

EVIDÊNCIA ELECTRONO-MICROSCÓPICA DE MULTIPLICAÇÃO DOS VÍRUS DO MOSAICO DO FUMO E DE VIRA-CABEÇA, EM TECIDO FOLIAR DE CAFEIEIRO ⁽¹⁾. E. W. KITAJIMA e A. S. COSTA ⁽²⁾. A mancha anular parece ser a única moléstia de etiologia viral comprovada ⁽³⁾, no Estado de S. Paulo, afetando cafeeiros (*Coffea arabica* L.). Os vírus do "spotted wilt" ⁽⁴⁾ e o da clorose infecciosa das malváceas ⁽³⁾ foram apontados como possíveis agentes causais. Recentes observações electrono-microscópicas demonstraram a presença de partículas similares às dos Rhabdovirus, associadas à mancha anular do cafeeiro ⁽⁵⁾.

Por outro lado, o cafeeiro tem sido experimentalmente infetado por diversos vírus, como o do mosaico do pepino, da necrose branca do fumo, de vira-cabeça e do mosaico do fumo ^(6, 7). Os trabalhos realizados indicam que êstes vírus se multiplicam localmente, podendo ser recuperados das lesões locais, mas não se tornam sistêmicos ^(6, 7).

Esta comunicação relata os resultados de exames histológicos de tecido foliar de cafeeiro, infetado pelos vírus de vira-cabeça ou mosaico do fumo, ao microscópio electrónico, os quais corroboram as evidências, obtidas pela patologia, de que êsses vírus ter-se-iam realmente multiplicado nos tecidos das folhas inoculadas.

Material e métodos — A inoculação mecânica do cafeeiro com um isolado, particularmente virulento, do vírus do mosaico do fumo (TMV) induz o aparecimento de lesões cloróticas com centro necrosado, em folhas inoculadas ⁽⁷⁾. Por outro lado, o vírus de vira-cabeça produz nas folhas inoculadas mecânicamente, man-

⁽¹⁾ Este trabalho recebeu auxílio financeiro da FAPESP (C. Agron. 69/879), CNPq (TC 12275) e do convênio CAPES/BID/BNDE. Recebido para publicação em 15 de julho de 1970.

⁽²⁾ Bolsistas do CNPq.

⁽³⁾ SILBERSCHMIDT, K. A transmissão experimental da mancha anular do cafeeiro. *O Biológico* 7:93-99, 1941.

⁽⁴⁾ BITANCOURT, A. A. A mancha anular, uma nova doença do cafeeiro. *O Biológico* 4:404-405, 1938.

⁽⁵⁾ KITAJIMA, E. W. & COSTA, A. S. Partículas similares a Rhabdovirus associadas à mancha anular do cafeeiro. (Em preparo)

⁽⁶⁾ COSTA, A. S.; SILVA, D. M. & CARVALHO, A. M. B. Infecção do cafeeiro com o vírus de vira-cabeça. *Bragantia* 19:XLVII-LII, 1960. Nota 11.

⁽⁷⁾ _____; _____ & KITAJIMA, E. W. Vírus que podem infetar o cafeeiro. (Em preparo)

chas cloróticas, às vezes similares às manchas anulares (6). Em ambos os casos os vírus inoculados podem ser recuperados das folhas inoculadas, todavia eles não se tornam sistêmicos (6, 7). Fragmentos de tais lesões, induzidas pelos vírus do mosaico do fumo ou de vira-cabeça, em folhas de cafeeiro, var. "Mundo Novo", foram fixados com tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 7, durante 12-18 horas, a 4°C (8). O material fixado foi desidratado em série crescente de concentração de acetona, e incluído em Epon (9). Secções ultra-finas dos blocos de Epon, foram obtidos em um ultramicrotomo Porter-Blum, MT-1, com auxílio de navalhas de vidro ou diamante, tendo elas sido coradas com acetato de uranila (10) e citrato de chumbo (11). Preparações análogas foram feitas de tecido de aparência normal, adjacente às lesões ou de plantas não inoculadas, para fins de contróle. O exame das secções foi feito em um microscópio eletrônico Elmiskop I, da Siemens (12).

Resultados: a) Tecidos infetados pelo vírus do mosaico do fumo.

O exame de secções ultrafinas, de lesões cloróticas das folhas inoculadas com TMV, indicaram consistentemente a ocorrência de massas de aspecto fibroso, de dimensões variadas, no citoplasma de muitas células da epiderme e do parênquima lacunoso e palisádico, mas não na zona vascular (estampas 1-3). Algumas delas eram bastante avantajadas, ocupando boa porção da célula (estampas 1, 2, 3), tendo 10 μ ou mais em seu lado maior. Essas inclusões eram compostas de partículas rígidas, de 10-15 μ m de diâmetro, dispostas lado a lado e comumente formando agregados compactos (estampas 2A e B, 3A). Ocasionalmente, grupos de partículas dispostas mais frouxamente puderam ser encontradas (estampa 1). A largura desses agregados variava de 0,5 a 2-3 μ . Frequentemente, tais agrupamentos se localizavam entre o tonoplasto e a parede celular ou grupo de orgânulos celulares (estampa 2A e B). Secções transversais das partículas

(8) MILLONIG, G. Studio sui fattori che determinano la preservazione della ultrastruttura. In: BUFFA, P., ed. From molecule to cell. Symposia on electron microscopy. Roma, C.N.R., 1964. p.347-362.

(9) LUFT, J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods. J. biophys. biochem. Cytol. 9:409-414, 1961.

(10) WATSON, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. J. biophys. biochem. Cytol. 4:475-478, 1968.

(11) 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.

(12) Doação conjunta da Fundação Rockefeller e do CNPq.

componentes das inclusões demonstraram a existência de uma zona central, menos densa, provavelmente representando o canal axial (estampa 3B). Em certas células, algumas das quais necrosadas, agregados de partículas de ca. 300 m μ apareciam estratificados (estampa 3A). Usualmente, a orientação das partículas nas camadas adjacentes não era perfeitamente paralela, criando-se assim, em secções longitudinais, uma configuração conhecida como "espinha de peixe".

As inclusões localizavam-se em áreas do citoplasma, usualmente ricas em ribosomas, e em nenhum caso pôde-se notar uma associação específica entre elas e outros orgânulos celulares. Raramente notou-se partículas componentes das inclusões, dispersas individualmente na célula. Também, com baixa frequência, notou-se a ocorrência de grupos de partículas no vacúolo (estampa 1).

Muitas das células, apesar de conterem enormes inclusões, não apresentavam alterações profundas em seu aspecto geral, embora outras mostrassem certo adensamento de seu conteúdo e algumas estivessem completamente necrosadas. Estas últimas tinham seu volume extremamente reduzido e seu conteúdo achava-se totalmente adensado, exceto as inclusões, que eram perfeitamente identificáveis (estampa 3A).

Dentre os diferentes orgânulos celulares, os cloroplastos foram aparentemente os únicos a mostrarem efeitos da infecção, apresentando sinais de degenerescência, tais como desorganização das lamelas, aumento do estroma, acúmulo de grãos de amido, presença de formações cristalinas, provavelmente de fitoferritina, e aumento nas dimensões e número de grãos densos, osmiófilos (estampa 3C).

Não se observou, em nenhum caso, o aparecimento de formações complexas, do tipo corpo-X, usualmente presentes em outras plantas infetadas pelo TMV (¹³, ¹⁴).

b) Tecidos infetados pelo vírus de vira-cabeça.

Partículas de perfil circular ou elíptico, de diâmetro máximo entre 90 e 120 m μ , foram observadas com certa frequência, em secções ultrafinas das lesões induzidas pelo vírus de vira-cabeça. Tais partículas ocorriam sempre no interior de cavidades limi-

¹³ ESAU, K. & CRONSHAW, J. Relation of tobacco mosaic virus to the host cells. *J. Cell Biol.* 33:665-678, 1967.

¹⁴ KOHLEMAINEN, L.; ZECH, H. & VON WETTSTEIN, D. The structure of cells during tobacco mosaic virus reproduction. Mesophyll cells containing virus crystals. *J. Cell Biol.* 25 (part 2):77-97, 1965.

tadas por membranas, muitas das quais eram obviamente contínuas com elementos do retículo endoplasmático (estampa 4). A maioria das partículas foram notadas em células da epiderme, inferior ou superior, e bastante raramente nos parênquimas lacunoso e palisádico, bem como na região vascular. Afora certas alterações nos cloroplastos, principalmente no sistema lamelar, poucas alterações puderam ser observadas nas células que continham as partículas esferoidais. Todavia, algumas células do parênquima, tanto lacunoso como palisádico, apareciam em diferentes estádios de necrose, a julgar pelo seu adensamento. Massas densas, como aquelas encontradas ocasionalmente em tecidos de outras hospedeiras infetadas pelo vírus de vira-cabeça⁽¹⁵⁾, não puderam ser notadas.

c) Tecidos de aparência normal, adjacentes às lesões e de plantas não inoculadas.

Exame de áreas verdes, vizinhas às lesões, bem como de tecidos foliares de plantas não inoculadas, não revelaram a presença de inclusões semelhantes àquelas encontradas quando da infecção com o vírus do mosaico do fumo, ou de partículas esferoidais, associadas à infecção pelo vírus de vira-cabeça.

Discussão — As partículas alongadas, rígidas, componentes das inclusões encontradas nas áreas cloróticas de cafeeiro inoculado com o TMV devem representar esse vírus *in situ*. Além da constante associação com a infecção, suas dimensões gerais bem como sua natureza tubular coincidem bem com as características morfológicas, já amplamente descritas para o TMV. Também o aspecto geral das inclusões é idêntico ao já relatado em tecidos de outras plantas infetadas pelo TMV^(13, 14, 16-19). Todavia nos tecidos de cafeeiro infetado pelo TMV, estruturas como o corpo-X⁽¹³⁻¹⁴⁾ não puderam ser observadas, o que aparentemente confirma resultados anteriores, que descrevem sua presença apenas em infecções sistêmicas. No caso de inclusões formadas por estratificação de várias camadas de ca. 300 m μ de

⁽¹⁵⁾ KITAJIMA, E. W. Electron microscopy of vira-cabeça (Brazilian spotted wilt) virus within the host cell. *Virology* 26:89-99, 1965.

⁽¹⁶⁾ MILNE, R. G. Multiplication of tobacco mosaic virus in tobacco leaf palisade cells. *Virology* 28:79-89, 1966.

⁽¹⁷⁾ ————. Electron microscopy of tobacco mosaic virus in leaves of *Chenopodium amaranticolor*. *Virology* 28:520-526, 1966.

⁽¹⁸⁾ SHALLA, T. A. Assembly and aggregation of tobacco mosaic virus in tomato leaflets. *J. Cell Biol.* 21:253-264, 1964.

⁽¹⁹⁾ WARMKE, H. E. & EDWARDSON, J. R. Electron microscopy of crystalline inclusions of tobacco mosaic virus in leaf tissues. *Virology* 30:45-57, 1966.

espessura, elas seriam formadas pelas partículas unitárias do TMV. Partículas mais longas (0,5-3 μ), componentes de inclusões, devem representar agregados terminais do vírus.

Curiosamente, grupos de partículas puderam ser facilmente detectadas mesmo em células completamente necrosadas, demonstrando a extrema estabilidade física das partículas componentes. Em tecido necrosado de lesões locais de *Nicotiana glutinosa* L., a identificação das partículas do TMV parece ter sido mais difícil, tendo mesmo havido certa polêmica a respeito ⁽²⁰⁻²¹⁾.

Por outro lado, as partículas esferoidais, detectadas em lesões locais de folha de café inoculada pelo vírus de vira-cabeça, podem ser identificadas como sendo as desse vírus, dada a similaridade em morfologia e localização intracelular, conforme já descrito em outras hospedeiras do vírus de vira-cabeça ⁽¹⁵⁾. Não há contudo explanação satisfatória para explicar sua ocorrência preferencial nas células da epiderme, embora o parênquima reflita os efeitos da infecção, conforme indica o fato de muitas das células desse tecido estarem em diferentes fases de necrose.

No caso do TMV, a ausência de inclusões na região vascular, sugerindo ausência de infecção, poderia decorrer de uma possível resistência deste tecido à infecção pelo TMV, e que em última análise refletiria na restrição da infecção à área de penetração do vírus. Todavia, a mera ausência de partículas não implica necessariamente na não infecção, e seria talvez possível que algumas partículas atingissem a região vascular e chegassem mesmo a ser transportadas para outras partes da planta, mas seriam incapazes de lá se multiplicarem, ou mesmo saírem da região vascular. Esta segunda alternativa parece servir melhor ao caso do vírus de vira-cabeça, onde poucas partículas puderam mesmo ser observadas nos elementos do floema.

O tipo de alteração observado em muitos dos cloroplastos, em tecidos infetados pelo TMV ou vírus de vira-cabeça, mas mais conspicua com o primeiro, é semelhante ao tipo de degeneração descrito por Arnott *et al* ⁽²²⁾, como "tilacoidal", e sem dúvida deve ser responsável pelo aspecto clorótico da área infetada.

⁽²⁰⁾ HAYASHI, T. & MATSUI, C. Fine structure of lesion periphery produced by tobacco mosaic virus. *Phytopathology* 55:387-392, 1965.

⁽²¹⁾ WEINTRAUB, M. & RAGETLI, H. W. J. An electron microscope study of tobacco mosaic virus lesions in *Nicotiana glutinosa* L. *J. Cell Biol.* 23:499-509, 1964.

⁽²²⁾ ARNOTT, J. J.; ROSSO, S. W. & SMITH, K. M. Modification of plastid ultrastructure in tomato leaf cells infected with tobacco mosaic virus. *J. Ultrastruct. Res.* 27:149-167, 1969.

A ocorrência de numerosas inclusões compostas de apreciável quantidade de partículas do TMV e também de um grande número de partículas identificadas como sendo as do vírus de vira-cabeça, em tecidos inoculados com êsses vírus, constituem-se numa evidência bastante significativa de que houve realmente multiplicação dêsses patógenos nos tecidos do cafeeiro. A mera introdução das partículas durante a inoculação mecânica não poderia explicar a abundância das partículas e sua localização, mesmo em células mais distantes da epiderme, e vêm confirmar os dados obtidos pela patologia (6, 7). SEÇÃO DE VIROLOGIA, INSTITUTO AGRONÔMICO DO ESTADO DE SÃO PAULO.

ELECTRON MICROSCOPICAL EVIDENCES FOR THE MULTIPLICATION OF TOBACCO MOSAIC AND VIRA-CABEÇA (BRAZILIAN TOMATO SPOTTED WILT) VIRUS, WITHIN COFFEA LEAF TISSUES

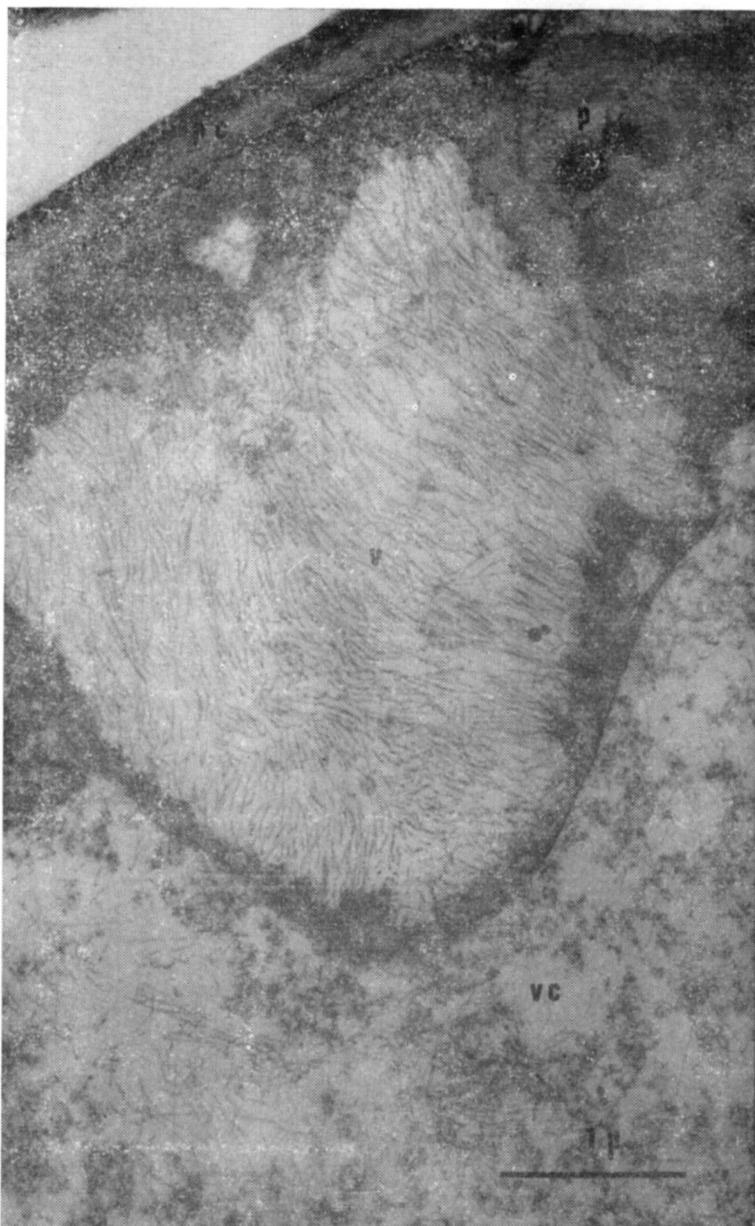
SUMMARY

Coffea plants (*Coffea arabica* L.) may be infected with vira-cabeça (Brazilian tomato spotted wilt) or tobacco mosaic (TMV) viruses, by mechanical means. Vira-cabeça virus (VCV) induces on leaves of inoculated plants, chlorotic spots, resembling ringspot, while a virulent isolate of TMV causes chlorotic lesions with a necrotic center. In both cases, the viruses did not become systemic.

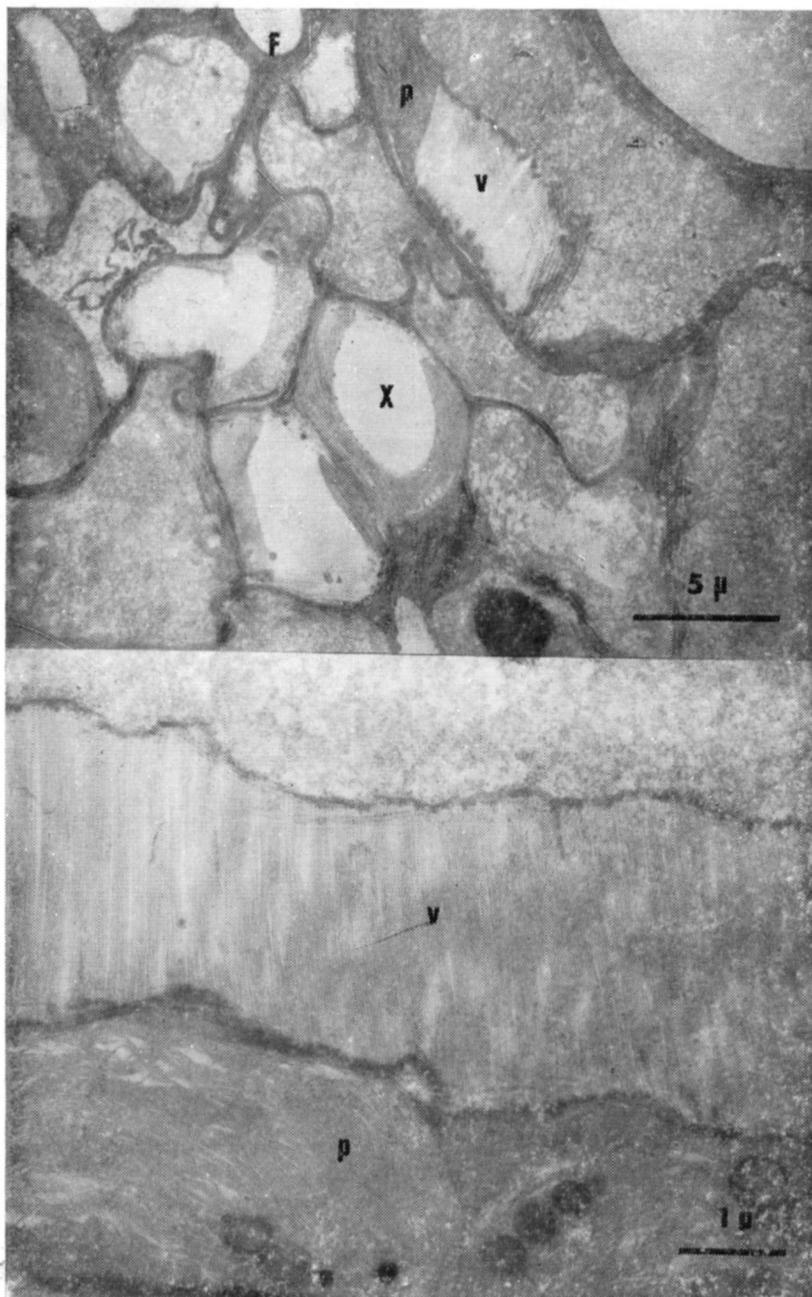
Thin section profiles of leaf tissues obtained from the lesions caused by TMV or VCV were examined in the electron microscope. In cells from chlorotic lesions of TMV-inoculated coffee leaves, many cytoplasmic inclusions, with a fibrous aspect, were found. These inclusions were observed in epidermal, spongy and palisade parenchyma, but not in the vascular region. The rod-like particles, components of the inclusion are considered as TMV *in situ*. The fibrous inclusions were still identifiable, even in completely necrotic cells. X-body-like inclusions on the other hand, could not be seen.

In cells from the lesion induced by VCV, spheroidal particles, identified as those of the inoculated virus, were found mostly in epidermal cell. The particles were always within the endoplasmic reticulum elements.

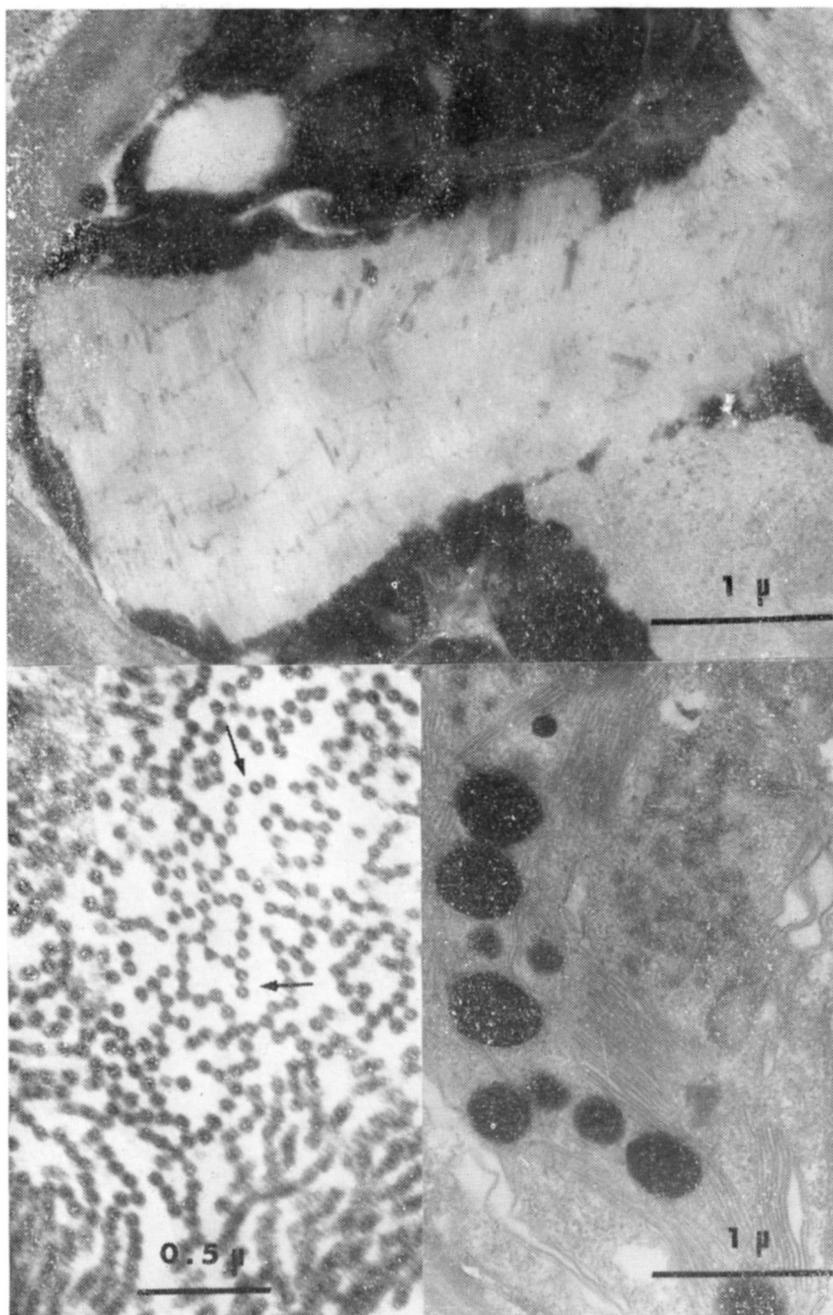
The finding of a large number of virus particles, in foliar tissue of coffee, infected by TMV or VCV, is considered as an evidence for the multiplication of these virus in the inoculated tissue, and supports previous pathological observations.



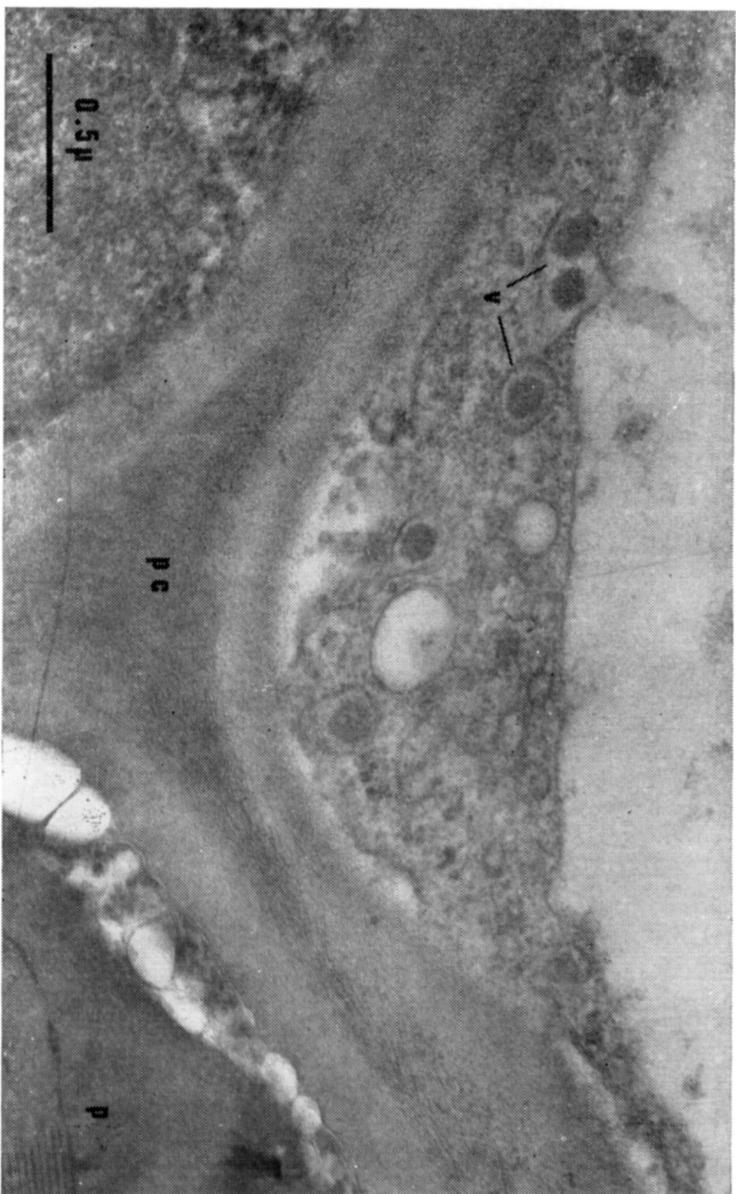
Micrografia electrónica de tecido foliar de café experimentalmente infetado pelo vírus do mosaico do fumo (TMV), mostrando um agregado de partículas (v) numa célula do parênquima lacunoso. Notam-se também partículas dispersas no vacúolo (vc). p- plastídeo; pc- parede celular.



A- Parte da região vascular de fôlha de cafeeiro, infetado pelo TMV. Um agregado de partículas do vírus (v) pode ser visto numa célula do parênquima lacunoso, adjacente ao feixe vascular. F- floema; X- xilema; p- plastideo; B- Um arranjo ordenado de partículas do TMV (v) numa célula do parênquima palisádico. p- plastideo.



A- Célula do parênquima palisádico, necrosado, mas contendo ainda intacto um agregado ordenado do TMV formando um arranjo conhecido como "espinha de peixe"; B- Seção transversal de um grupo de partículas do TMV, mostrando sua natureza tubular (setas); C- Detalhe de um cloroplasto em degeneração, exibindo um sistema lamelar em desorganização, além de numerosos glóbulos osmiófilos e pequenas formações cristalinas, provavelmente de fitoferritina.



Parte da célula da epiderme superior de folha de caféiro, experimentalmente infectado pelo vírus de Vira-cabeça. Partículas do vírus (V) aparecem no citoplasma, contidas no retículo endoplasmático. pc- parede celular; p- plastídeos.