anular da hortência, X da bata-tinha, X do cactus, mosaico amarelo do trêvo, e aucuba da batata (4, 5, 6, 11, 12, 13).

Embora houvesse uma ligeira diferença no CN entre VMCM e VXB, em vista dos exemplos acima mencionados, a hipótese de que êles se relacionassem foi testada serologicamente. Os resultados dos testes serológicos cruzados efetuados foram negativos, uma vez que não foi possível demonstrar nenhuma reação positiva com os antissoros utilizados (título de 1/4096).

Este resultado somente não exclui a possibilidade de que o VMCM esteja relacionado com VXB ou com os demais vírus relacionados ao VXB. A verificação de tal fato não foi possível em vista desses vírus não terem sido constatados entre nós, e também porque não foi possível efetuar-se um intercâmbio de antissoros.

A serologia também permitiu constatar a existência de uma substância antigênica em extratos de mandioca, que reage até uma diluição de 1/32, normalmente presente em extratos de mandioca. Mesmo em suco de folhas de «seedlings», sua presença foi constatada, o que praticamente exclui a possibilidade dessa substância representar um outro vírus.

Embora estudos mais detalhados sejam necessários entre o VMCM e os demais vírus do grupo do VXB, os dados até agora obtidos com relação ao VXB, isto é, a pequena mas perceptível diferença morfológica, o fato de que não foi possível demonstrar uma relação serológica, ao lado das grandes diferenças no comportamento com relação às moléstias por eles causadas, levam a indicar que estes vírus não são próximamente relacionados. O VMCM poderia então ser considerado como uma entidade distinta dentro do grupo taxonômico dos vírus de planta alongados (15), representado pelo VXB.

MORPHOLOGY OF CASSAVA COMMON MOSAIC VIRUS

SUMMARY

Elongated, flexible particles, measuring 15 $m\mu$ in diameter, and having a normal length (NL) of about 500 $m\mu$ were found in preparations made by dipping method from different host plants infected with cassava common mosaic virus (CCMV), whereas none were seen in non inoculated control plants. Particles with similar morphology were the only components of highly purified and infective preparations. These particles when negatively stained, showed no internal details.

Comparative measurements between CCMV and potato virus X (PVX) indicated consistently that the NL of CCMV is about 17 $m\mu$ shorter than that of PVX.

In serological cross reaction tests with antisera to CCMV and PVX of relatively high titre (1/4096) no common antigenic groups between both viruses could be demonstrated.

Because of the morphology of the particles, CCMV can be ranged among the PVX relatives of group 4-6 of the classification scheme for elongated plant viruses, as proposed by Brandes and Wetter. The particles of these viruses have been described as flexible threads ranging in normal length from 480 to 580 $m\mu$.

The slight but detectable difference in morphology, the fact that no common antigenic group could be demonstrated, and the differences in the diseases induced by CCMV and PVX suggest that these viruses are not nearly related. CCMV should be regarded therefore as a distinct entity within the taxonomic group of elongated plant viruses represented by PVX.

LITERATURA CITADA

1. AGRAWAL, H., CHESSIN, M. & BOS, L. Purification of clover yellow mosaic virus. *Nature* 194: 408-409. 1962.
2. AMELUNXEN, F. Die Virus-Eiweißspindeln der Kakteen. Darstellung, elektronenmikroskopische und biochemische Analyse des Virus. *Protoplasma* 49: 140-178. 1958.
3. BERNAL, J., & FANKUSCHEN, I. X-ray and crystallographic studies of plant virus preparations. *J. gen. Physiol.* 25: 111-165. 1941.
4. BERCKS, R. Untersuchungen über individuelle Unterschiede von Antisera gegen Kartoffel-X-Virus bei Reaktionen mit verwandten Viren. *Phytopath. Z.* 47: 301-313. 1963.
5. ——— & BRANDES, J. Vergleichende serologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen des Weisskleemosaik-Virus, des Hydrangea ringspot virus und des Kartoffel-X-Virus. *Phytopath. Z.* 42: 45-56. 1961.
6. ——— Elektronenmikroskopische und Serologische Untersuchungen zur Klassifizierung des clover yellow mosaic virus. *Phytopath. Z.* 47: 381-390. 1963.
7. BODE, O. & PAUL, H. L. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Kartoffel-Viren. I Vermessungen an Teilchen des Kartoffel-X-Virus. *Biochim. Biophys. Acta* 16: 343-345. 1955.
8. ——— Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Kartoffel-Viren. III. Vermessungen an Teilchen des Kartoffel-Y-Virus. *Phytopathol. Z.* 27: 107-112. 1956.
9. BRANDES, J. Eine elektronenmikroskopische Schnellmethode zum Nachweis faden- und stäbchenförmiger Viren, insbesondere in Kartoffel-Dunkelkeimen *Nachr. Bl. Dtsch. PflSchDienst, Braunschweig*, 9: 151-152. 1957.
10. ——— Einige Vermerkungen über den Nachweis von Kartoffelviren mit Hilfe des Elektronenmikroskops. *Proc. IV Conf. Pot. Dis., Braunschweig*. 170-175. 1960.
11. ——— Arrangement of elongated viruses according to morphological and serological data. *Personal, circular*, August 1962.
12. ——— Identifizierung von gestreckten pflanzen-pathogen Viren auf morphologischer Grundlage. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem*, Heft 100. 1964.
13. ——— & BERCKS, R. Untersuchungen zur Differenzierung und Klassifizierung des Kaktus-X-Virus. (cactus virus X). *Phytopath. Z.* 46: 291-300. 1962/63.
14. ——— & QUANTZ, L. Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Weisskleevirus und des Steinkleevirus. *Arch. Mikrobiol.* 26: 369-372. 1957.
15. ——— & WETTER, C. Classification of elongated plant viruses on the basis of particle morphology. *Virology* 8: 99-115. 1959.
16. BRENNER, S. & HORNE, R. W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biophys. Biochim. Acta* 34: 108-110. 1959.

17. CORBETT, M. K. Purification of potato virus X without aggregation. *Virology* 15: 8-15. 1961.
18. COSTA, A. S. Observações sôbre o mosaico comum e o mosaico das nervuras da mandioca (*Manihot utilissima* Pohl.). *J. Agron., Piracicaba* 3: 239-248. 1940.
19. ——— & KITAJIMA, E. W. Estudos sôbre o mosaico comum da mandioca. (Em preparo).
20. GOLD, A. R. & JENSEN, D. J. An electron microscope study of *Cymbidium* mosaico virus. *Am. J. Bot.* 38: 377-578. 1963.
21. JOHNSON, J. J. Virus particles in various plant species and tissues. *Phytopathology* 41: 78-93. 1961.
22. PAUL, H. L., BODE, O. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Kartoffelviren. V. Vermessung an Teilchen des Kartoffel-Aucuba-Virus. *Phytopath. Z.* 27: 456-460. 1956.
23. SILVA, D. M. Obtenção de antissôro contra o vírus do mosaico da mandioca. *Bragantia* 21: XCIX-CII. 1962.
24. ——— KITAJIMA, E. W. & OLIVEIRA, A. R. Obtenção do vírus do mosaico comum da mandioca purificado. *Ciência e Cultura* 15: 304. 1963.
25. WETTER, C. Partielle Reinigung einiger gestreckter Pflanzenviren und ihre Verwendung als Antigene bei der Immunisierung mittels Freundschens Adjuvantes. *Arch. Mikrobiol.* 37: 278-292. 1960.
26. ——— & BRANDES, J. Untersuchungen über das Kartoffel-S-Virus. *Phytopath. Z.* 26: 81-92. 1956.