



INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPTO. DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

ESTUDO COMPARATIVO AO MICROSCÓPIO
DE LUZ E ELECTRÔNICO DE DOIS VÍRUS
DE LEGUMINOSAE

I.J.B. CAMARGO

CAMPINAS - S. PAULO

C. P. 1170

ESTUDO COMPARATIVO AO MICROSCÓPIO
DE LUZ E ELECTRÔNICO DE DOIS VÍRUS.
DE LEGUMINOSAE

I.J.B. CAMARGO

ESTUDO COMPARATIVO AO MICROSCÓPIO DE LUZ E ELECTRÔNICO DE DOIS
VÍRUS DE LEGUMINOSAE

Irineu José Barsanti de Camargo

Tese apresentada ao Departamento
de Microbiologia e Imunologia da
Universidade Estadual de Campi-
nas para a obtenção do Grau de
Doutor.

Orientador: Prof.Dr. Elliot W. Kitajima

Aos meus pais,
esposa e filha.

AGRADECIMENTOS

O autor deseja externar os agradecimentos

- Ao Professor Elliot W. Kitajima pela orientação e sugestões apresentadas na elaboração desta tese.
- Ao Dr. Álvaro Santos Costa pelas sugestões e por me haver cedido as plantas infetadas pelos vírus.
- Ao Professor Humberto de Araújo Rangel pelas sugestões e incentivo demonstrado durante a realização da tese.
- Ao Professor Avelino Rodrigues de Oliveira pelas sugestões e pela purificação dos vírus.
- À Professora Carminda da Cruz Landim por ter me iniciado nos trabalhos científicos.
- À minha esposa, Ana Maria Faaccioli de Camargo, pela colaboração e companheirismo constante.
- Ao Professor Walter A. Hadler, Professora Maria Luíza Silveira Mello e Eng. Agrônomo Tomomasa Yano pela colaboração prestada em diversas oportunidades.

O serviço de datilografia foi executado pela Srta. Ivone A. Onisto.

O presente trabalho foi iniciado na Seção de Virologia do Instituto Agrônomo de Campinas e concluído no Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas, com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisas. Aos diretores, colegas e técnicos destas Instituições, que direta ou indiretamente colaboraram neste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

ÍNDICE

Página

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Vírus do Mosaico em Desenho do Fei- joeiro (VMDF)	3
2.2. Vírus do Mosaico da <u>Vigna</u> (VMV)	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Vírus	10
3.2. Plantas	10
3.3. Técnicas de Microscopia de Luz	10
3.3.1. Fragmentos de epiderme	10
3.3.2. Secções de tecidos	11
3.4. Técnicas de Microscopia Electrônica	12
3.4.1. Métodos para estudos morfológicos	12
3.4.2. Métodos histológicos de secção ul- trafina	13
4. RESULTADOS	16
4.1. Vírus do Mosaico em Desenho do Feijoeiro	16
4.1.1. Microscopia de luz	16
4.1.2. Microscopia electrónica	18
4.1.2.1. Estudo sobre a morfologia das partículas	18
4.1.2.1.1. Preparações "leaf- -dip" contrastadas negativamente	18
4.1.2.1.2. Preparações purifi- cadas	18
4.1.2.2. Secções ultrafinas de tecidos infetados	19
4.2. Vírus do Mosaico da <u>Vigna</u>	27
4.2.1. Microscopia de luz	27
4.2.2. Microscopia electrónica	29
4.2.2.1. Estudo sobre a morfologia das partículas	29
4.2.2.1.1. Preparações "leaf- -dip" contrastadas negativamente	29
4.2.2.1.2. Preparações purifi- cadas	30
4.2.2.2. Secções ultrafinas de tecidos infetados	32
4.2.2.2.1. Aspectos gerais dos tecidos infe- tados	32
4.2.2.2.2. Diferenças entre os tecidos infeta- dos e os tecidos sã	

4.2.2.2.3. Exame de amostras de tecidos coletados periodicamente	39
4.3. Ultraestrutura do Tecido Foliar de Feijoeiro Infetado com o VMDF e VMV	42
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÕES	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

No Estado de São Paulo tem sido isolado e identificado um grande número de viroses em leguminosas cultivadas, principalmente em feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.), soja (Glycine max L. (Merr)) e feijão macassar (Vigna sinensis Endl.). Somente em feijoeiro e feijão macassar já foram constatadas 10 moléstias de etiologia viral (Costa et al., 1969, 1971). Apesar do número elevado de viroses encontradas em feijoeiro no Estado de São Paulo, com exceção talvez do mosaico dourado, as moléstias e vírus não chegam a representar fator limitante para a cultura (Costa, A.S., comunicação pessoal), principalmente quando comparados com os dados obtidos na Holanda e Austrália, onde os efeitos da infecção do vírus do mosaico comum podem reduzir até 50% da produção (Corbett, 1965).

Dentre os vírus que infetam naturalmente o feijoeiro, três deles causam sintomas semelhantes de mosaico nas folhas: mosaico comum do feijoeiro, mosaico amarelo do feijoeiro e mosaico em desenho do feijoeiro (Costa et al., 1971). Em feijão macassar ocorre, na natureza, um vírus que também causa sintomas de mosaico em feijoeiro (Costa et al., 1969).

Os vírus do mosaico comum e mosaico amarelo do feijoeiro pertencem a um mesmo complexo, devido à semelhança morfológica das partículas e relações serológicas (Beemster & van der Want, 1951; Brandes & Quantz, 1955). Esses vírus pertencem ao grupo morfológico do vírus Y da batata, medindo 750 nm de comprimento normal (Brandes, 1964).

O vírus do mosaico em desenho do feijoeiro (VMDF), coletado na região de Campinas, infeta plantas de feijoeiro causando sintomas de mosaico leve nas folhas. As partículas desse vírus são isométricas e medem 25-30 nm de diâmetro. Não se conhecem as relações serológicas do VMDF com outros vírus já descritos, havendo sugestões de que aquele possa pertencer ao grupo do "southern bean mosaic virus", apesar de terem algumas características diferentes (Costa et al., 1971).

O vírus do mosaico do feijão macassar, conhecido também como vírus do mosaico da Vigna (VMV), foi isolado de plantas de feijão macassar, podendo artificialmente infectar algumas variedades de feijoeiro. As partículas desse vírus são isométricas e medem 25-30 nm de diâmetro. As características sintomatológicas da moléstia, a morfologia das partículas e as relações serológicas permitem incluí-lo no grupo do "cowpea mosaic virus" (CPMV) (Costa et al., 1969; Oliveira et al., 1969).

O fato do VMDF e do VMV induzirem sintomas de mosaico em feijoeiro e apresentarem partículas semelhantes, levou-nos a efetuar um estudo comparativo entre eles. Ao microscópio de luz foram investigadas as anomalias citológicas associadas à infecção e a ação da pepsina sobre elas. Ao microscópio eletrônico foram estudadas a morfologia das partículas em preparações "leaf-dip" e em preparações purificadas. Foi investigada também, comparativamente, a ultraestrutura dos tecidos infetados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Vírus do Mosaico em Desenho do Feijoeiro

O vírus do mosaico em desenho do feijoeiro (VMDF) foi isolado de plantas de feijoeiro na região de Campinas. Experimentalmente este vírus pode causar sintomas de mosaico em desenhos simétricos ou raramente lesões necróticas em 120 variedades de feijoeiros testados. Apesar do alto índice de infectividade nas variedades de feijoeiro, o círculo de hospedeiras do VMDF com relação a outras espécies é bastante restrito, tendo sido recuperado em testes de estufas, apenas de soja sem sintomas aparentes da moléstia. As plantas de feijoeiro com sintomas do vírus não apresentam redução do porte e os prejuízos causados são considerados pequenos. Não se conhece ainda a maneira pela qual a doença é transmitida na natureza. Tentativas de transmissão por afídeos, tais como Myzus persicae Sulz., Aphis gossypii Glov. e Macrosiphum euphorbiae Thom. têm produzido resultados negativos. Tampouco foi observada a transmissão do vírus através da semente (Costa et al., 1971).

Estudos histológicos preliminares ao microscópio eletrônico mostraram a existência de partículas isométricas de 25-30 nm, formando inclusões cristalinas no citoplasma de plantas de feijoeiro e soja infetadas com o VMDF (Camargo et al., 1969).

Embora ainda não se disponham de evidências imunológicas acerca do VMDF, é possível que ele faça parte do complexo do vírus do mosaico do feijoeiro do sul (SBMV), encontrado na região sul dos Estados Unidos por Zaumeyer e Harter (1943). Esses autores descreveram dois isolados desse vírus com características físicas e químicas comuns, mas distintos porque apenas um deles é transmitido através da semente. O SBMV causa sintomas de mosaico ou lesões necróticas nas folhas de feijoeiro e soja, não tendo sido recuperado de outras espécies de plantas.

Outras estirpes do SBMV foram também isoladas do feijoeiro (estirpe severa) no México (Yerkes & Patino, 1960).

de Vigna sinensis sp. (estirpe "cowpea") nos Estados Unidos (Shepherd & Fulton, 1962). Estas duas estirpes e também aquelas isoladas por Zaumeyer e Harter (1943) apresentam algumas propriedades biológicas diferentes, mas estão serologicamente relacionadas (Grogan & Kimble, 1964).

As partículas do SBMV foram purificadas pela primeira vez por Price et al. (1945), observando que elas podem ser cristalizadas em presença de sulfato de amônia ou magnésio, na forma de prismas e pirâmides rômnicas, identificáveis ao microscópio de luz (Price, 1946). Em preparações metalizadas as partículas apareciam em arranjos cristalinos, medindo 25 nm de diâmetro cada unidade (Price et al., 1946). Utilizando a técnica de replicação, Labaw e Wyckoff (1957) observaram que os cristais obtidos em preparações purificadas são constituídos por partículas em arranjos cúbicos, medindo 34,5 nm de diâmetro. O coeficiente de sedimentação das partículas do SBMV é de 114 S e o coeficiente de difusão $1,34 \times 10^{-7}$ cm/seg (Miller & Price, 1946). O peso molecular da partícula do SBMV foi calculado em $6,6 \times 10^6$ (Miller & Price, 1946) e, mais recentemente, em $6,1 \times 10^6$ (Lauffer et al., 1952). O ponto isoelétrico das partículas varia entre o pH 4,0-6,0, dependendo da estirpe (Magdoff-Fairchild, 1967).

Miller e Price (1946) determinaram a composição química do SBMV e mais recentemente foi verificado que as subunidades da partícula contêm 270 resíduos de aminoácidos (Tremaine, 1966) e que o seu peso molecular é de 29.000 (Ghabrial et al., 1967), igual para as três estirpes (feijoeiro, severa e "cowpea"). O ácido nucleico do SBMV é do tipo RNA de hélice simples, com peso molecular de $1,4 \times 10^6$ e com coeficiente de sedimentação de 25 S (Diener, 1965).

O SBMV foi utilizado como modelo para o estudo da translocação de vírus em tecidos de plantas, tendo sido demonstrado que as partículas do vírus são transportadas no fluxo do xilema assim como no floema e que na direção das folhas a translocação das partículas é mais rápida e eficiente do que na direção da raiz (Schneider & Worley, 1959a,b).

Edwardson et al. (1966) foram os primeiros a descrever a ultraestrutura dos tecidos infetados com o SBMV, relatando partículas isométricas de 20,5nm de diâmetro, agrupadas ou isoladas no citoplasma das células, similares às aquelas notadas em secções ultrafinas de "pellets" do vírus purificado. De Zoeten e Gaard (1969) e Weintraub e Ragetli (1970a) demonstraram a ocorrência de partículas de vírus dispersas no citoplasma, no nucleoplasma, nos vacúolos e, esporadicamente, formando inclusões cristalinas ou paracristalinas em tecido foliar de feijoeiro infetado pela estirpe feijoeiro do SBMV. De Zoeten e Gaard (1969) relataram um diâmetro de 26-29 nm para as partículas encontradas nos tecidos foliares assim como nas secções de "pellets" do vírus purificado.

Weintraub e Ragetli (1970a) verificaram, em secção ultrafina de Vigna sinensis Endl., que as partículas do SBMV estirpe "cowpea" aparecem formando cristais no núcleo e no citoplasma, 13 dias após a inoculação do vírus. O diâmetro das partículas nesses cristais varia entre 24-25 nm. Contudo, quando esses tecidos foram fixados em uma mistura de acroleína e formalina e incluídos em glicol metacrilato (GMA-resina hidrossolúvel), as partículas cristalizadas apresentavam 27,6 nm de diâmetro (Weintraub & Ragetli, 1970b). A diferença no diâmetro das partículas do SBMV, relatadas nesses dois trabalhos, foi atribuída pelos autores aos diferentes meios de inclusão utilizados. As investigações citoquímicas, realizadas nos tecidos incluídos em GMA, mostraram que as partículas de vírus, nas secções tratadas com pepsina durante 30 minutos, tinham seu diâmetro reduzido para 20,5 nm, sugerindo que a camada externa da capa protéica de 3,6 nm era sensível à pepsina. Por outro lado, nas secções tratadas com Rnase durante uma hora, observaram o aparecimento de uma zona central clara de 11,8 nm de diâmetro, provavelmente a região onde se localiza o RNA (Weintraub & Ragetli, 1970b).

2.2 Vírus do Mosaico da Vigna

A ocorrência de viroses em feijão macassar tem sido descrita no Rio Grande do Sul e no Nordeste - região

onde a cultura é importante na alimentação do homem (Oliveira, 1947 ; Vital et al., 1969).

Recentemente, Costa et al. (1969) e Caner et al. (1969) isolaram, no Estado de São Paulo em feijão macassar, um vírus que causa mosaico nas folhas, sendo denominado vírus do feijão macassar ou vírus do mosaico da Vigna (VMV). Este vírus pode ser transmitido mecanicamente com relativa facilidade não só para várias leguminosas, entre as quais o feijoeiro e a soja, como também para alguns membros da família Chenopodiaceae (Chenopodium quinoa Wild. e C. amarantifolium Coste & Reyn.) e da família Amaranthaceae (Gomphrena globosa L.), mas desconhece-se ainda a maneira pela qual este vírus é transmitido na natureza. Experimentalmente não foi obtida a transmissão por afídios e não foi observada a transmissão pela semente. As partículas do VMV são de conformação esferoidal, medem 25-30 nm de diâmetro e ocorrem em alta concentração nos tecidos. Como o feijão macassar não é cultivado economicamente no Estado de São Paulo, a importância desse vírus como moléstia é diminuta, representando, no entanto, uma ameaça em potencial para a cultura de feijoeiro e soja.

Os estudos de patologia, morfologia das partículas e testes serológicos cruzados indicam que o VMV pertence ao grupo do CPMV descrito por Agrawal (1964) (Costa et al., 1969; Caner et al., 1969; Oliveira et al., 1969).

O CPMV foi descrito pela primeira vez por Smith (1924) nos Estados Unidos da América do Norte. Este vírus causa sintomas de mosaico, enrugamento e distorção das folhas de Vigna sp e outras leguminosas, tendo sido transmitido através do inseto mastigador Ceratonia trifurcata Forst. (Coleoptera).

Uma estirpe do CPMV descrita em Trinidad pôde ser transmitida por Ceratonia rubicornis e pela semente de plantas de Vigna unguiculata L. (Walp) (Dale, 1949, 1953). Na Nigéria, Chant (1959, 1962) isolou um vírus com características semelhantes àsquelas do CPMV, descrito por Dale (1949). Nos Estados Unidos da América do Norte, Shepherd (1964) des-

creveu um vírus com círculo de hospedeiro diferentes, mas que estava relacionado serologicamente com o CPMV.

Agrawal (1964) estudou as características biológicas, biofísicas, bioquímicas e imunológicas de cinco isolados do CPMV, sendo três da América do Sul, um da Nigéria e um da Trinidad. Esses isolados estão relacionados serologicamente, sendo que três deles reagem mais fortemente entre si, o mesmo ocorrendo com os outros dois isolados, levando o autor a separá-los em duas estirpes distintas: amarela e severa. Os anti-soros dos cinco isolados do CPMV não reagiram com diversos vírus isométricos, com exceção ao "pod mottle" do feijoeiro. Em preparações purificadas e submetidas a ultracentrifugação em gradiente de densidade, foram obtidas três frações de CPMV, com os seguintes coeficientes de sedimentação: 60, 98, 119, sendo denominados, respectivamente, componentes do topo, meio e fundo. Os componentes do topo e do meio, quando inoculados em plantas testes, não foram infectivos, enquanto que o componente do fundo mostrou-se altamente infectivo. Bruening e Agrawal (1967) observaram que, misturando-se os componentes do fundo e do meio, o número de lesões nas plantas inoculadas aumentava em oito vezes, sugerindo um sinergismo entre eles.

Trabalhos recentes têm mostrado que o componente do topo não contém RNA e que o componente do meio e do fundo contém 24% e 33% de RNA respectivamente (Agrawal, 1964; van Kammen, 1968). Os dois componentes nucleoproteicos quando separados por ultracentrifugação não são infectivos, recuperando a infectividade quando misturados novamente (van Kammen, 1968). Misturas do componente do meio da estirpe amarela do CPMV com o componente do fundo da estirpe mutante da amarela, ou vice-versa, mostraram-se infectivas, o mesmo não ocorrendo com as misturas do componente do fundo da estirpe amarela do CPMV com a estirpe severa do CPMV (De Jager & van Kammen, 1970).

Sistemas multicomponentes, isto é, em que dois ou mais tipos de partículas do vírus participam na infecção, têm sido descritos para o CPMV (van Kammen, 1968) e para ou-

tros vírus de plantas como o "pod mottle" do feijoeiro (Wood & Bancroft, 1965), do grupo do "ratlle" do fumo (Lister, 1966), "streak" do fumo (Fulton, 1967) e mosaico da alfafa (Bol et al., 1971).

Análises de preparações purificadas do CPMV mostraram uma absorção de UV em torno de 260 nm, espectro típico de nucleoproteína (Agrawal, 1964). O componente do meio tem um peso molecular de 6×10^6 e o componente do fundo de $7,7 \times 10^6$ (van Kammen, 1967). A mobilidade electroforética das partículas do CPMV é variável, tendo sido verificada a existência de dois componentes com relação à mobilidade: uma forma de movimento rápido e uma forma de movimento lento (Agrawal, 1964; Semancik, 1966). O componente de movimento lento é encontrado no início da infecção e o de movimento rápido no final da infecção, podendo-se efetuar a conversão da forma lenta na forma rápida (Niblett & Semancik, 1969). Recentemente foi verificado que as subunidades das partículas do CPMV são constituídas de três proteínas diferentes: uma grande e duas pequenas, sendo elas as responsáveis pela diferença da mobilidade electroforética encontrada na forma rápida e lenta (Wu & Bruening, 1971; Geelen et al., 1972).

Agrawal (1964) verificou que as partículas do CPMV em preparações contrastadas negativamente apresentam-se sob a forma poliédrica. Essas partículas podem se apresentar completas ou com a parte central oca, medindo, respectivamente, 24-27 nm e 23-25 nm de diâmetro. Na epiderme de folhas de Vigna sinensis Endl. infetadas com o CPMV foram observadas, ao microscópio de luz, inclusões granulosas no citoplasma.

Estudos comparativos, efetuados por Milne (1967), acerca da ultraestrutura de folhas de C. quinoa infetadas com o CPMV, mosaico do Chenopodium e mosaico do nabo, não possibilitaram a identificação das partículas de nenhum desses três vírus, em decorrência de as mesmas se encontrarem dispersas no citoplasma entre os ribossomos. Van der Scheer e Groenewegen (1971) observaram partículas do CPMV, me

dindo 17-23 nm de diâmetro, no interior de túbulos associados à parede celular, no citoplasma e no espaço intercelular de plantas de Vigna unguiculata (L.) Walp. No citoplasma e no núcleo dessas células ocorrem também estruturas membranosas, associadas à moléstia. Kim e Fulton (1971, 1972) encontraram em tecidos de feijoeiro infetados com o vírus do "pod mottle" do feijoeiro, o qual está serologicamente relacionado com o CPMV, partículas de vírus no interior de túbulos associados à parede celular e estruturas vesiculares e fibrilares no citoplasma. Nos vasos do xilema e do floema foram também notadas partículas de vírus.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Vírus

O vírus do mosaico em desenho do feijoeiro (VMDF) e o vírus do mosaico da Vigna (VMV), utilizados neste trabalho, foram isolados respectivamente de feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.) na região de Campinas e de feijão macassar (Vigna sinensis Endl.) nas regiões de Campinas e Matão, S.P.. Esses vírus fazem parte da coleção da Seção de Virologia do Instituto Agrônomo de Campinas.

3.2. Plantas

Foram utilizadas amostras de plantas de feijoeiro da variedade Manteiga e Scotia com sintomas sistêmicos do VMDF e plantas de soja (Glycine max.L.) inoculadas com o vírus, mas sem sintomas aparentes.

Como hospedeiras do VMV foram utilizadas plantas de feijão macassar, feijoeiro e C. quinoa.

Folhas de C. quinoa com sintomas locais do VMV foram coletadas periodicamente durante uma semana após a inoculação e folhas de feijoeiro com infecção sistêmica do VMDF foram coletadas durante três semanas após a inoculação do vírus.

Plantas de feijoeiro, variedade preto, foram utilizadas como hospedeiras do VMDF e VMV, simultaneamente.

Os vírus foram transmitidos mecanicamente e as plantas mantidas em condições de estufa.

3.3. Técnicas de microscopia de luz

3.3.1. Fragmentos de epiderme

A identificação de inclusões associadas aos vírus de plantas, através de exame de epiderme destacada de folhas infectadas, têm auxiliado a diagnose de muitos vírus de plantas

(MacWhorter, 1965). Essa técnica tem a vantagem de ser simples e rápida, e o emprego de corantes adequados permite a diferenciação de inclusões a vírus das estruturas normais das células.

Assim, para se determinar a existência de inclusões detectáveis ao microscópio de luz, associadas à infecção do VMDF e VMV, epidermes foliares de plantas de feijoeiro e soja infetados com o VMDF e de feijão macassar, feijoeiro e C. quinoa infetados com o VMV foram destacadas, fixadas ou não em aldeído glutárico a 3% durante 5 a 10 min., coradas com azul de Trypan (MacWhorter, 1941) ou com uma mistura de calcomine laranja e luxol verde brilhante (1:4) (Christie, 1967). Esses fragmentos foram montados em lâminas com água destilada e observados ao microscópio de luz.

Para se verificar a natureza proteica das possíveis inclusões, epidermes de feijoeiros infetados com o VMDF e de feijão macassar infetado com o VMV foram mergulhadas em soluções de pepsina a 0,25% dissolvida em HCl 0,1 N. Como controle, epidermes de plantas infetadas foram tratadas apenas com HCl 0,1 N. Esses tecidos foram a seguir corados com azul de Trypan.

3.3.2. Secções de tecidos

Com a finalidade de se identificar as inclusões associadas ao VMDF e VMV em secção de tecido, pedaços de folhas infetadas foram processados segundo as técnicas de fixação e inclusão empregadas em microscopia electrónica, posteriormente descritas, e seccionadas em ultramicrotomo Porter-Blum, em cortes de espessura variável entre 1-2 μ m. As secções foram coradas com Azur II e azul de metileno-borax 1% (Richardson et al., 1960) e examinadas ao microscópio de luz.

Amostras de tecidos infetados pelo VMDF ou pelo VMV também foram processados pelos métodos habituais utilizados em microscopia de luz. Tecido foliares de feijoeiro e soja infetados pelo VMDF e tecidos foliares de Vigna sinensis Endl. infetada pelo VMV, foram fixados em aldeído glutárico a 3%, lavados em tampão fosfato pH 7,0, desi-

dratados em álcool, embebidos e incluídos em parafina, seccionados em cortes de 5-7 μ m de espessura e corados com hematoxilina-eosina.

3.4. Técnicas de Microscopia Electrônica

3.4.1. Métodos para estudos morfológicos

Para se determinar o diâmetro das partículas do VMDF e do VMV, foram empregados alguns métodos de microscopia electrónica que permitem a identificação e mensuração das partículas em diferentes condições.

Uma combinação dos métodos de "leaf-dip" (Brandes, 1957) e contração negativa (Brenner e Horner, 1959), proposta por Kitajima (1965), tem sido útil para a visualização dos vírus isométricos, e foi utilizada neste trabalho. Essa técnica consiste em se mergulhar pedaços de tecidos com sintomas de infecção a vírus, em uma gota de ácido fosfotungstico a 1% com traços de albumina bovina, utilizada como espalhante do corante. A gota do corante é mantida sobre uma superfície parafinada e as partículas de vírus em suspensão são coletadas por adesão em uma telinha de cobre previamente revestida com uma película de parlodium, reforçada com uma leve deposição de carbono e examinada ao microscópio electrónico. O pH da solução de ácido fosfotungstico deve ser neutralizada a fim de evitar efeitos danosos sobre a morfologia das partículas, devido à acidez da solução.

Tecidos foliares de feijoeiro infetados com o VMDF e tecidos foliares de Vigna sinensis Endl. infetados com o VMV foram tratados quimicamente e o suco extraído foi submetido a centrifugações diferenciais e a um ciclo de gradiente de densidade, como foi descrito anteriormente por Oliveira et al. (1969), Kitajima et al. (1973). Amostras das camadas opalescentes foram coletadas e examinadas ao microscópio electrónico pelo método de contração negativa, positiva e metalização. A coloração positiva se baseia na

afinidade do acetato de uranila ao ácido nucleico, promovendo, após um contacto prolongado entre as partículas e o corrente, um adensamento da região da partícula viral que contém o ácido nucleico. A preparação purificada foi metalizada com cromo.

As partículas do VMDF e VMV, contrastadas negativamente ou metalizadas, foram fotografadas a 20 000 vezes e ampliadas mais 10 vezes em ampliador fotográfico, obtendo-se no final um aumento de 200 000 vezes. O diâmetro das partículas foi calculado, medindo-se as extremidades das mesmas. Com o intuito de se obter o diâmetro das partículas dos vírus com o menor risco de erro, o aparelho foi calibrado segundo as recomendações do fabricante e também através de medições de fotografias de réplicas de grade de difração de 2 160 malhas por milímetro. Em condições semelhantes, foram efetuadas medições de partículas do vírus do mosaico do fumo cujo diâmetro acha-se bem estabelecido (18 nm), servindo, desse modo, como controle das medidas fornecidas pelo aparelho. Esses cuidados reduzem para ca. 15% a margem de erro nas determinações dos aumentos.

Nas secções ultrafinas, em que foi possível identificar as partículas de vírus, foi determinado o diâmetro das mesmas, medindo-se as suas extremidades ou as distâncias entre os centros de duas partículas vizinhas.

3.4.2. Métodos histológicos de secção ultrafina

Com a finalidade de se observar a ultraestrutura dos tecidos de plantas infetadas com o VMDF e VMV, foi utilizada a técnica de secção ultrafina. Tecido foliar e radicular de feijoeiro e soja infetados com o VMDF, tecido foliar de feijoeiro, feijão macassar e Chenopodium quinoa Wild. infetado com o VMV e tecido de feijoeiro infetado simultaneamente com o VMDF e VMV, foram processados da seguinte maneira:

Os tecidos a serem examinados foram cortados em retângulos de aproximadamente 2 mm x 4 mm e imersos em so

lução fixadora de tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1%, diluído em tampão fosfato de sódio pH 7,0-0,2 M, durante 12 a 14 horas a 4°C (Millonig, 1964).

Foi empregada também a técnica de fixação dupla pelo aldeído glutárico e tetróxido de ósmio (Sabatini, 1963). Essa técnica consiste em se fixar o material em aldeído glutárico a 3% em tampão fosfato, 0,05 M, pH 7,2, durante duas horas a 4°C . A seguir, o material é lavado diversas vezes em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,0, durante 1 hora, sendo em seguida fixado em OsO_4 , a 1% em tampão fosfato 0,15 M, durante 2 horas a 4°C .

Após a fixação o material foi desidratado por passagens sucessivas em soluções de concentrações crescentes de acetona a 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, durante 5 min. em cada concentração, sendo que a última por três vezes consecutivas. O material era, a seguir, embebido em uma mistura de Epon-acetona, durante duas horas. Após esse período, o material era colocado em Epon puro, durante 12-14 horas a baixa temperatura, sendo, a seguir, levado à estufa a 60°C durante dois dias, a fim de ser polimerizado (Luft, 1961).

Os blocos de Epon polimerizados, contendo o material, foram aparados com gilete e seccionados em um ultramicrotomo Porter Blum (Modelo MT-I). Navalhas de vidro, (e eventualmente navalhas de diamante), foram utilizadas na obtenção de cortes ultrafinos, tendo sido aproveitados cortes de espessura entre 60-100 nm. Os cortes recebidos em água destilada foram coletados em telinhas de cobre, previamente recobertas por parlodium.

Os "corantes" utilizados nas seções ultrafinas são soluções de metais densos aos electrons, e conferem maior contraste às estruturas celulares. Foi utilizado com frequência uma coloração dupla, que consiste em se corar inicialmente com uma solução aquosa de acetato de uranila a 2% (Watson, 1958), durante duas horas, seguida de uma coloração com citrato de chumbo (Reynolds, 1963) durante 1 minuto, e, ocasionalmente, com hidróxido de chumbo (Karnowski, 1961). O excesso da corante da secção foi retirado através de lavar

gens da telinha por imersão em água destilada.

"Pellets" de preparações purificadas do VMDF ou VMV obtidos por ultracentrifugação foram processados de maneira similar àquela empregada nos tecidos e depois seccionados e corados para serem observados ao microscópio electrónico El - miskop I da Siemens, pertencente ao laboratório de microscopia electrónica da Seção de Virologia do Instituto Agronômico de Campinas.

4. RESULTADOS

4.1. Vírus do Mosaico em Desenho do Feijoeiro

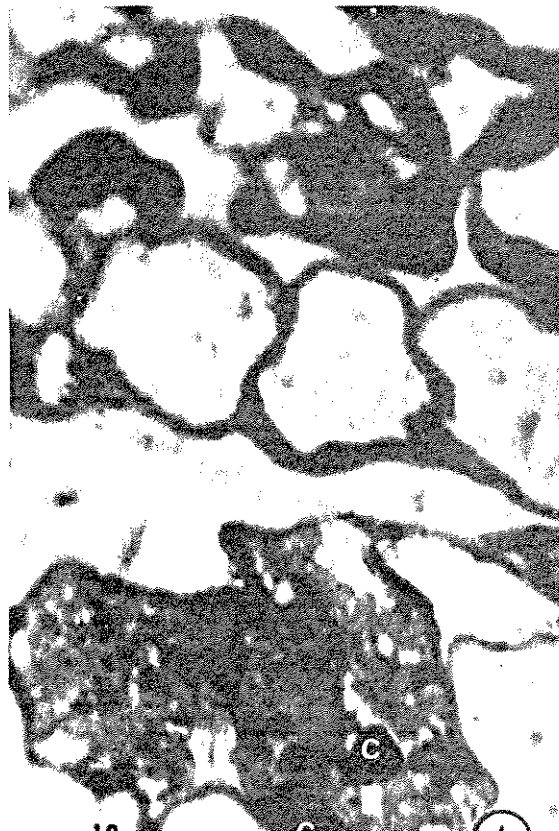
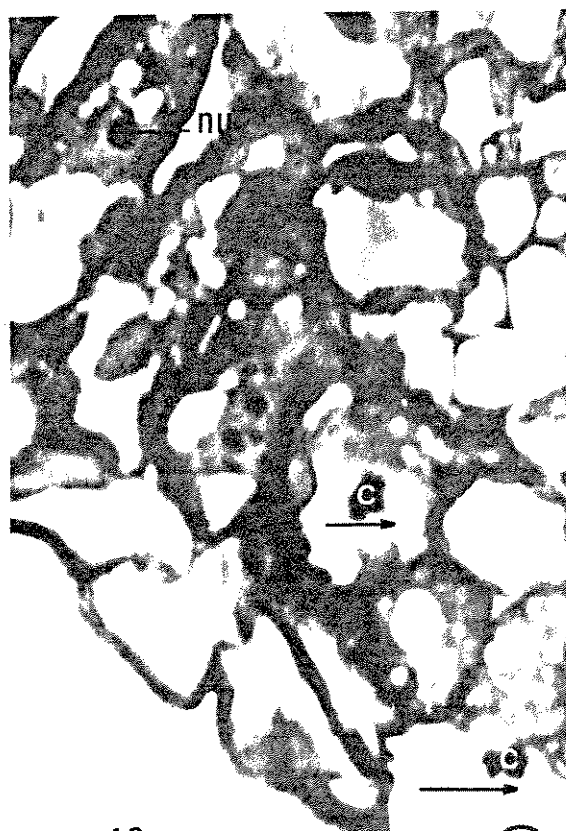
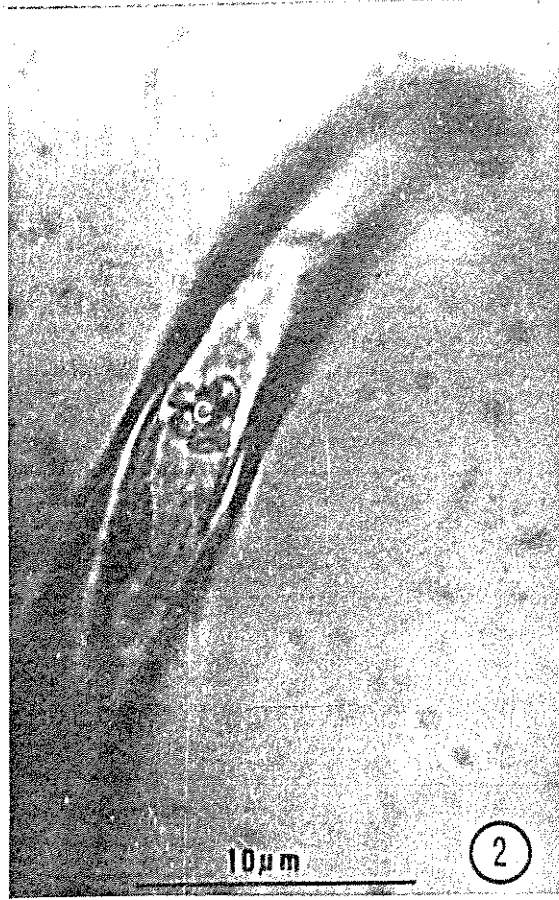
4.1.1. Microscopia de luz

Nos fragmentos da epiderme inferior destacados de folhas de feijoeiro e soja infetados com o VMDF, corados com azul de Trypan ou com uma mistura de calcomine laranja e luxol verde brilhante, foram observados, no citoplasma, cristais incolores, refringentes, medindo ca. $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$. Esses cristais apresentavam geralmente contorno hexagonal e foram encontrados em células da epiderme e tricomas simples (Figs. 1-2). Os cristais tinham usualmente um perfil poligonal, o que permitia distingui-los do núcleo, além disso apreciavam geralmente envolvidos por uma massa citoplasmática de aspecto granular (Fig. 1). Houve alguma dificuldade em se identificar os cristais nas células da epiderme, devido à presença de grãos de amido, de ca. $1,0\ \mu\text{m} \times 2,0\ \mu\text{m}$ esparsos, no citoplasma, com refringência semelhante a do cristal, mas, em geral, distinto deste pelo seu contorno ovalado. Nas células do tricoma, os cristais eram facilmente visualizados.

Em epidermes de feijoeiros infetados com o VMDF, mergulhadas em soluções de pepsina a 0,25% em meio ácido e nas soluções controles, notou-se que os cristais desapareciam poucos segundos após o tratamento.

Em tecidos foliares de feijoeiro e soja incluídos segundo as técnicas utilizadas em microscopia electrónica, mas seccionados em cortes de 1 a $2\ \mu\text{m}$ de espessura, foram observadas no citoplasma inclusões cristalinas de $1-4\ \mu\text{m} \times 1-4\ \mu\text{m}$ (Figs. 3-4). Esses cristais coravam-se intensamente pela mistura de azul de metileno-borax e Azur II, da mesma maneira que o nucléolo. Os cristais foram visualizados nas células do tricoma, epiderme, parenquima lacunoso e paliçádico e esporadicamente no parenquima vascular. Geralmente, o citoplasma em torno do cristal apresentava uma coloração mais clara em relação ao citoplasma em que não ocorriam cris

Figs. 1-4. Micrografia de luz mostrando cristais(c) associados à infecção do VMDF, em células da epiderme de feijoeiro (Fig.1) e em célula de tricoma de soja (Fig.2). Notar em torno do cristal, um material granular(gl) no citoplasma. Nas secções espessas de tecidos foliares infetados pelo VMDF, incluídos em Epon e coradas com Azur II e azul de metileno-borax, notar cristais em células do tricoma (Fig.3), na epiderme e no parênquima paliçádico (Fig.4) de folhas de feijoeiro, os quais se acham envolvidos por uma zona mais clara (seta) . n-núcleo, nu-nucléolo.



tais (Fig. 3). Não foram observadas outras alterações nos tecidos infetados com o VMDF. Esses cristais, contudo, não foram identificados em tecidos fixados em aldeído glutárico, incluídos em parafina e corados com Hematoxilina-eosina.

4.1.2. Microscopia electrónica

4.1.2.1. Estudos sobre a morfologia das partículas

4.1.2.1.1. Preparações "leaf-dip" contrastadas negativamente.

Nos exames de preparações "leaf-dip" de fragmentos de folhas de feijoeiro e soja infetados com o VMDF, contrastadas negativamente com ácido fosfotungstico, foram observadas partículas isométricas de 25-30 nm de diâmetro (Fig. 5), ausentes em preparações similares de tecidos sadidos. Apesar de consistente, o número de partículas detectadas nas preparações rápidas, era geralmente reduzido. Tanto nas preparações "leaf-dip" a partir de folhas de feijoeiro e soja sadidos como infetados com o VMDF, foram observados bastonetes rígidos de comprimento variável, aparentemente constituídos de subunidades anelares de diâmetro variável entre 10-15 nm (Fig. 5).

4.1.2.1.2. Preparações purificadas

A fim de se estabelecer a natureza viral das partículas observadas nas preparações "leaf-dip", elas foram concentradas e purificadas a partir de tecidos de folhas de feijoeiro com sintomas típicos da moléstia, segundo as técnicas de purificação por ultracentrifugação diferencial e em gradientes de densidade, anteriormente descritas por Kitajima et al. (1973).

Nas amostras de preparações purificadas do VMDF, metalizadas com cromo e examinadas ao microscópio electrónico, observou-se grande quantidade de partículas de 30 nm de diâmetro. A "sombra" projetada por essas partículas

Alíquotas de preparações purificadas foram também examinadas, após serem contrastadas negativamente com ácido fosfotungstico ou acetato de uranila. Nessas condições foram observadas numerosas partículas de contorno hexagonal, de aspecto homogêneo (Fig. 7). Foram medidas 980 partículas encontrando-se um diâmetro variável entre 26-29 nm e um diâmetro médio de 27,8 nm. Ao lado das partículas completas foram encontradas também partículas com o interior denso, sugerindo que houve penetração do corante e que as mesmas eram ocas. Em geral, o diâmetro dessas partículas era um pouco menor do que o das partículas completas, medindo 20-25 nm (Fig. 8). Nas proximidades das partículas purificadas foram observados corpúsculos circulares de 8-9 nm de diâmetro, formados de 3 a 4 sub-divisões, de 3-4 nm de diâmetro (Fig. 8).

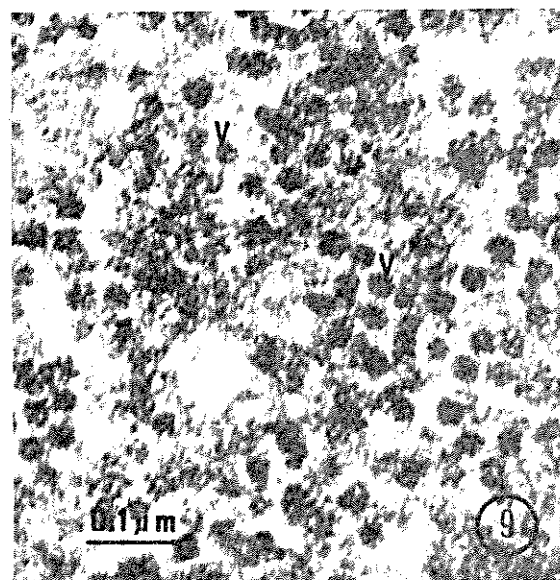
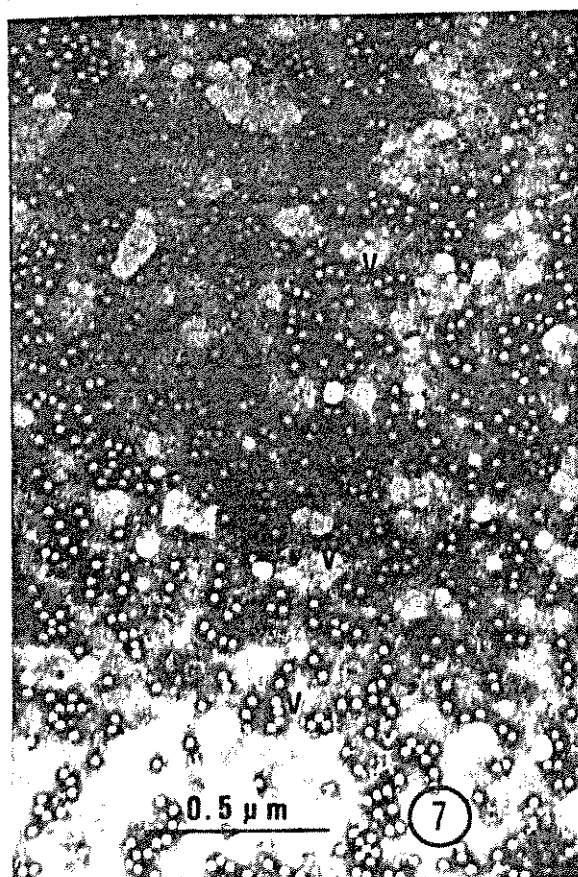
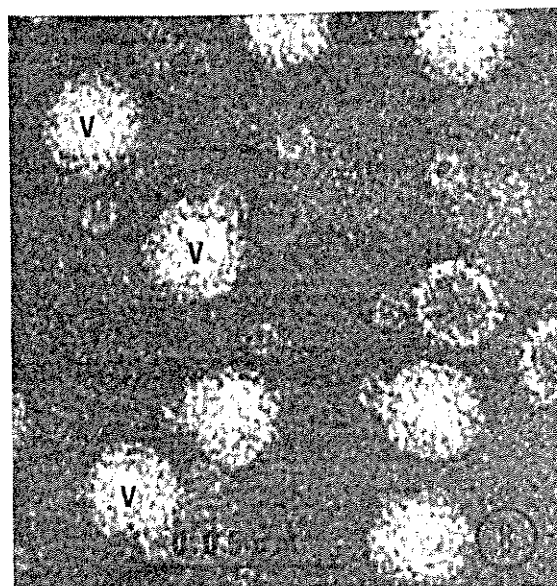
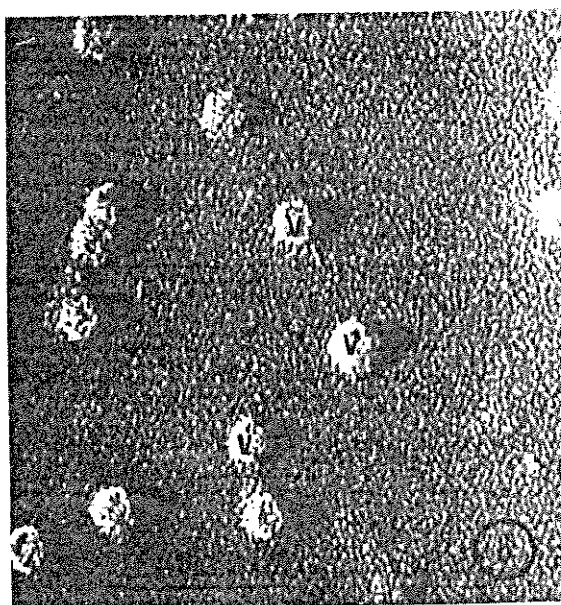
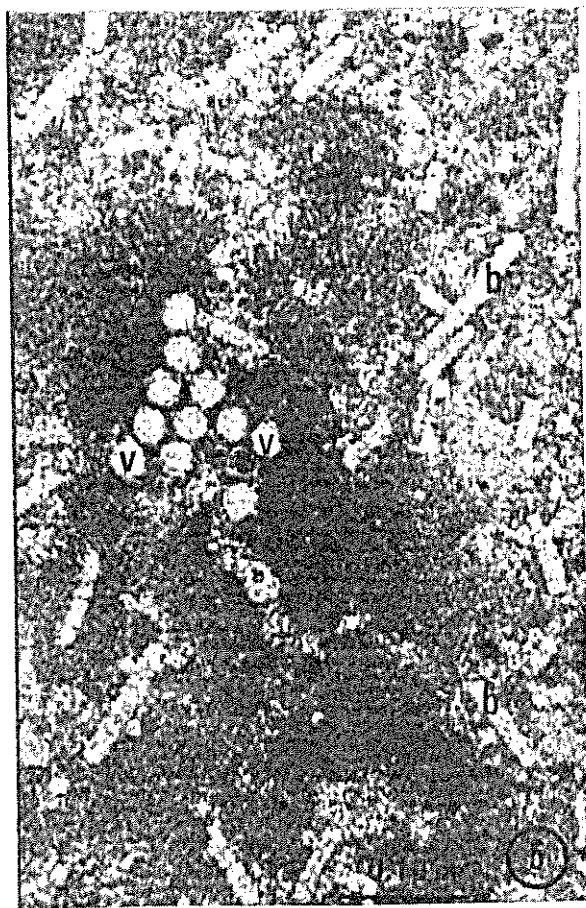
Amostras de "pellets", obtidos por ultracentrifugação, de preparações altamente purificadas do VMDF, foram fixadas em aldeído glutárico e tetróxido de ósmio e incluídas em Epon. Nas secções ultrafinas dos "pellets" foram observados corpúsculos densos de diâmetro variável entre 20-25 nm (Fig. 9).

As preparações purificadas do VMDF, contendo apenas partículas de 26-29 nm de diâmetro, foram inoculadas em plantas hospedeiras susceptíveis, as quais manifestaram os sintomas típicos da moléstia, cerca de uma semana após a inoculação.

4.1.2.2. Secções ultrafinas de tecidos infetados

Os exames das secções ultrafinas ao microscópio electrónico revelaram, no citoplasma de células de feijoeiro e soja infetados sistemicamente com o VMDF, a ocorrência de algumas estruturas anômalas, ausentes nos tecidos saudáveis. Essas anomalias eram representadas por cristais densos aos electrons, inclusões cristalinas e vesículas no citoplasma (Figs. 10-19), sendo encontradas frequentemente nos tecidos foliares, em células do tricoma, epiderme (Figs. 10-11), parênquima paliçádico (Fig. 14), parênquima esponjoso

Figs. 5-9. Micrografia electrónica de partículas isométricas (v) obtidas de folhas de tecidos infetados com o VMDF, em preparações "leaf-dip" contrastadas negativamente, onde também se observam bastonetes(b), componentes normais das células de feijoeiro (Fig. 5), em preparações purificadas (Figs.6-9), metalizadas com cromo (Fig.6), contrastadas com acetato de uranila (Figs.7-8) e em secção ultrafina de "pellets" (Fig.9). A Fig.8 é um detalhe da Fig.7, onde se notam partículas ocas(po) e pequenos corpúsculos normais, provavelmente fitoferritina (seta).



(Fig. 15) e esporadicamente nas células do parênquima vascular (Fig. 12). Nos tecidos radiculares de feijoeiro e soja, também foram encontradas estruturas semelhantes, nas células da epiderme e do córtex (Fig. 13), mas não na zona meristemática.

Os cristais densos, encontrados nos tecidos infetados com o VMDF (Figs. 10-14) observados em maiores magnificações, revelaram ser constituídos de partículas isométricas, uniformes, dispostas em arranjo organizado (Fig. 14). Essas partículas eram idênticas àquelas observadas em secção de "pellets" de preparações purificadas, altamente infectivas (Fig. 9), indicando que elas devem representar as partículas do VMDF in situ. Assim, essas partículas serão doravante referidas como tal, e o seu agregado cristalino como cristal de vírus.

As partículas de vírus, no cristal, podiam ser observadas em arranjos hexagonais (Fig. 14) ou reticular (Fig. 10), dependendo do plano de secção. A região central das partículas, vistas em arranjos hexagonais, era bastante densa aos electrons enquanto que a porção periférica apresentava menor densidade, possibilitando individualizar cada unidade (Fig. 14, inserção). Foi medido o diâmetro de ca. 1.000 partículas desses cristais, tomando-se as distâncias entre os centros de partículas adjacentes, tendo sido encontrado um diâmetro de 26-29 nm. Quando as partículas eram medidas individualmente, o diâmetro era sensivelmente menor, variando em torno de 17-23 nm.

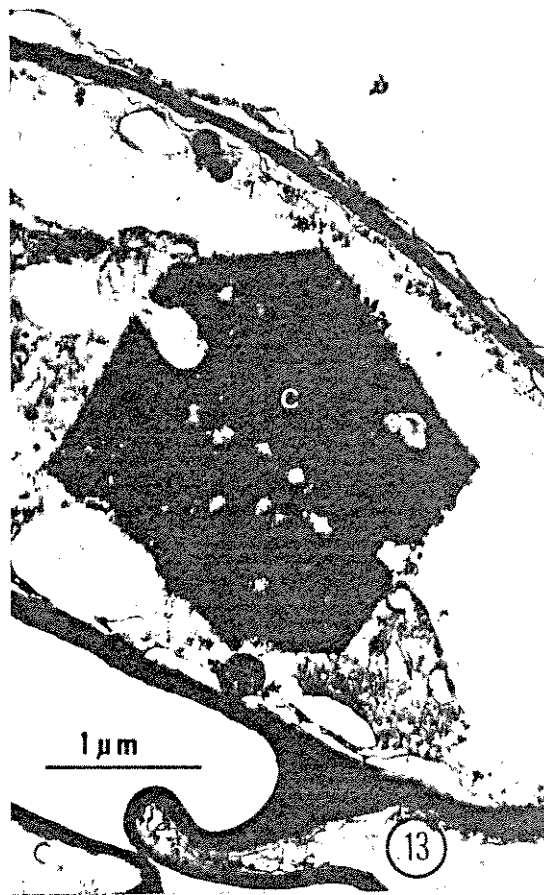
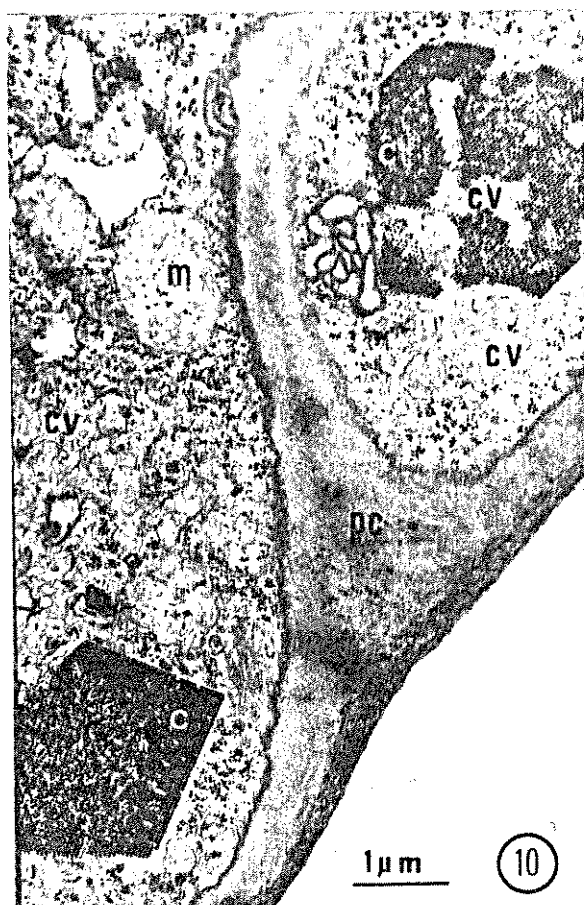
As partículas do VMDF, no interior da célula, foram identificadas com segurança apenas quando formavam os cristais. No citoplasma podiam-se observar partículas esparsas, de diâmetro aproximado àquelas do cristal do vírus (Figs. 15 e 18). Nas nossas observações não foram identificadas partículas de vírus no núcleo, nos vacúolos ou nos plasmodesmata das células infetadas.

Os cristais de vírus (Figs. 10-14) observados nas secções ultrafinas, provavelmente, correspondem aos cris-

CHAVE PARA AS ABREVIACÕES

Figs. 10-19. Micrografia electrónica de secção ultrafina de tecidos de plantas infetadas pelo VMDF: c-cristal de vírus; cv-vesículas citoplasmáticas; cl-cloroplastos; g-complexo de Golgi; i-inclusão nuclear; m-mitocôndria; n-núcleo; nu-nucléolo; p-inclusão cristalina; pc-parede celular; r-ribossomas; re-retículo endoplasmático; va-vacúolo; v-partícula de vírus.

Figs. 10-13. Cristais de vírus em células da epiderme de soja (Fig.10), de feijoeiro (Fig.11), parênquima do floema (Fig.12) de tecido foliar e cortical de raiz (Fig.13) de feijoeiro, onde se observa um conjunto de vesículas(cv) circundando os cristais de vírus. Essas vesículas podem ocorrer ocasionalmente no interior do cristal (Fig.10). Notar inclusões cristalinas de contorno circular(p) no citoplasma (Fig.11).

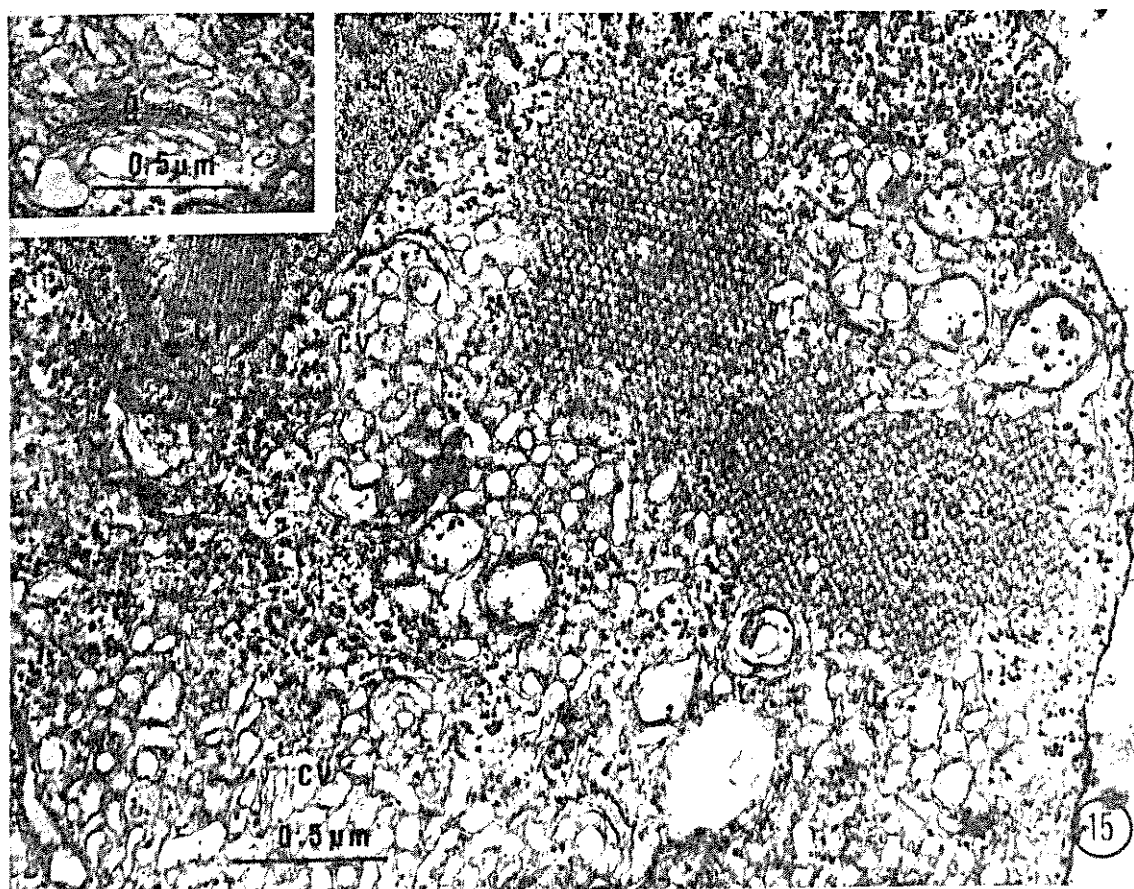
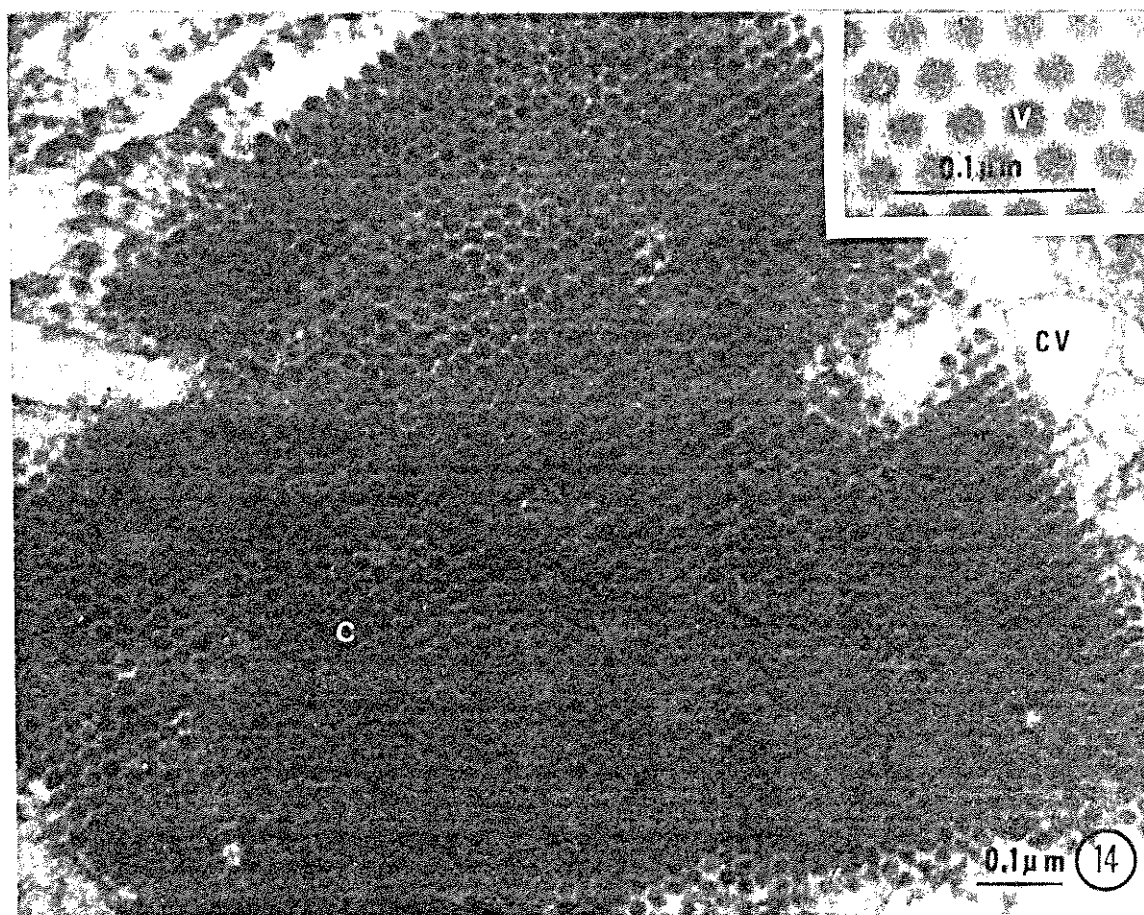


derme foliar (Figs. 1-2) e nas secções espessas (Figs. 3-4) de tecidos de plantas infetadas com o VMDF. As dimensões dos cristais, dependendo do plano de secção, eram muito variadas, podendo alcançar até 3 μ m x 3 μ m. O contorno dos cristais podia ser hexagonal, retangular, losangular ou quadrangular, nos quais se notavam ângulos e arestas bem formados. Algumas faces do cristal podiam ser irregulares, devido à presença de vesículas ou corpúsculos densos (Fig. 20). Em geral ocorria apenas um cristal por célula, podendo ocasionalmente serem encontrados dois ou mais em uma mesma célula. Não se observaram membranas envolvendo os cristais, sendo porém frequente a ocorrência de um citoplasma rico em vesículas em torno dos mesmos (Figs. 10-12).

Nas centenas de observações de secções ultrafinas de tecidos infetados com o VMDF, não foi possível reconstituir o processo de formação ou desorganização do cristal de vírus. Tecidos foliares de feijoeiros infetados com o VMDF foram coletados em dias consecutivos após a inoculação do vírus e examinados ao microscópio electrónico, encontrando-se, em uma mesma amostra, cristais de diferentes tamanhos. Em algumas micrografias observaram-se pequenos agregados de partículas que poderiam representar o início de formação do cristal, mas também poderiam representar apenas um corte tangencial de um cristal já formado (Fig. 18). Por outro lado, foram observados cristais de vírus cujas partículas não se encontravam em arranjos cristalinos em toda a sua extensão, notando-se sob elas um substrato amorfo de menor densidade aos electrons (Fig. 18), não sendo possível estabelecer se essas partículas estavam em organização ou desorganização. Algumas vezes foram observados cristais cuja porção central não continha partículas de vírus, mas um substrato reticulado de baixa densidade aos electrons, enquanto que na periferia as partículas se apresentavam em arranjos reticulados.

Além dos cristais de vírus, foram encontrados, no citoplasma, inclusões cristalinas de contorno irregular (Figs. 11, 15-17 e 19), as quais não haviam sido identifica

Figs. 14-15. Cristal de vírus(c) com partículas em arranjo hexagonal e inclusões cristalinas(p) no citoplasma. No detalhe em inserção, pode-se notar uma zona de baixa densidade aos electrons entre as partículas (Fig.14). As inclusões cristalinas(p) com arranjo hexagonal(A) e reticular(B) acham-se envolvidas por vesículas aparentemente ocas ou contendo corpúsculos densos ou fibrilas (Fig.15). Notar também aglomerados de corpúsculos densos na periferia das vesículas. Na inserção notar dictiosomas do complexo de Golgi(g) nas proximidades das vesículas.



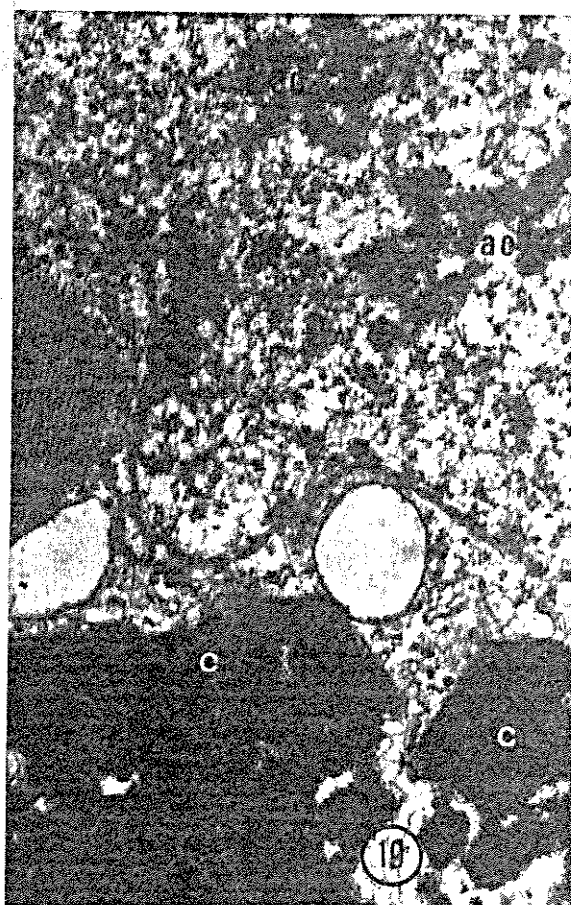
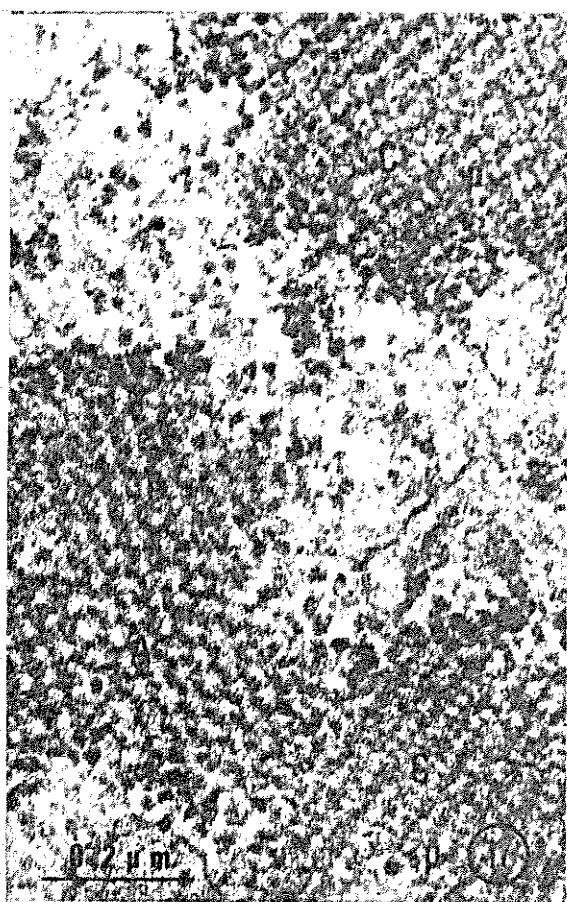
das nos fragmentos de epiderme e tricomas e nas secções espessas. Essas inclusões apresentavam baixa densidade aos electrons, próximas às do substrato citoplasmático. As inclusões cristalinas tinham um diâmetro variável entre 0,2 - 2,5 μm e eram encontradas geralmente envolvidas por um citoplasma rico em vesículas (Figs. 11 e 15), semelhantes às aquelas encontradas em volta do cristal de vírus.

Nos exames detalhados dessas inclusões, foram observados basicamente três padrões de arranjos cristalinos dependendo provavelmente do plano de secção (Figs. 15-17). Em algumas secções as inclusões cristalinas eram vistas com um arranjo reticular, de malhas quadrangulares, cuja região de baixa densidade aos electrons, media ca. 20 nm, espaçadas por regiões mais densas de ca. 20 nm de espessura (Figs. 15-16). Em outras secções observou-se um arranjo cristalino hexagonal cuja parte menos densa, media em torno de 30 nm e os pontos densos ca. 10 nm (Figs. 15 e 17). O terceiro padrão era menos frequente e, nesse caso, a inclusão apresentava linhas densas e claras alternadamente, espaçadas de 10-15 nm (Fig. 17). Os padrões de arranjos cristalinos não eram fixos, podendo-se observar em uma mesma inclusão ou em inclusões adjacentes os três tipos de arranjos ou mesmo fases intermediárias entre eles (Fig. 17).

Em torno da inclusão cristalina podiam ser observados corpúsculos densos de 15-25 nm de diâmetro que tanto podem representar os ribossomas das células hospedeiras como as partículas do VMDF (Figs. 15 e 17). Não se observaram membranas, dictiosomas ou elementos do retículo endoplasmático em torno da inclusão cristalina, estando porém quase sempre envolvidas por um citoplasma rico em vesículas. No núcleo dessas células foram encontrados ocasionalmente pequenos agregados cristalinos (Fig. 19), os quais foram também observados nos tecidos sadios.

No citoplasma de tecidos infetados com o VMDF foram observados conjuntos de vesículas, geralmente ao redor dos cristais de vírus e das inclusões cristalinas (Figs. 10-12 e 18), não identificados nos tecidos de plantas sa-

Figs. 16-19. Detalhe da inclusão cristalina (Figs.16-17), exibindo arranjo hexagonal(A), em linhas paralelas(C) (Fig.17) ou reticular(B) (Fig.16). Notar corpúsculos densos na periferia da inclusão (Fig.17), vesículas e túbulos próximos a um cristal(c) parcialmente organizado e pequeno agregado de partículas de vírus(v) (Fig.18). Agregado cristalino no núcleo(n), próximo ao cristal de vírus(c) e inclusões cristalinas (p) no citoplasma (Fig.19).



dias. Essas vesículas devem representar a massa citoplasmática granulosa observada ao microscópio de luz nos fragmentos da epiderme foliar (Fig. 1) e as zonas claras observadas em torno dos cristais, visualizados nas seções espessas de tecidos foliares (Fig. 3).

A forma e dimensões das vesículas eram variadas, podendo apresentar perfil circular ou tubular, com diâmetro de ca. 200-1.000 nm (Figs. 15-18). As vesículas se encontravam às vezes apostas, mas sem estarem fundidas, e a sua membrana envoltória é do tipo unitário. De uma maneira geral, as vesículas apresentavam um conteúdo de baixa densidade aos electrons, podendo ocasionalmente ocorrer em seu interior fibrilas ou corpúsculos densos (Fig. 15). Entre as vesículas foram frequentemente encontrados corpúsculos densos de ca. 25 nm de diâmetro e dictiosomas do complexo de Golgi (Fig. 15, inserção), não se encontrando elementos do retículo endoplasmático e mitocôndrias nas suas imediações.

Apesar dos cristais de vírus, inclusões cristalinas e vesículas citoplasmáticas, associadas à infecção do VMDF, ocuparem uma extensa área das células, não se observaram alterações sensíveis nas organelas celulares, estando os cloroplastos, mitocôndrias e núcleos com aspecto semelhante ao dos tecidos sadios.

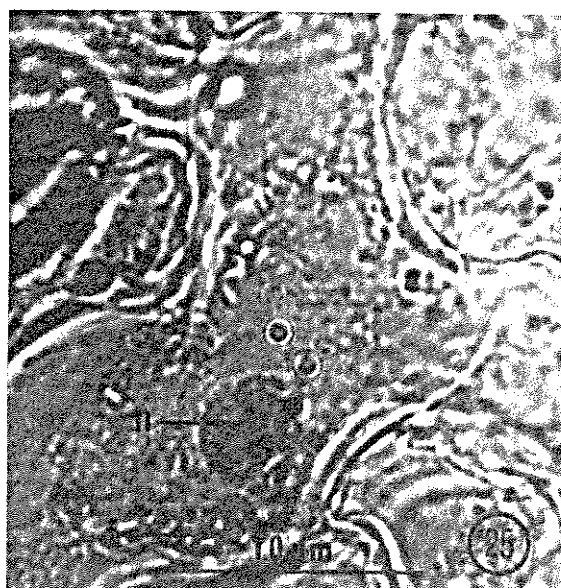
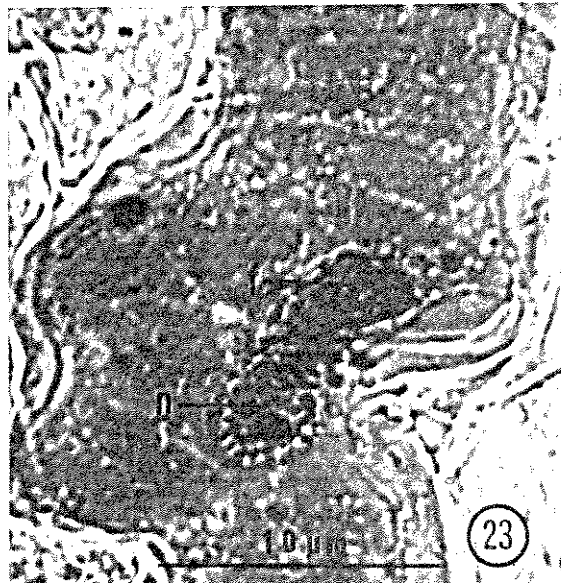
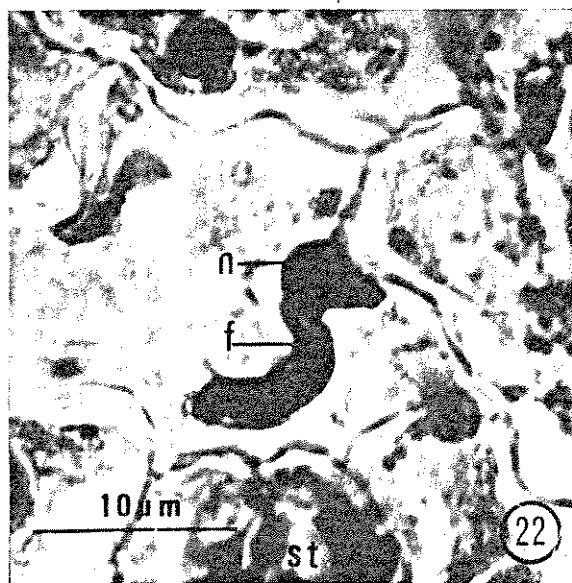
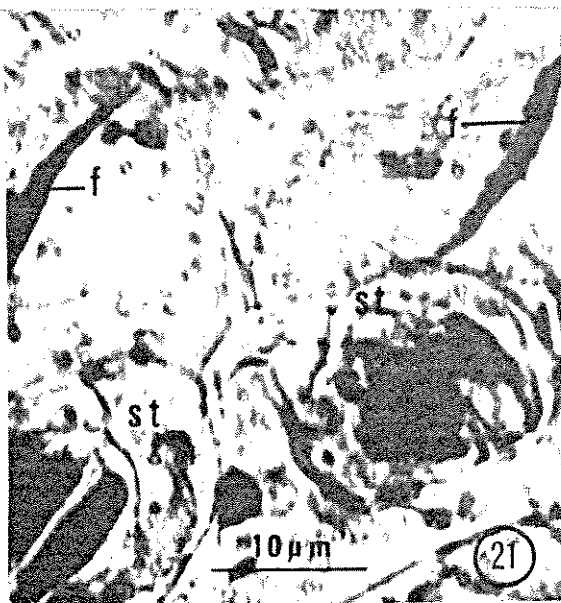
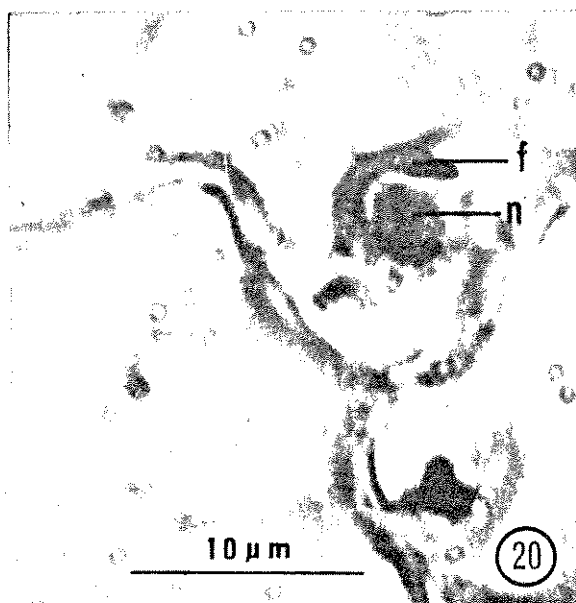
4.2. Vírus do Mosaico da Vigna

4.2.1. Microscopia de luz

Nos exames ao microscópio de luz de fragmentos de epiderme foliar de feijoeiro, feijão macassar e C. quinoa infetados com o VMV, notaram-se consistentemente, inclusões fusiformes no citoplasma (Figs. 20-21), não encontradas nos tecidos sadios dessas plantas. Essas inclusões coravam-se com a mistura de calcomine laranja e luxol verde brilhante (Fig. 21) e com azul de Trypan (Fig. 20).

Em geral, as inclusões fusiformes foram encon

Figs. 20-25. Micrografia de luz de células da epiderme de folhas de plantas infetadas com o VMV, tratadas com pepsina ou controle. Inclusões fusiformes(f) no citoplasma de epiderme de feijão macassar corada com calcomine laranja e luxol verde brilhante (1:4) (Fig.20) ou azul de Trypan (Fig.21). Epiderme tratada com o HCl 0,1 N, durante 60 min., onde se nota inclusão fusiforme (f), intensamente corada com azul de Trypan (Fig.22). Epiderme tratada com pepsina 0,25%,durante 15 min. (Fig.23), durante 30 min. (Fig.24) e durante 60 min. (Fig.25), podendo -se notar uma diminuição progressiva das inclusões fusiformes(f), n-núcleo; s-estomato.



lo parcialmente. O diâmetro e o comprimento das inclusões eram variáveis, tendo sido encontradas inclusões de até 25 μ m de comprimento. A maioria das células da epiderme de folhas de feijoeiro e feijão macassar, retiradas de lesões locais do VMV, continham inclusões fusiformes, podendo algumas vezes se observar até três inclusões em uma mesma célula. Não foram encontradas inclusões fusiformes nas células guarda do estomato e nas células dos tricomas.

Essas inclusões fusiformes não foram, contudo, observadas em secções espessas (1-2 μ m) de tecidos foliares de feijoeiro, feijão macassar e C. quinoa infectados com o VMV, fixados e incluídos segundo as técnicas empregadas para microscopia electrónica, coradas com azul de metileno-borax e examinadas ao microscópio de luz. Também em secção de tecidos foliares de feijão macassar infectados pelo VMV, fixados em aldeído glutárico, incluídos em parafina e corados com hematoxilina-eosina, não foram detectadas inclusões fusiformes.

Em epidermes de feijão macassar infectado com o VMV, mergulhadas em solução de HCl 0,1 N durante 1 hora, observou-se que as inclusões fusiformes apresentavam-se mais volumosas e menos compactas (Fig. 22) do que aquelas de tecidos não tratados. Nas epidermes tratadas com pepsina em solução de HCl 0,1 N durante 15 min., notou-se que as inclusões apresentavam um início de desagregação (Fig. 23) a qual se acentuava após 30 min. (Fig. 24), encontrando-se apenas fragmentos da inclusão após 60 min. (Fig. 25).

4.2.2. Microscopia electrónica

4.2.2.1. Estudo sobre a morfologia das partículas

4.2.2.1.1. Preparações "leaf-dip" contrastadas negativamente.

Nas amostras de folhas de feijão macassar, feijoeiro e C. quinoa, infectados com o VMV, processadas pelo método de preparação rápida ("leaf-dip"/contrastação negati

va) e examinadas ao microscópio electrónico foram detectadas partículas isométricas de ca. 25 nm de diâmetro. Algumas vezes essas partículas apresentavam-se agregadas, aparentemente envolvidas por fragmentos de membranas (Fig. 26). Em preparações realizadas a partir de tecidos sadios, não se observaram partículas semelhantes.

Tanto em preparações de tecido de feijão macassar e feijoeiro sadios como infetados com o VMV, foram observados bastonetes retilíneos ou curvos de comprimento variável e aparentemente constituídos por subunidades anelares de 10-15 nm de diâmetro (Fig. 27). Apesar destes bastonetes serem encontrados tanto em tecido sadio como infetado, foi notado que eles eram mais abundantes nas preparações a partir de tecidos infetados com lesões locais.

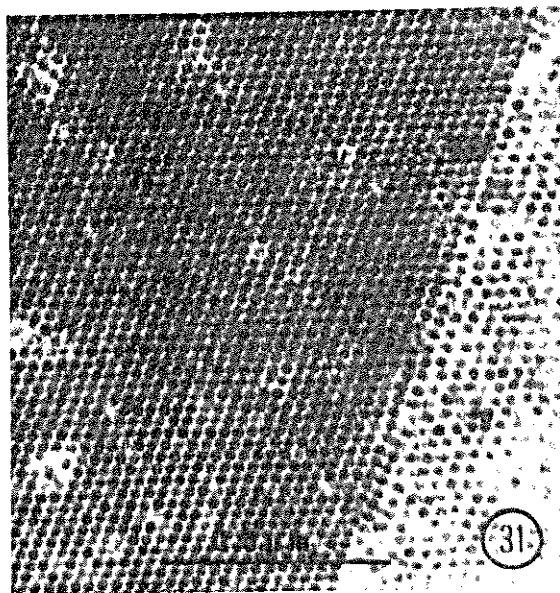
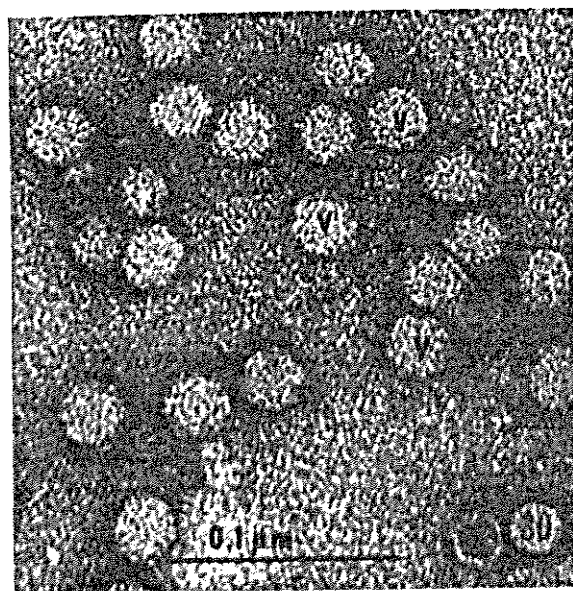
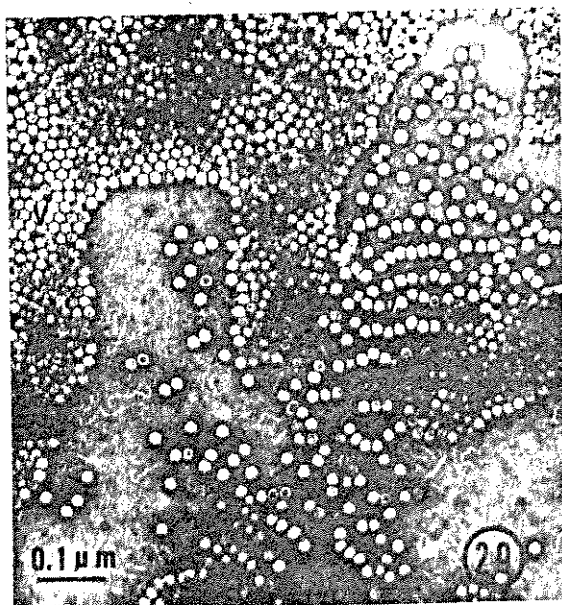
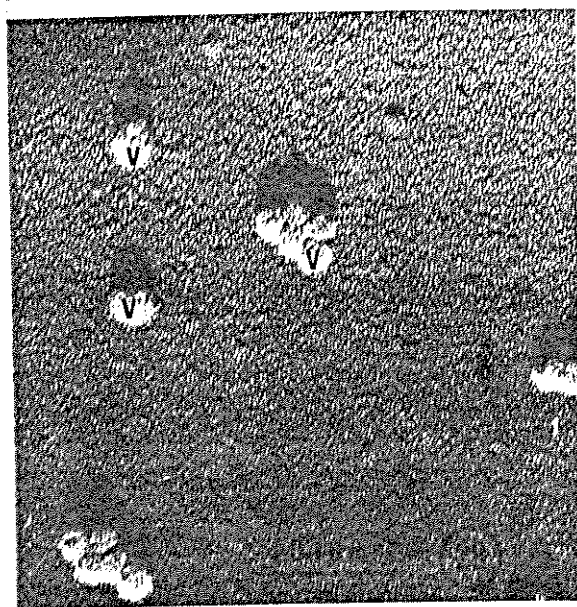
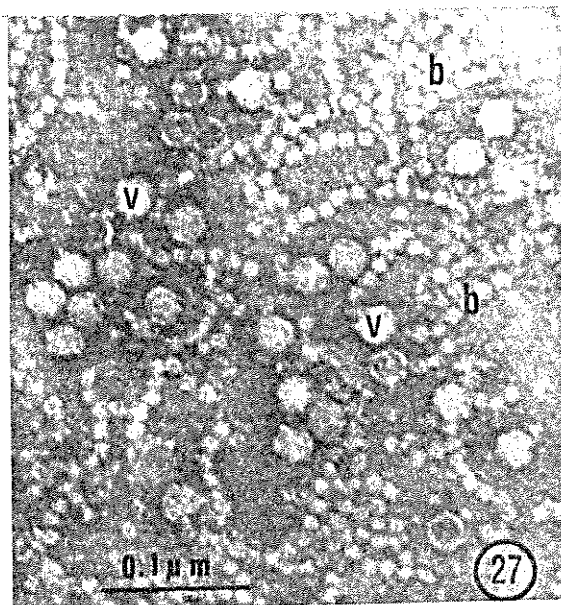
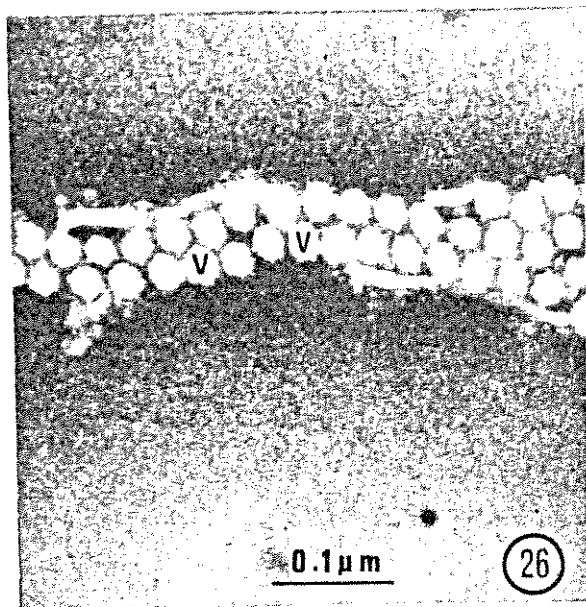
4.2.2.1.2. Preparações purificadas

A fim de se certificar que as partículas observadas em preparações rápidas representam as partículas do VMV, o suco extraído de tecido foliar de feijão macassar infetado foi submetido a um tratamento visando purificar as partículas do VMV, e que se constituía num ciclo de ultracentrifugação diferencial seguida por ultracentrifugação em gradiente de densidade (Oliveira et al., 1969). Amostras altamente infectivas de preparações purificadas foram metalizadas com cromo, observando-se numerosas partículas de ca. 30 nm de diâmetro. A "sombra" dessas partículas podia ser angular ou truncada (Fig. 28).

Nas alíquotas de preparações purificadas do VMV, contrastadas negativamente com ácido fosfotungstico ou acetato de uranila, foram encontradas partículas isométricas (Figs. 29-30), semelhantes àsquelas encontradas em preparações rápidas (Fig. 26). Foram medidas 900 partículas, encontrando-se um diâmetro de 24-28 nm. Nessas preparações foram identificadas também partículas com o interior denso ao feixe de electrons, provavelmente representando partículas ocas (Figs. 29-30). O diâmetro dessas partículas era em torno de 20 nm.

Figs. 26-27. Partículas isométricas(v) presentes em preparações "leaf-dip" contrastadas negativamente de folhas de feijão macassar infetado pelo VMV. Notar que essas partículas, aparentemente, se encontravam limitadas por uma estrutura membranosa (Fig.26), ou próximas a bastonetes anelados (Fig.27).

Figs. 28-31. Partículas isométricas do VMV em preparações purificadas, metalizadas, onde se observam a "sombra" angulosa ou truncada das partículas (Fig. 28), coradas com acetato de uranila, nas quais o número de partículas ocas e completas é equivalente (Figs.29-30) e em secção ultrafina de "pellets" (Fig.31).



ções purificadas do VMV, notaram-se partículas hexagonais de ca. 20-25 nm de diâmetro ocasionalmente formando arranjos cristalinos (Fig. 31).

4.2.2.2. Secções ultrafinas de tecidos infetados

4.2.2.2.1. Aspectos gerais dos tecidos infetados

Durante exames electromicroscópicos de secção ultrafina de tecidos foliares de feijão macassar, feijoeiro e C. quinoa infetados com o VMV foram observados corpúsculos densos com morfologia semelhante à das partículas observadas em secção ultrafina de "pellets" de material purificado (Fig. 31). A similaridade morfológica, existente entre as partículas do VMV observadas in vitro e as partículas identificadas in situ, sugere que essas últimas representam as partículas do VMV, e serão assim referidas doravante.

Nos tecidos infetados, as partículas do VMV foram frequentemente identificadas no citoplasma, nos plasmodesmata e nos vacúolos, mas não no núcleo. Na matriz citoplasmática, as partículas de vírus podiam ocorrer agrupadas (Fig. 35), às vezes em pequenos agregados cristalinos de 0,2 - 0,5 μm de extensão (Figs. 43-44), geralmente nas proximidades de massas fibrilares. Nos agregados cristalinos foram medidas 397 partículas, encontrando-se um diâmetro de 17 - 23 nm. No citoplasma também foram encontradas partículas de 17 - 23 nm de diâmetro localizadas entre os elementos da massa fibrilar associada à infecção pelo VMV (Fig. 33) e próximo de protuberâncias da parede celular (Figs. 38-42); estruturas cujos detalhes serão descritos posteriormente.

Na luz dos plasmodesmata entre células de tecidos infetados com o VMV, mas não nos tecidos saudáveis, foram observadas partículas densas semelhantes àsquelas encontradas no citoplasma e consideradas como as partículas do VMV. Em geral, observou-se apenas uma fileira de partículas na luz dos plasmodesmata (Figs. 36-37), os quais mediam ca. 30-40 nm de diâmetro, podendo no entanto serem ocasionalmente encontradas duas ou mais fileiras de partículas em plasmodesmata

com diâmetro de até 80 nm. Partículas de vírus puderam ser observadas também na luz de prolongamentos dos plasmodesmata, nas protuberâncias da parede celular (Figs. 38-42).

Partículas do VMV foram também notadas entre-meadas a vesículas citoplasmáticas de diâmetro variável entre 0,2-2 μ m (Fig. 34) e também nos vacúolos das células infetadas (Figs. 34 e 43, inserção). Frequentemente as partículas do VMV foram notadas no vacúolo de células cujo citoplasma se encontrava ocupado por extensa inclusão fibrilar.

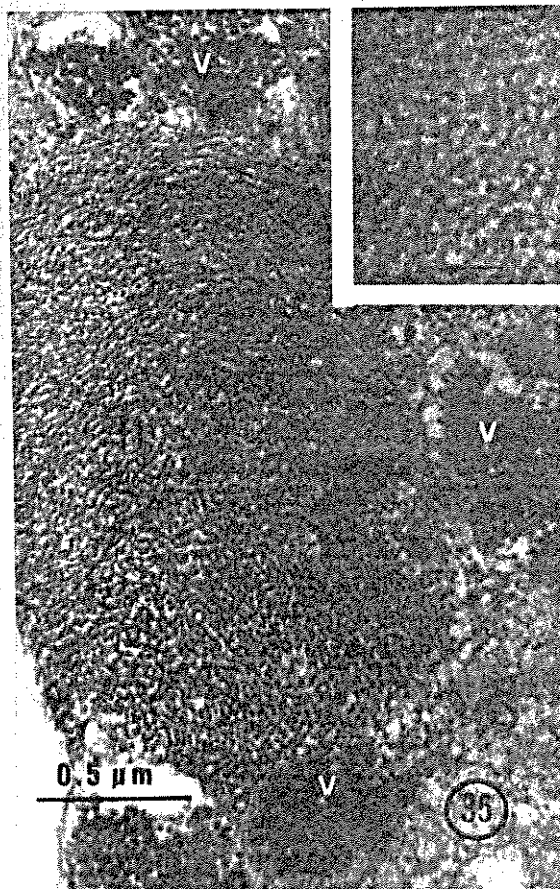
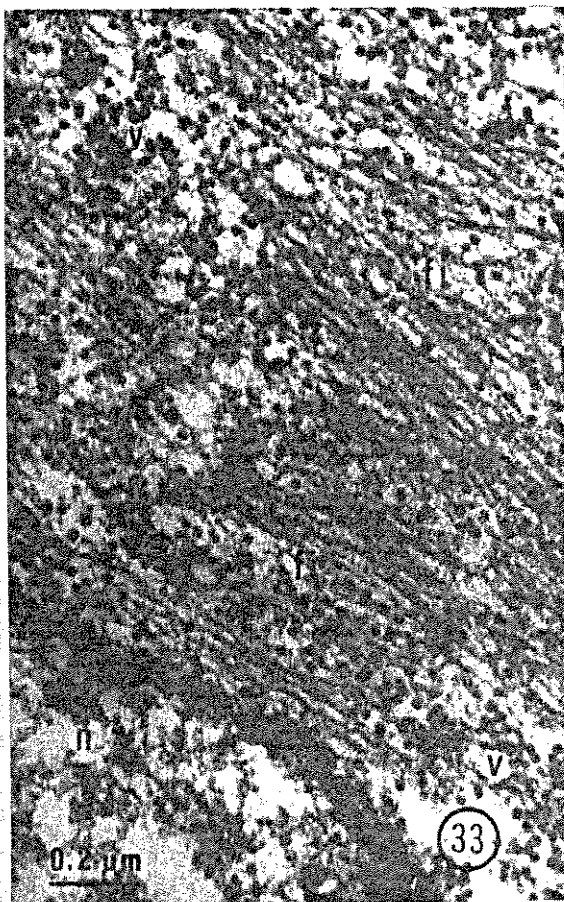
Além da presença das partículas do VMV, foram notadas, nos tecidos de feijoeiro, feijão macassar e C. quinoa infetados com o VMV, alterações celulares não encontradas nos tecidos sadios.

No citoplasma dessas células se observaram massas filamentosas constituídas de fibrilas flexíveis dispostas paralelamente de maneira frouxa (Figs. 32-35 e 43-44) e que provavelmente correspondem às inclusões fusiformes identificadas ao microscópio de luz em epiderme de plantas infetadas com o VMV (Figs. 20-21). O comprimento das fibrilas era indeterminável e o diâmetro de aproximadamente 10 nm, medidos em secções transversais (Fig. 35). Entre as fibrilas e próximo a elas pode-se notar partículas do VMV (Figs. 33-35), e também elementos do retículo endoplasmático rugoso (Fig. 34).

As inclusões fibrilares se localizavam em geral nas proximidades do nucléolo, podendo algumas vezes ocupar grande extensão do citoplasma (Figs. 43-44). Quando a massa fibrilar era muito desenvolvida, podia-se encontrar cloroplastos e mitocôndrias circundados por ela (Fig. 43) ou na sua periferia. Inclusões fibrilares foram observadas nas células da epiderme, mesófilo e parênquima vascular (Figs. 32-35 e 43-44), mas não nas células dos tricomas ou nos elementos vasculares.

Outra alteração celular somente identificada nos tecidos infetados com o VMV ocorria na parede celular

Figs. 32-35. Células do parênquima paliçádico de tecido foliar de feijão macassar e feijoeiro infetados pelo VMV. Inclusão fusiforme(f) no citoplasma e partículas de vírus(v) no vacúolo (Fig.32). Detalhe da inclusão fusiforme em que se observam fibrilas(fi) e partículas, provavelmente do VMV, dispersas no citoplasma (Fig.33). Secção oblíqua de fibrilas ladeadas por elementos do retículo endoplasmático(re), vesículas(cv) e partículas de vírus(v) no vacúolo em células de feijoeiro (Fig.34). Secção transversal das fibrilas(fi), notando-se nas proximidades, aglomerados de partículas de vírus(v) (Fig.35). Na inserção, um detalhe da secção transversal da inclusão fusiforme, medindo cada fibrila ca. 10-15 nm.



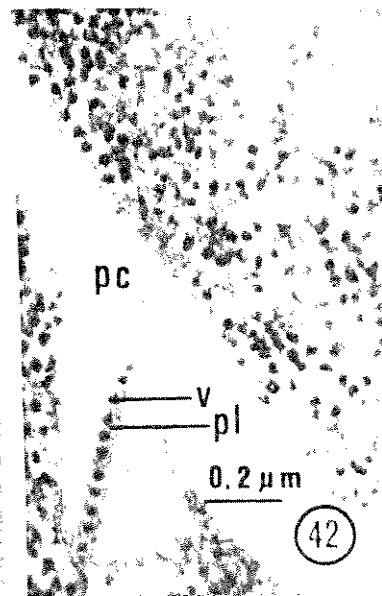
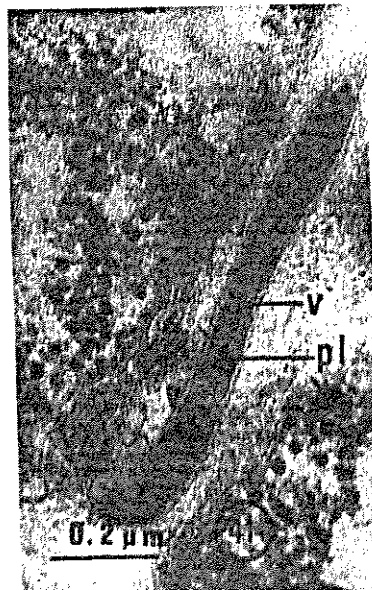
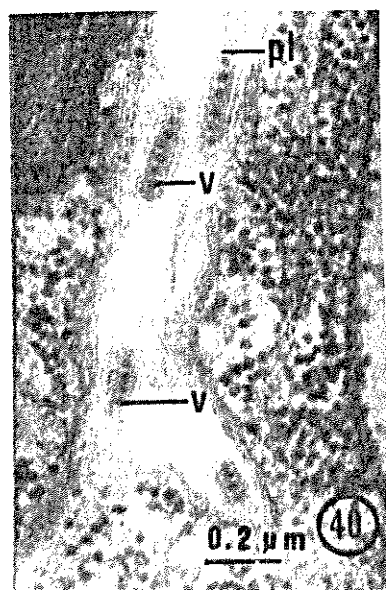
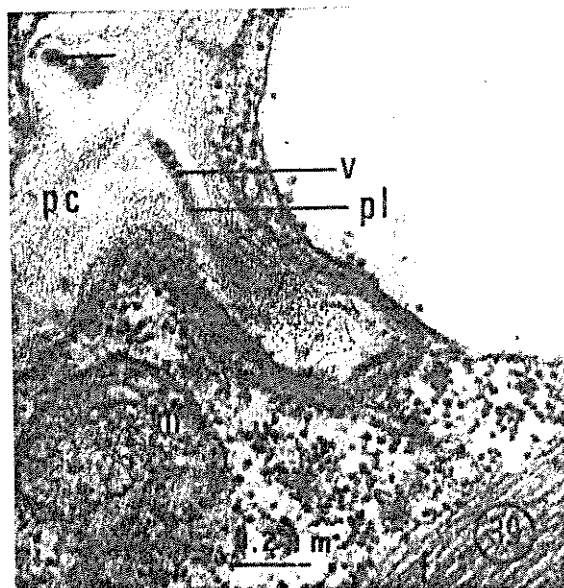
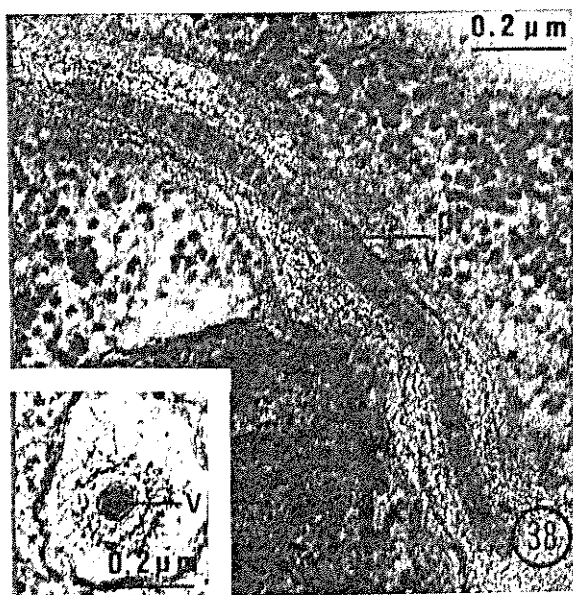
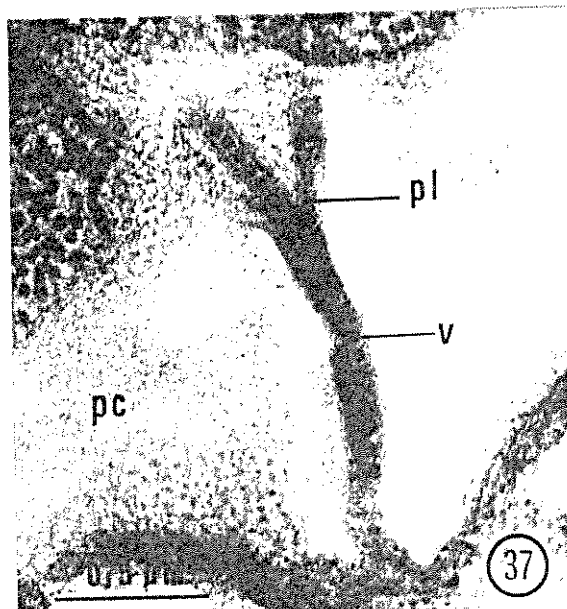
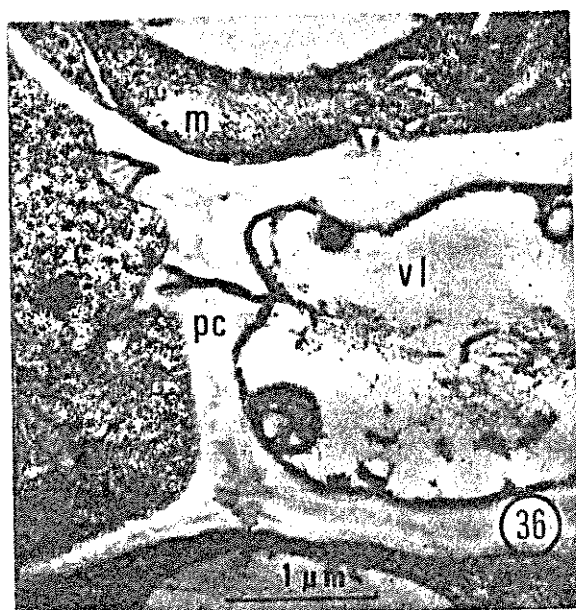
36-42). Na região dos plasmodesmata foram observadas projeções da parede celular em direção ao citoplasma, em cujo interior eram encontrados túbulos contendo partículas de vírus (Figs. 38-42). As projeções em forma de dedo parecem representar uma protuberância da parede celular, enquanto que os túbulos seriam o prolongamento dos plasmodesmata.

O comprimento das protuberâncias da parede celular era muito variável, tendo sido observado algumas vezes projeções com ca. 8 μ m de comprimento. Em secções transversais, as projeções tinham um perfil circular (Fig. 38, inserção), envolvidas externamente por uma membrana unitária, a plasmalema. Na parte central da projeção, pode-se observar um pequeno anel de diâmetro variado entre 30-60 nm, frequentemente contendo partículas do VMV e que deve representar a secção transversal do prolongamento do plasmodesma (Figs. 38-42). Em torno desse anel se observou uma estrutura fibrilar, densa aos electrons e que possivelmente representa o material constituinte da parede celular (Fig. 38).

Em geral, foram observadas projeções em apenas um dos lados da parede celular (Figs. 38, 41-42), mas esporadicamente elas podiam ser vistas de ambos os lados da parede (Figs. 39 e 49). Cada projeção usualmente continha apenas um plasmodesma, mas ocasionalmente foram observados dois ou mais plasmodesmata em uma mesma projeção (Fig. 40). No interior dos plasmodesmata podiam ocorrer fileiras de uma (Figs. 38-40 e 42) ou mais partículas de vírus (Fig. 41). Em geral, não era possível observar partículas de vírus em toda a extensão da protuberância, provavelmente, devido à dificuldade do plano de secção apanhá-la por inteiro, mas, quando raramente isso ocorria, podia-se notar que a luz dos plasmodesmata era contínuo com o citoplasma adjacente (Fig. 42).

Tanto nos tecidos de feijoeiro, feijão macas - sar como C. quinoa infetados com o VMV, foram observados conjuntos de vesículas no citoplasma. Essas vesículas eram pouco densas ao feixe de electrons e tinham diâmetro variável entre 0,2-0,5 μ m (Figs. 34, 46 e 50). Foram observados dois padrões de vesículas citoplasmáticas, as quais podiam

Figs. 36-42. Partículas de vírus no interior de plasmodesmata modificados. Partículas de vírus em plasmodesma entre a célula companheira(cc) e vaso liberiano(vl) (Fig.36). No detalhe desse plasmodesma pode-se notar partículas de vírus em seu interior (Fig.37). Protuberância da parede celular(pc) na região do plasmodesma(pl), com partículas enfileiradas. Na inserção, um detalhe de corte transversal da projeção (Fig.38). Protuberância da parede celular, de ambos os lados da célula e próxima a uma inclusão fibrilar(fi) (Fig.39), com mais de um plasmodesma (Fig.40) ou com várias fileiras de partículas em um plasmodesma (Fig.41), e com plasmodesma aberto para o citoplasma adjacente (Fig.42).



eventualmente ocorrer ao mesmo tempo em uma mesma célula. Algumas vesículas apresentavam contorno circular de ca. 0,5 μm de diâmetro e achavam-se dispersas no citoplasma (Fig. 46), às vezes, contendo material de relativa densidade electrónica ou uma substância fibrilar. Outro padrão de estrutura vesicular encontrado nas células era constituído de conjuntos compactos de vesículas menores de 0,2 μm de diâmetro (Fig. 34).

Ao lado das inclusões fibrilares, projeções da parede celular e vesículas no citoplasma, foram notadas alterações nas organelas celulares como o retículo endoplasmático que se encontrava bastante desenvolvido principalmente nas proximidades da inclusão fibrilar (Figs. 34 e 50). Os cloroplastos e mitocôndrias tinham a sua estrutura alterada e se encontravam agrupados provavelmente comprimidos pela extensa massa fibrilar. No núcleo de plantas de feijoeiro e feijão macassar tanto sadias como infetadas com o VMV se observaram pequenas fibrilas (Fig. 47) semelhantes às inclusões fibrilares citoplasmáticas, associadas à infecção do VMV.

Nos tecidos radiculares de feijão macassar infetado com o VMV não foram visualizadas partículas de vírus ou inclusões fibrilares.

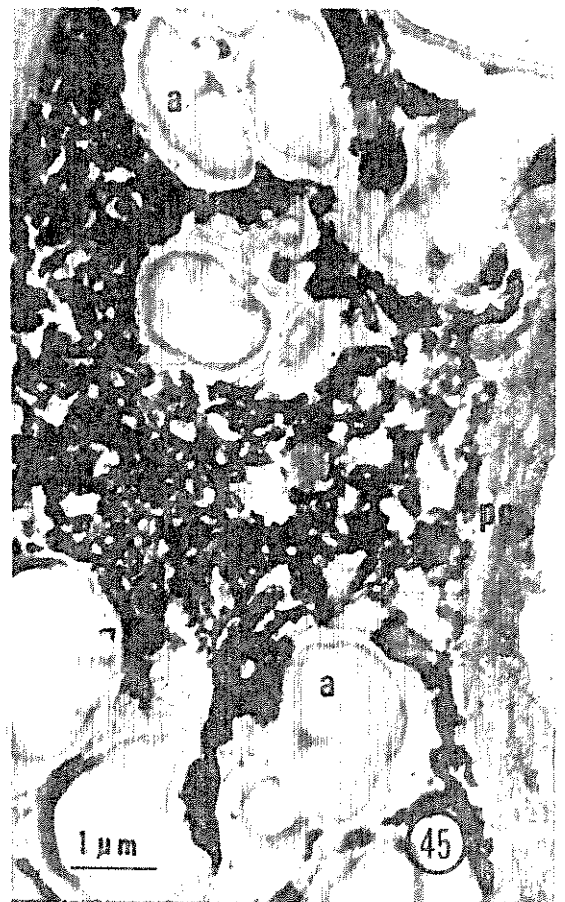
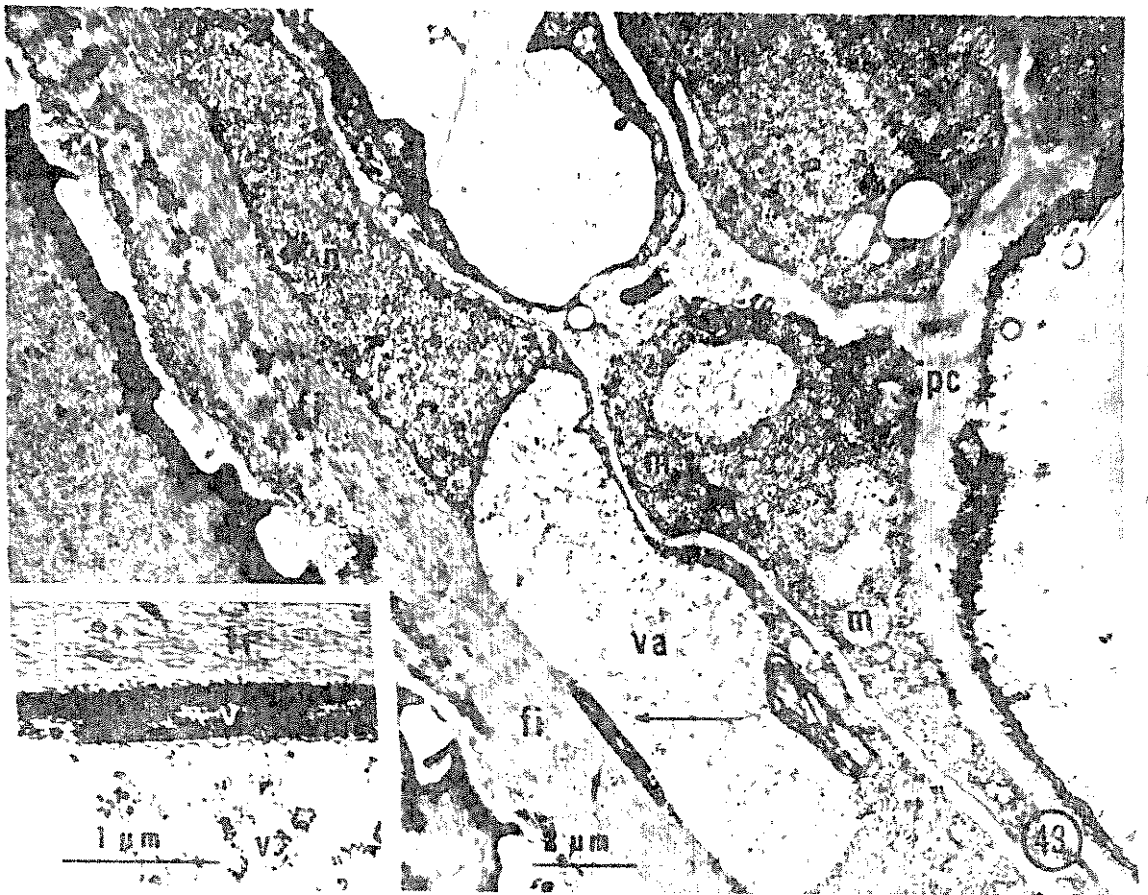
4.2.2.2.2. Diferenças entre os tecidos infetados sistemicamente e com lesões locais.

As inclusões fibrilares, vesículas e projeções da parede celular eram mais abundantes e mais conspícuas nos tecidos com sintomas locais cloróticos (Figs. 43-44), do que nos tecidos com infecção sistêmica (Figs. 32-35).

Nas células de tecidos com sintomas cloróticos, as protuberâncias da parede celular alcançavam grandes dimensões, tendo-se observado algumas delas com mais de 8 μm de comprimento. O citoplasma dessas células achava-se, em sua maior parte, ocupado por inclusões fibrilares, podendo-se notar organelas celulares na periferia da célula ou no centro da massa fibrilar (Fig. 44). Nessas células as partículas de vírus podiam ser observadas principalmente na luz de plasmo -

Figs. 43-44. Inclusões fibrilares(fi) e agregados cristalinos de partículas(v) do VMV em tecido de C. quinoa com sintomas locais cloróticos. Secção longitudinal do parênquima vascular adjacente ao traqueídeo, observando-se no citoplasma uma extensa inclusão fibrilar(fi) (Fig.43). No maior aumento da região assinalada (seta), observar agregado cristalino de partículas de vírus(v) na periferia da inclusão fibrilar ou dispersas no vacúolo (va) (Fig.43). Extensa área do citoplasma ocupada pelas fibrilas, notando-se no maior aumento da região assinalada (seta), um cristal de vírus (Fig.44).

Fig. 45. Aspecto da célula de tecido necrosado de feijão macassar infectado pelo VMV. O citoplasma e os cloroplastos acham-se desorganizados, notando-se grãos de amido(a) esparsos.



-desmata modificados e em arranjos cristalinos (Figs. 43-44). Algumas células encontravam-se necrosadas, podendo-se observar um citoplasma amorfo e denso aos electrons, notando-se também cloroplastos alterados com grãos de amido proeminentes (Fig. 45).

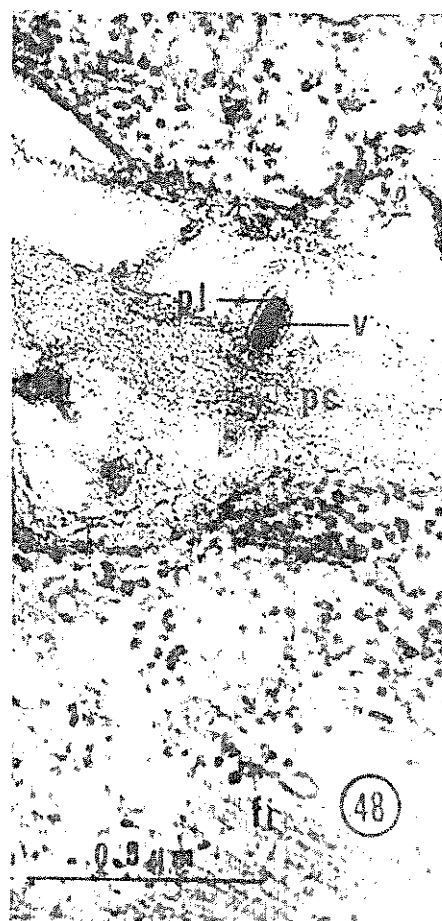
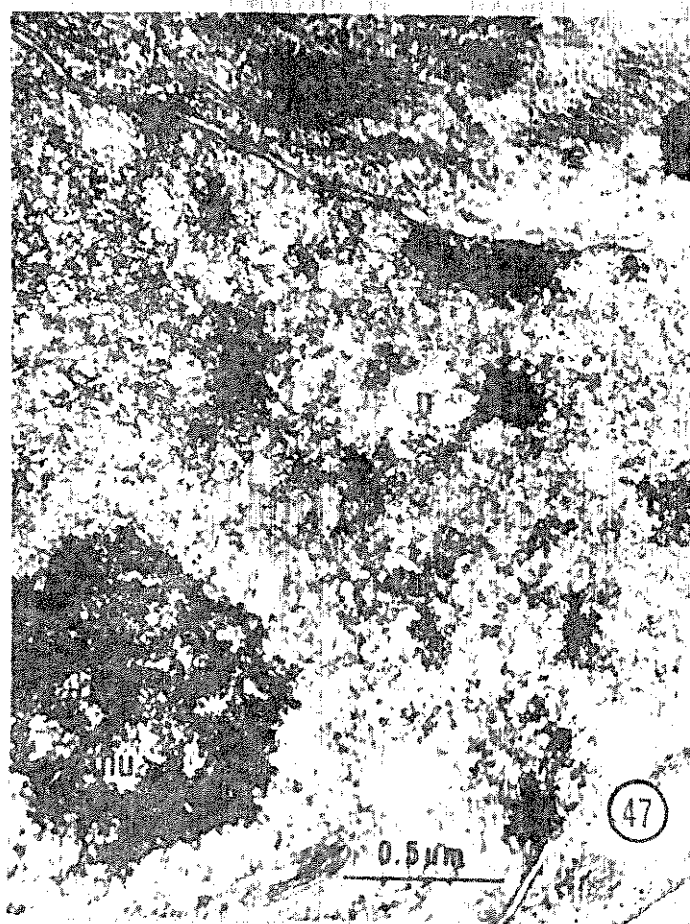
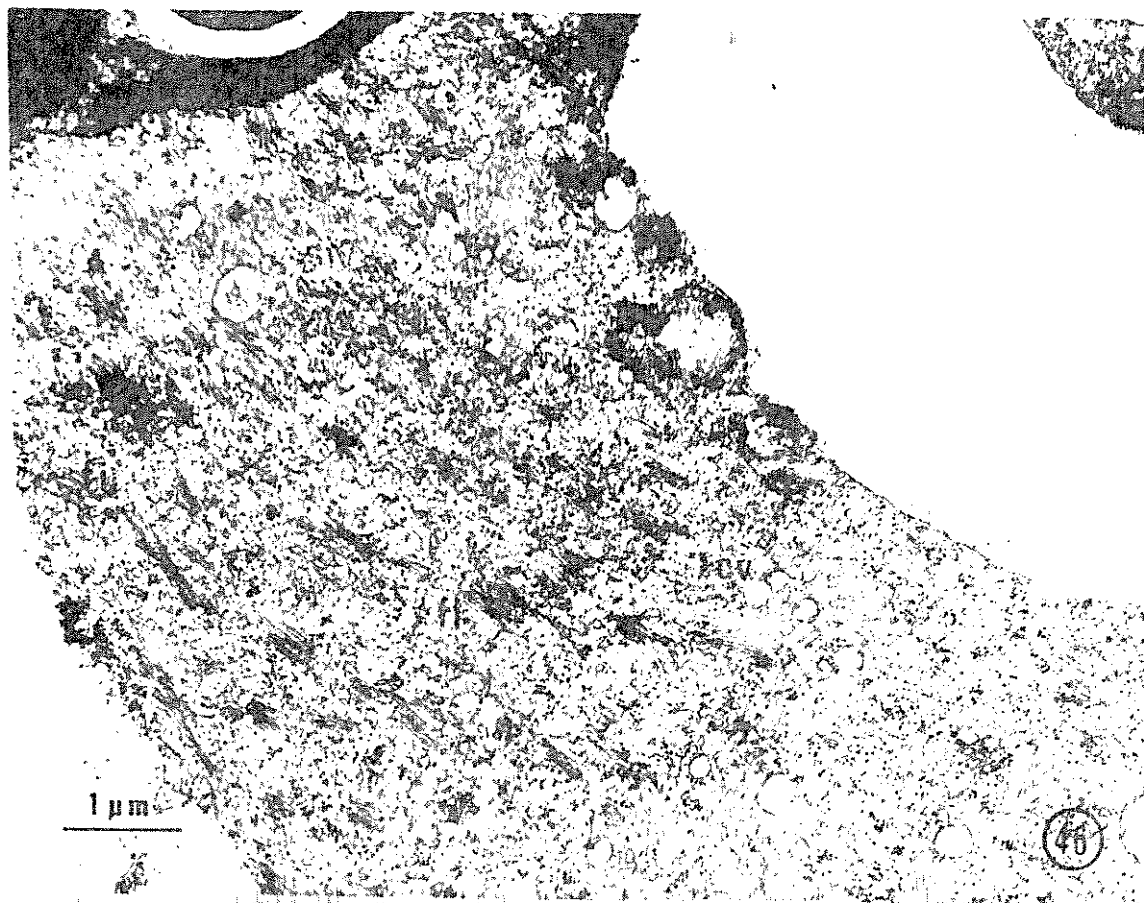
Os tecidos com infecção sistêmica encontravam-se melhor preservados do que aqueles com lesões locais cloróticas. Nessas células, as inclusões fibrilares ocupavam pequenas porções do citoplasma e as organelas celulares não se encontravam muito alteradas. As protuberâncias da parede celular eram pouco conspícuas e as vesículas citoplasmáticas menos frequentes. As partículas de vírus eram geralmente encontradas agrupadas próximas às inclusões fibrilares e na luz de prolongamentos dos plasmodesmata (Figs. 38-42).

4.2.2.2.3. Exames de amostras de tecidos coletados periodicamente.

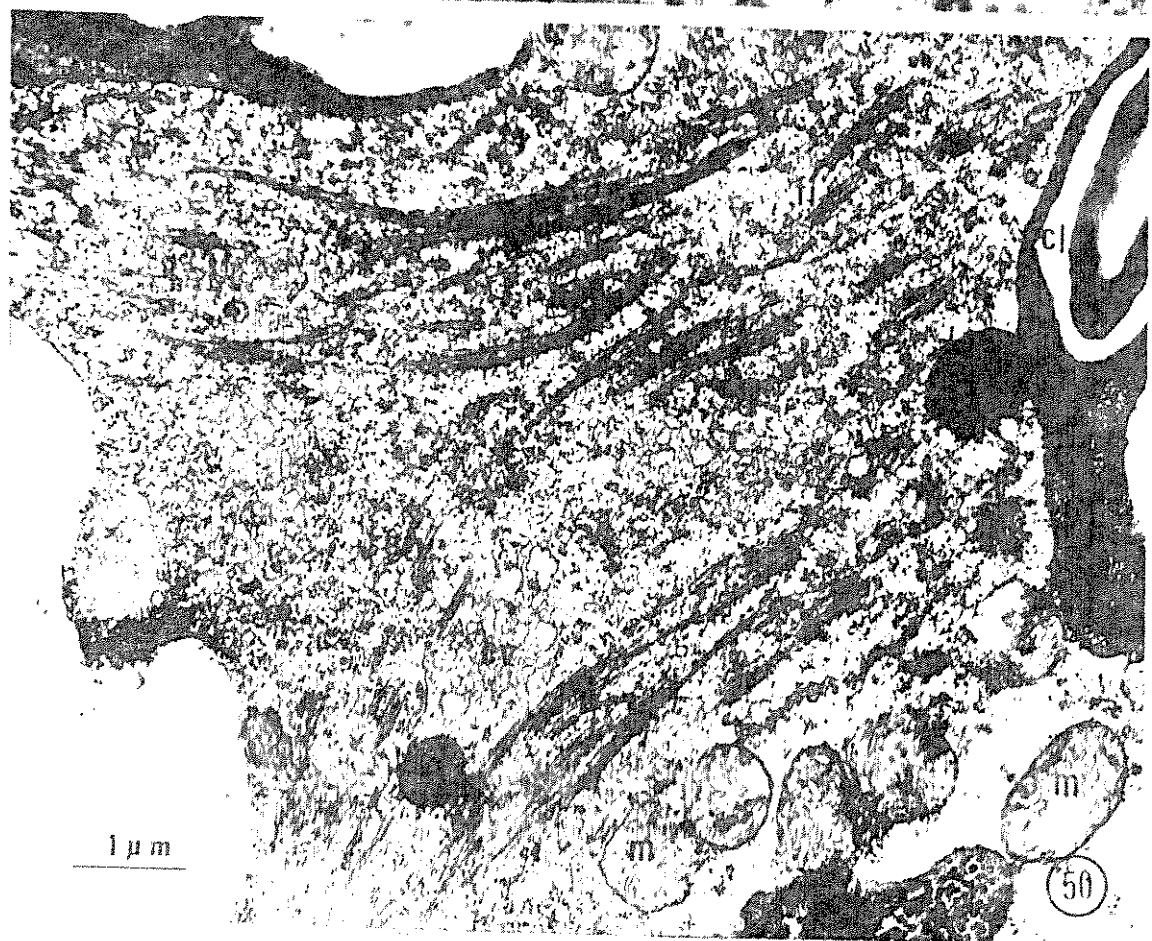
As células de tecidos de folhas primárias de V. sinensis, inoculados com o VMV e fixados após o primeiro e segundo dia da inoculação do vírus, apresentavam aspecto normal. Porém, nos tecidos coletados no terceiro e quarto dia após a inoculação do VMV já podiam ser observadas algumas alterações no citoplasma. Nessas células foram encontradas pequenas protuberâncias na parede celular no local dos plasmodesmata, podendo-se notar umas poucas partículas de vírus em sua luz (Fig. 48). No citoplasma foram observados pequenos aglomerados de fibrilas, ligeiramente arqueadas e entre elas, vesículas e partículas densas (Figs. 46-48). Nos tecidos coletados após o quinto e sexto dia da inoculação pode-se notar que as protuberâncias da parede celular apresentavam-se mais longas e com maior número de partículas de vírus (Fig. 49) do que na fase anterior. No citoplasma dessas células foram observados conjuntos de fibrilas mais longas e mais largas (Fig. 50) que na fase anterior, podendo-se notar, nas proximidades das fibrilas, elementos do retículo endoplasmático, vesículas e mitocôndrias (Fig. 50).

Nos tecidos fixados após o sétimo dia da inocu

Figs. 46-48. Tecido foliar de feijão macassar coletado no 3º e 4º dia após a inoculação pelo VMV. Notar pequenos aglomerados de fibrilas(fi) e vesículas(cv) no citoplasma (Fig.46) e próximas ao núcleo(n) (Fig.47), no qual se observa uma estrutura semelhante às fibrilas citoplasmáticas. Partículas de vírus(v) já podem ser detectadas no interior do plasmodesma(pl), notando-se uma pequena protuberância da parede celular(pc) (Fig. 48).



Figs. 49-50. Tecido foliar de feijão macassar coletado entre o 5º e 6º dia após a inoculação pelo VMV. Notar partículas de vírus(v) em plasmodesma(pl) modificado (Fig.49), pequenos aglomerados de vesículas(cv) e conjuntos de fibrilas(f1) no citoplasma (Fig.50). Na periferia da região fibrilar e vesiculosa, notar elementos do retículo endoplasmático(re), mitocôndrias(m) e cloroplastos(cl).



lação do VMV, foram encontradas no citoplasma inclusões fibrilares e vesículas e na parede celular projeções semelhantes àsquelas observadas em tecidos foliares infectados sistemicamente.

4.3. Ultraestrutura de Tecido Foliar de Feijoeiro Infectado com o VMDF e VMV.

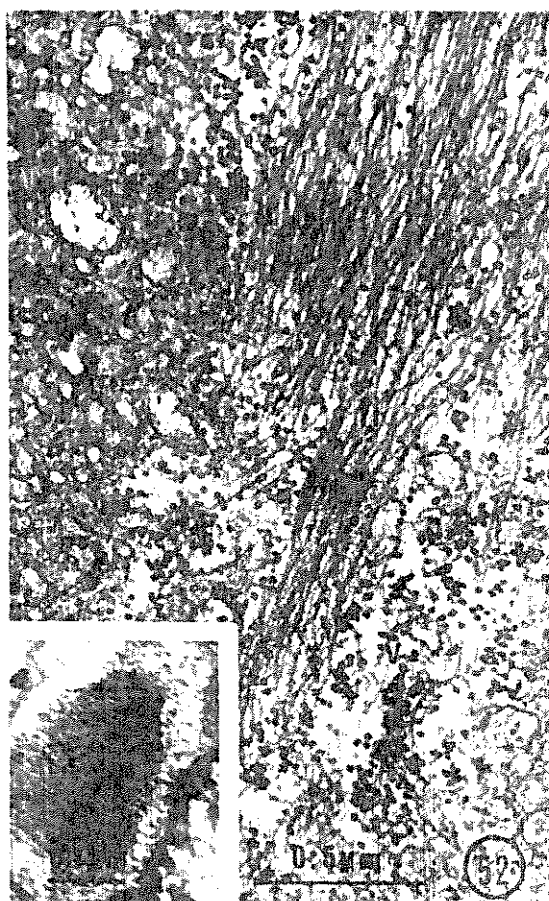
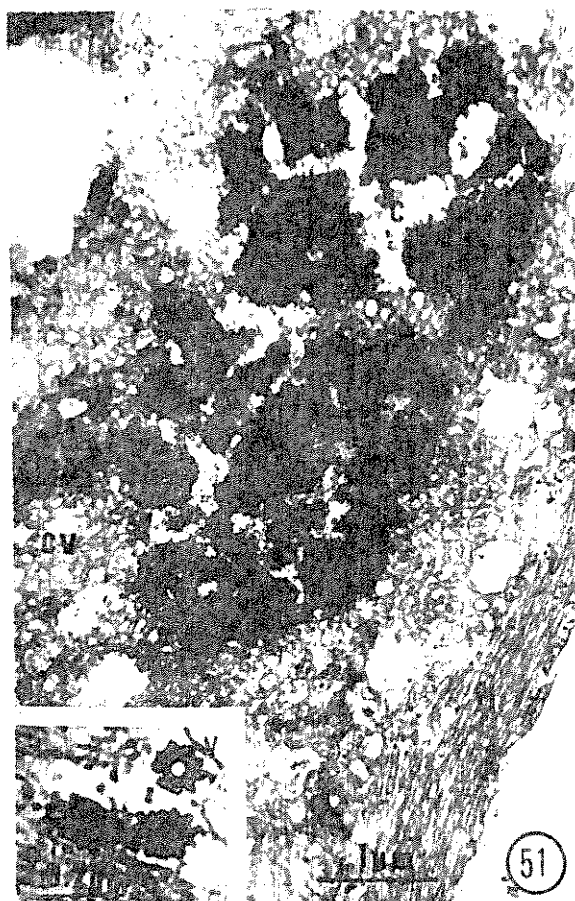
Amostras de folhas de plantas de feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.) inoculadas com o VMDF e após 10 dias superinoculadas com o VMV foram fixadas e processadas para exames de ultraestrutura. As folhas foram coletadas de plantas com sintomas sistêmicos do VMDF e sintomas cloróticos do VMV.

As células infectadas com os dois vírus achavam-se bastante alteradas, em visível estado de degeneração (Figs. 51-54). Os cloroplastos encontravam-se deformados, com a grana e estroma desorganizados, notando-se inúmeros grãos de amido em seu interior. As mitocôndrias encontravam-se às vezes agrupados no citoplasma junto à parede celular, tendo suas cristas muito desenvolvidas (Fig. 53). Separando duas mitocôndrias próximos, observaram-se filamentos de 30-40 nm de comprimento (Fig. 54). No núcleo não se identificaram estruturas anômalas.

As células de feijoeiro infectado com o VMDF e com o VMV encontravam-se parcialmente ocupadas por inclusões cristalinas e fibrilares, típicas de cada vírus (Figs. 51-52). Nesses tecidos se observaram cristais típicos do VMDF, medindo 2 x 3 µm de extensão, envolvidos por vesículas do citoplasma (Fig. 51). Esses cristais não formavam um corpo homogêneo, podendo-se notar zonas claras entre porções intactas do cristal. Não foram observadas inclusões cristalinas de contorno irregular, comumente encontradas nos tecidos infectados apenas com o VMDF.

Nas mesmas células em que foram encontradas as inclusões cristalinas associadas ao VMDF, foram identificadas as inclusões fibrilares, típicas do VMV, ocupando grande

Figs. 51-54. Tecido foliar de feijoeiro inoculado pelo VMDF e posteriormente inoculado pelo VMV. Pode - se notar cristais(c) do VMDF circundado por vesículas(cv) e fibrilas(fi) do VMV (Fig.51). Na inserção da Fig.51, um aspecto bizarro das partículas do VMV, dispostas em círculo, próximas as fibrilas. Conjuntos distintos de fibrilas e vesículas no citoplasma, notando-se partículas de vírus(v) entre elas. Notar também pequenas fibrilas no interior de algumas vesículas (Fig.52). Na inserção, corte tangencial do prolongamento do plasmodesma contendo partículas de vírus (Fig.52). Inclusões fibrilares ocupando extensa área do citoplasma, notando - se agregados de mitocôndrias(m) na periferia da célula (Fig.53). Esses mitocôndrias apresentavam cristas bem desenvolvidas e pequenas fibrilas entre eles (Fig.54).



extensão do citoplasma (Fig. 52). Entre as fibrilas e no interior de vacúolos citoplasmáticos foram notadas unidades corpusculares esparsas medindo 17-23 nm de diâmetro e interpretadas como as partículas do VMV (Fig. 52). No interior de protuberâncias da parede celular foram observadas partículas enfileiradas (Fig. 52, inserção), semelhantes àquelas encontradas nos tecidos infetados apenas com o VMV. Junto às fibrilas se observaram formações bizarras, formadas por túbulos de 50 a 70 nm de diâmetro, circundado por corpúsculos densos (Fig. 51, inserção).

5. DISCUSSÃO

Sob o ponto de vista morfológico, não foi possível distinguir as partículas do VMDF das do VMV. Em preparações rápidas verificou-se que as partículas desses vírus têm contorno hexagonal e diâmetro em torno de 25 nm, confirmando os dados preliminares de Camargo et al. (1969), Costa et al. (1969) e Kitajima et al. (1973). Também em preparações purificadas desses vírus foram encontradas partículas de 25-30 nm, sendo essas preparações altamente infectivas quando inoculadas em plantas testes, o que evidencia a natureza viral dessas partículas. Uma análise mais detalhada revela que as partículas desses vírus têm a forma icosaédrica, inferida através da "sombra" angulosa ou truncada, observada nas preparações metalizadas, semelhante ao que ocorre com relação a outros vírus de simetria icosaédrica (e.g. Smith & William, 1958).

As partículas ocas de 20-25 nm de diâmetro, encontradas nas preparações purificadas do VMDF e do VMV, devem representar as partículas de vírus sem ácido nucleico, semelhantes às aquelas descritas, associadas a vários outros vírus isométricos (e.g. Markham, 1962) e cujo significado não se acha ainda esclarecido. Os bastonetes de 10-15 nm de diâmetro encontrados nas preparações rápidas de tecidos de feijoeiro e soja infetados com o VMDF e tecidos de feijoeiro e feijão macassar infetados com o VMV, parecem representar estruturas normais dos tecidos, pois foram também encontrados nas preparações similares de tecidos de plantas sadias, mas não nos tecidos de C. quinoa, infetados ou não com o VMV, representando talvez uma peculiaridade de certas leguminosas. Também as partículas de 8-9 nm encontradas em algumas preparações purificadas do VMDF e VMV devem representar estruturas normais das células, pois são encontradas em preparações de plantas sadias, sendo morfológicamente semelhantes à fito ferritina descrita em preparações do vírus da mancha anular do fumo, purificado a partir de feijoeiro (Hibben & Bozarth, 1972).

Nas seções ultrafinas de tecidos infetados

tanto pelo VMDF como pelo VMV ocorrem agregados de partículas isométricas não encontradas em tecidos sadios, devendo estas representarem as partículas desses vírus. Além da associação com a infecção, a sugestão da sua natureza viral se acha reforçada pela sua similaridade com as partículas encontradas nas secções ultrafinas de "pellets" de preparações purificadas desses vírus. É interessante ressaltar que o diâmetro das partículas do VMDF ou do VMV, em secção ultrafina de tecidos e de "pellets" era ligeiramente inferior ao diâmetro das partículas observadas em preparações contrastadas negativamente. Isto possivelmente se deve ao fato de o cerne nucleico da partícula se corar mais intensamente do que a capa proteica. Conclusões similares chegaram outros autores durante as investigações com diversos vírus isométricos como o SBMV (Edwardson et al., 1966), mosaico do "bromegrass" (Paliwal, 1970), mosqueado do morangueiro (Kitajima et al., 1971) e mosaico do "cowpea" (van der Scheer & Groenewegen, 1971).

O VMDF e o VMV embora fossem morfologicamente semelhantes, distribuíam-se de uma maneira diferente no interior da célula infetada. As partículas do VMDF ocorriam somente formando arranjos cristalinos no citoplasma, enquanto que as partículas do VMV podiam ocorrer associadas a inclusões fibrilares, esporadicamente formando pequenos agregados cristalinos, dispersas nos vacúolos ou na luz de plasmodesmata modificados. A presença de virions no vacúolo poderia ser atribuída ao excesso de material viral do citoplasma e seu conseqüente extravasamento para a cavidade vacuolar ou como um artefato devido à ruptura do tonoplasto, decorrente da diferença de molaridade entre o fixador e o tecido. Não observamos, porém, vesículas citoplasmáticas contendo partículas de vírus que pudessem emergir para a cavidade vacuolar, ou conjuntos de partículas, envolvidas por membranas, no interior do vacúolo como tem sido descrito com relação ao vírus do mosqueado da alcachofra (Russo et al., 1968) e ao "pod mottle" do feijoeiro (Kim & Fulton, 1972).

Normalmente, em tecidos infetados ou não, o-

correm no citoplasma grande quantidade de partículas de 15-20 nm de diâmetro, que devem representar os ribossomos. Nos tecidos infetados pelo VMDF ou VMV, não foi possível distinguir os ribossomos das partículas virais, quando eles encontravam-se misturados. Problema semelhante foi apontado no estudo da ultraestrutura de tecidos infetados com o vírus isométricos da faixa de 20-30 nm de diâmetro, como por exemplo o mosaico amarelo do nabo, mosaico do "cowpea" e mosaico do Chenopodium (Milne, 1967) e mosaico do feijoeiro do sul (Weintraub & Ragetti, 1970a).

Os ribossomos de células de microorganismos, de vegetais e de animais têm geralmente um diâmetro variável entre 14-30 nm (Huxley & Zubay, 1960; Miller et al., 1966; Shelton & Kuff, 1966), podendo ocasionalmente formar agregados cristalinos como nas células de embrião de galinha (Byers, 1967) ou cristais com estrutura helicoidal, como nos cistos de Entamoeba invadens (Morgan et al., 1968). Contudo, a cristalização de ribossomos parece ser evento raro e em secção ultrafina de tecidos de plantas sadias com controles, no presente caso, não foi observado esse fenômeno.

As vesículas encontradas no citoplasma de feijoeiro e de soja infetados pelo VMDF e nos tecidos de feijão macassar, feijoeiro e C. quinoa infetados pelo VMV devem estar relacionadas com a infecção viral, pois não foram encontradas em tecidos sadios. O complexo de vesículas, ribossomos e dictiosomas observado em secção ultrafina, provavelmente corresponde à massa amorfa identificada ao microscópio de luz nos fragmentos de epiderme de tecidos infetados pelo VMDF. Apesar de as vesículas associadas ao VMDF serem geralmente maiores do que aquelas associadas ao VMV, é provável que elas representem estruturas análogas e essas variações possam ser devidas às diferentes fases da infecção. Genericamente poder-se-ia comparar essas estruturas às cisternas membranosas dos tecidos infetados pelo vírus da poliomielite (Cales et al., 1965), que correspondem a regiões de grande atividade metabólica.

Esse tipo de anomalia não é peculiar apenas

aos tecidos infetados pelo VMDF ou pelo VMV. Agregados de vesículas do mesmo tipo têm sido descritos associados à infecção de vários vírus isométricos, como o do mosaico do feijoeiro do sul (Weintraub & Ragetti, 1970a), mancha anelar latente do morangueiro (Roberts & Harrison, 1970), mosaqueado do morangueiro (Kitajima et al., 1971), mosaico do "cowpea" (van der Scheer & Groenewegen, 1971), "pod mottle" do feijoeiro (Kim & Fulton, 1972), mosaico em enação da ervilha (De Zoeten et al., 1972) e "bushy stunt" do tomateiro (Russo & Martelli, 1972) e de alguns vírus filamentosos, como o do mosaico da beterraba (Fujisawa et al., 1967; Hoefert, 1969), mosaico do "pokeweed" (Kim & Fulton, 1969) mosaico da beterraba anã (Hoefert et al., 1970), mosaico da cenoura (Camargo et al., 1971) e tristeza de citrus (Kitajima et al., 1972).

Apesar do elevado número de trabalhos que relatam vesículas associadas a vírus, pouco se sabe a respeito de sua origem e função. Em nossas observações encontramos frequentemente dictiosomas nas proximidades das vesículas associadas ao VMDF, o que sugere uma relação entre essas estruturas, como foi verificado em tecidos infetados com o vírus do mosaico do "pokeweed" (Kim & Fulton, 1969), mosaico da cenoura (Camargo et al., 1971) e "bushy stunt" do tomateiro (Russo & Martelli, 1972). Também uma relação entre as vesículas e o retículo endoplasmático já foi sugerida em tecidos infetados com o vírus do "bushy stunt" do tomateiro (Kim & Fulton, 1972) e mosaico da beterraba do oeste (Esau & Hoefert, 1972), embora este fato não tenha sido observado com as vesículas associadas à infecção do VMDF ou do VMV.

Krass e Ford (1969) sugerem que as vesículas encontradas em tecidos infetados com o vírus do mosaico da cana e mosaico anão do milho possam se formar "de novo" a partir do RNA viral e, realmente, na luz das vesículas associadas ao vírus amarelo da beterraba (Esau & Hoefert, 1971) e mosaico em enação da ervilha (De Zoeten et al., 1972), ocorrem redes filamentosas semelhantes ao DNA de mitocô -

que as vesículas possam representar o local de síntese do vírus. De Zoeten et al., (1972) sugerem, baseados em testes citoquímicos que as fibrilas observadas nas vesículas associadas ao vírus do mosaico em enação da ervilha, seriam DNA. Nos demais casos não há evidências similares e, nas vesículas associadas ao VMDF e ao VMV, essas fibrilas foram ocasionalmente encontradas.

As vesículas associadas ao VMDF e ao VMV foram encontradas apenas no citoplasma, diferindo das vesículas associadas ao vírus amarelo da beterraba do oeste (Esau & Hoefert, 1972) e ao mosaico da enação da ervilha (De Zoeten et al., 1972) as quais foram observadas também na cavidade perinuclear, ou das vesículas associadas ao mosaico do "cowpea" que ocorrem também no núcleo (van der Scheer & Groenewegen, 1971).

Nos tecidos infetados pelo VMDF foram identificados cristais visíveis ao microscópio de luz e que ao microscópio eletrônico se revelaram serem formados por partículas de vírus. Nos fragmentos de epiderme, esses cristais eram mais conspícuos nas células dos tricomas, devido à ausência de orgânulos citoplasmáticos que pudessem ser confundidos com os cristais. Nas secções espessas de tecidos incluídos em Epon, os cristais puderam ser observados indistintamente nas células da epiderme, mesófilo e região vascular, mostrando que a ocorrência dos cristais associados à infecção é generalizada por toda folha afetada. Esses cristais, porém, não puderam ser identificados em tecidos fixados em glutaraldeído e incluídos em parafina, provavelmente devido à desintegração dos mesmos, durante o processamento subsequente à fixação. Não foi possível também verificar a ação da pepsina sobre esses cristais, pois eles se desagregavam após o tratamento com a solução ácida, com ou sem essa enzima.

Como a presença desses cristais era especificamente associada à infecção pelo VMDF, sua visualização ao microscópio de luz representa uma possibilidade adicional à diagnose das moléstias causadas por esse vírus, principalmente por se tratar de uma técnica simples e rápida que pode ser

electrônico. Dessa maneira, é possível diferenciar o VMDF do mosaico comum do feijoeiro, pois, apesar de ambos causarem sintomas comparáveis nas folhas (Costa et al., 1971), este último não induz a formação de cristais nas células infectadas (Weintraub & Ragetti, 1966; Camargo et al., 1968).

A ocorrência de cristais de vírus intracelulares, contudo, não é peculiaridade única dos tecidos infectados pelo VMDF. Agregados cristalinos de vírus têm sido também descritos em tecidos infectados com outros vírus isométricos como o mosqueado de alcachofra (Russo et al., 1968), mosaico do feijoeiro do sul (Weintraub & Ragetti, 1970a) e mosaico do "bromegrass" (Paliwal, 1970).

Além dos cristais de vírus, foram encontrados nos tecidos infectados pelo VMDF um tipo de inclusão cristalina de origem e natureza desconhecida, mas obviamente associada à infecção viral. Esse tipo de inclusão não ocorre nos tecidos infectados pelo VMV e não existem descrições de inclusões cristalinas de padrões semelhantes, associadas a outros vírus de plantas. Inclusões paracristalinas podem ocorrer no núcleo de algumas espécies de plantas sadias, inclusive no do feijoeiro, sem estarem relacionados com a infecção a vírus (Wergin et al., 1970), mas elas são distintas das associadas ao VMDF.

As inclusões cristalinas não puderam ser visualizadas ao microscópio de luz, provavelmente devido às suas dimensões reduzidas e fraca afinidade aos corantes utilizados. Nas seções ultrafinas, elas podiam ser diferenciadas facilmente do cristal de vírus por terem um contorno menos regular e aparecerem bem menos densas ao feixe de electrons do que os cristais. Inclusões cristalinas com sub-estrutura em arranjos hexagonais, reticular e tubular, conforme o ângulo de seccionamento, semelhantes às do VMDF, foram descritas em cristais de proteínas purificadas de Chloropseudomonas ethylicum, estudadas ao microscópio eletrônico e Raio-X (Olson et al., 1969; Labaw & Olson, 1970).

Dentre as diversas hipóteses para explicar a natureza dessas inclusões cristalinas, a de que elas pode-

riam representar um acúmulo de proteína viral sem o ácido nucleico parece ser a mais razoável. Sua localização em membranas vesículas, de maneira similar aos cristais de vírus, sugere que os mesmos processos citopáticos estariam envolvidos na formação dessas estruturas.

Não se conhecem ainda as relações imunológicas do VMDF com outros vírus isométricos. Costa et al. (1971) sugerem que o VMDF possa pertencer ao grupo do vírus do mosaico do feijoeiro do sul (SBMV), apesar desses vírus apresentarem algumas propriedades físicas in vitro e biológicas diferentes. Em nossos estudos verificamos que o diâmetro das partículas do VMDF são coincidentes com aquelas do SBMV (Price et al., 1946; Labaw & Wickoff, 1957; Edwardson et al., 1966; De Zoeten & Gaard, 1969; Weintraub & Ragetti, 1970a). Intracelularmente as partículas do VMDF ocorrem apenas no citoplasma em arranjos cristalinos, enquanto que as partículas do SBMV - estirpe feijoeiro são encontradas frequentemente esparsas e esporadicamente em arranjos cristalinos no citoplasma e no núcleo (De Zoeten & Gaard, 1969; Weintraub & Ragetti, 1970a) podendo passar através dos poros nucleares do citoplasma para o núcleo ou vice-versa (De Zoeten & Gaard, 1969). Por outro lado, os cristais do VMDF são muito semelhantes aos cristais do SBMV - estirpe "cowpea", com a ressalva de que nunca foram encontrados intranuclearmente, como acontece com esse último (Weintraub & Ragetti, 1970).

As diferenças observadas na distribuição intracelular do VMDF e das demais estirpes do SBMV não são porém maiores do que as descritas entre os vários isolados do SBMV. Assim, parece-nos ainda justificável a hipótese de que o VMDF pertença ao complexo do SBMV.

As inclusões fusiformes, encontradas nos tecidos infectados pelo VMV, parecem estar relacionadas com a infecção deste vírus, já que foram constatadas em tecidos de três espécies diferentes de plantas hospedeiras infectadas pelo VMV, mas não nas sadias, ou afetadas por outros vírus. Os testes de digestão com pepsina indicam que as inclusões fusiformes têm uma constituição proteica. Sua origem, ainda não se acha

tes celulares decorrente da infecção, um excesso de proteína viral organizada de maneira diferente das partículas de vírus, ou ainda um subproduto do processo da infecção. Essas fibrilas parecem ser extremamente lábeis in vitro, pois apesar de numerosas nas hospedeiras, não foram identificadas em preparações "leaf-dip", provavelmente desintegrando-se com o rompimento da célula.

As observações realizadas em tecidos coletados em dias consecutivos, após a inoculação do VMV, indicam que as fibrilas teriam origem no citoplasma, provavelmente associadas ao retículo endoplasmático, surgindo inicialmente como pequenos aglomerados esparsos que aumentam em número e extensão, à medida que a infecção progride, tendendo a formar uma massa única.

As fibrilas associadas à infecção do VMV são bastante distintas de outras formações tubulares, como a proteína-P encontrada no parênquima do floema de plantas saudáveis, ou como os túbulos do corpo-X presentes em tecidos invadidos pelo vírus do mosaico do fumo (Esau & Cronshaw, 1967). As fibrilas associadas à infecção pelo VMV são aparentemente maciças e medem em torno de 10 nm de diâmetro, enquanto que a proteína-P e os túbulos do corpo-X têm um canal axial e medem em torno de 20-30 nm de diâmetro (Esau & Cronshaw, 1967). Individualmente as fibrilas do VMV são semelhantes às aquelas descritas por Kim e Fulton (1972), associadas ao "pod mottle" do feijoeiro. Contudo, as primeiras formam no citoplasma, agregados significativamente maiores que as últimas.

Em decorrência da forma e dimensões peculiares das inclusões fusiformes, elas podem ser facilmente identificadas ao microscópio de luz, representando um teste rápido e eficiente para a diagnose das moléstias causadas pelo VMV, da mesma maneira que os cristais do VMDF.

Uma particularidade notada em tecidos foliares infetados pelo VMV, mas não pelo VMDF, foi a ocorrência de partículas de vírus nos plasmodesmata. Fato semelhante, contudo, já mereceu descrições anteriores, tanto em tecidos de plantas com vírus alongados (Esau et al., 1967), ou vírus

isométricos (De Zoeten & Gaard, 1969; Kitajima & Lauritis, 1969; Lawson & Hearon, 1970; Roberts & Harrison, 1970; Kim & Fulton, 1971). No caso do VMV, os plasmodesmata quando continham partículas, achavam-se usualmente bastante modificados, tomando a forma de túbulos extremamente longos, de diâmetro uniforme, em cuja luz os virions apareciam em uma fila simples ou, ocasionalmente, dupla. O aumento do comprimento do plasmodesma se dava aparentemente graças a um "crescimento" da parede celular junto à abertura do plasmodesma, em um ou ambos os lados da parede celular, de tal modo que esta produzia uma projeção tubular de vários μ m, citoplasma adentro. Esse tipo de alteração é semelhante àquela verificado em tecidos infetados pelo CPMV (van der Scheer & Groenewegen, 1971) e pelo "pod mottle" do feijoeiro (Kim & Fulton, 1971) diferindo, contudo, daqueles observados associados à infecção pelo vírus da mancha anelar do fumo (Davison, 1969) e da mancha anelar latente do morangueiro (Roberts & Harrison, 1970), quando os virions aparecem em formações tubulares que, aparentemente, emergem do plasmodesma.

Com relação ao VMV, a análise de tecidos coletados em dias subsequentes à inoculação mecânica, revelou indícios de uma correlação entre o aumento do comprimento dos plasmodesmata e do número de partículas dentro deles, à medida que se passavam os dias após a infecção, sugerindo que poderia haver síntese ou "montagem" de partículas dentro do plasmodesma. Aliás, idéia semelhante foi esposada por Robert e Harrison (1970) e Kim e Fulton (1971). Seria assim viável que, além de uma passagem passiva das partículas de vírus pelo plasmodesma, conforme indicado nos trabalhos iniciais, demonstrando a ocorrência de virions no plasmodesma (Esau et al., 1967; Kitajima & Lauritis, 1969), poderia haver uma passagem "dinâmica" de partículas de vírus de uma célula infetada para outra sadia, através da formação de partículas na luz do plasmodesma. Assim a própria alongação do plasmodesma pela aparente deposição de material da parede celular junto à sua embocadura, poderia representar uma resposta da célula ao estímulo criado pelo

acúmulo de partículas na luz dos plasmodesmata.

As partículas de vírus e as anomalias associadas à infecção do VMV ocorrem tanto em tecidos com infecção sistêmica como em lesões locais, sendo nestas últimas mais abundantes e numerosas. Apesar das anomalias associadas à infecção ocuparem grande extensão das células, não se notaram profundas alterações nas organelas, e os agregados de mitocôndrias e cloroplastos, encontrados em tecidos com lesão local, devem-se provavelmente à pressão física exercida pela grande massa de fibrilas do citoplasma.

Os estudos de patologia e serologia efetuados com o VMV (Costa et al., 1969; Oliveira et al., 1969) indicam que esse vírus pertence ao complexo do CPMV. As observações ao microscópio eletrônico demonstraram também diversos pontos em comum entre o VMV e o CPMV. Ambos têm partículas associadas ao plasmodesma e induzem o aparecimento de vesículas no citoplasma, mas apenas as do CPMV ocorrem também no núcleo (van der Scheer & Groenewegen, 1971). Em contra-partida as inclusões fusiformes associadas ao VMV, visíveis ao microscópio de luz, não foram identificadas nos tecidos infetados pelo CPMV (Agrawal, 1964; van der Scheer & Groenewegen, 1971), devendo representar uma característica do isolado brasileiro. Frise-se por outro lado que a inclusão fibrilar foi também encontrada em tecidos infetados com o vírus do "pod mottle" do feijoeiro (Kim & Fulton, 1972) o qual se acha distantemente relacionado com o CPMV (Agrawal, 1964).

A visualização de cristais do VMDF e inclusões fibrilares do VMV em células de feijoeiro infetados simultaneamente com esses dois vírus, demonstra que eles podem se multiplicar em uma mesma célula sem que haja interferência entre eles, indicando serem eles vírus distintos. Também demonstra que a alteração celular induzida por cada vírus é suficientemente distinta para permitir a identificação da dupla infecção.

6. CONCLUSÕES

1) As partículas do VMDF e VMV são indistinguíveis morfolologicamente, sendo ambas isométricas, de forma icosaédrica, medindo ca. 25-30 nm de diâmetro. Nas células infectadas, partículas desses vírus podem ser usualmente detectadas quando formam agregados. Também notou-se que em ambos os vírus induzem o aparecimento de numerosas vesículas no citoplasma, provavelmente associadas a síntese das partículas.

2) Apesar do VMDF e do VMV induzirem sintomas de mosaico nas folhas de feijoeiro e terem partículas de morfologia idêntica, a distribuição intracelular desses vírus, bem como as alterações nas células infectadas, são caracteristicamente distintas.

a. O VMDF aparece no citoplasma formando cristais de dimensões avantajadas, detectáveis ao microscópio de luz, os quais podem ser utilizados no auxílio da diagnose da moléstia. Associadas à infecção do VMDF ocorrem também inclusões cristalinas de origem desconhecida, não encontradas em tecidos infectados com outros vírus de plantas. Os cristais do VMDF são semelhantes aos do SBMV-estirpe "cowpea", reforçando a hipótese de que eles pertenceriam ao mesmo grupo.

b. A infecção do VMV induz alterações nos plasmodesmata e a formação de inclusões fibrilares no citoplasma, sendo estas últimas, visíveis ao microscópio de luz. A distribuição intracelular do VMV e as anomalias notadas nas células infectadas apresentam alguns pontos em comum com aquelas descritas para o CPMV, e com o qual está serologicamente relacionados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal, H. O. 1964. Identification of cowpea mosaic isolates. Meded, LandbwHoogesch Wageningen, 64: 1-53.
- Beemster, A. B. R. & J. P. H. van der Want. 1951. Serological investigations on the Phaseolus vulgaris 1 and 2. Antonie van Leeuwenhoek , 17: 285-296.
- Bol, J. F., L. van Vloten-Doting & E. M. J. Jaspars. 1971. A functional equivalence of top component a RNA and coat protein in the inactivation of infection by alfalfa mosaic virus. Virology, 46: 73-85.
- Brandes, J. & L. Quantz. 1955. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Buschbohnenviren (Phaseolus-Virus 1 und Phaseolus Virus 2). Naturwissenschaften, 42: 588.
- Brandes, J. 1957. Eine elektronenmikroskopische schnell Methode zum Nachweis faden- und stäbchenförmiger Viren, insbesondere in Kartoffeldunkelkeimen. Nachr. Bl. dtsh. Pflschdienst (Braunschweig), 9: 151-159.
- Brandes, J. 1964. Identifizierung von gestreckten pflanzenpathogenen Viren auf morphologischer Grundlage. Mitt. biol. BundAnst. Ld.- Forstw., Berlin, 110: 1-130.
- Brenner, S. & R. W. Horne. 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. Biochim. Biophys. Acta, 34: 103-110.
- Bruening, G. & H. O. Agrawal. 1967. Infectivity of a mixture of cowpea mosaic virus ribonucleoprotein components. Virology, 32: 306-320.
- Byers, B. 1967. Structure and formation of ribosome crystals in hypothermic chick embryo cells. J. Mol. Biol., 26: 155-167.

- Camargo, I. J. B., E. W. Kitajima & A. S. Costa. 1968. Estudo ao microscópio eletrônico de tecidos de plantas infectadas pelo vírus do mosaico comum e mosaico amarelo do feijoeiro. *Bragantia*, 27: 409-420.
- Camargo, I. J. B., E. W. Kitajima & A. S. Costa. 1969. Inclusões cristalinas de vírus isodiamétricos que afetam o feijoeiro. *Ciência e Cultura*, 21: 490.
- Camargo, I. J. B., E. W. Kitajima & A. S. Costa. 1971. Microscopia eletrônica de inclusões citoplasmáticas e alterações celulares associadas ao vírus do mosaico da cenoura. *Bragantia*, 30: 31-38.
- Caner, J., K. Silberchmidt & E. Flôres. 1969. Ocorrência do vírus do mosaico da Vigna no Estado de São Paulo. *O Biológico*, 35: 11-16.
- Chant, S. R. 1959. Virus of cowpea, Vigna unguiculata L. (Walp) in Nigeria. *Ann. Appl. Biol.*, 47: 565-572.
- Chant, S. R. 1962. Further studies on the host range and properties of Trinidad cowpea mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.*, 50: 159-162.
- Christie, R. G. 1967. Rapid staining procedures for differentiating plant virus inclusions in epidermal strips. *Virology*, 31: 268-271.
- Corbett, M. K. 1964. Introduction. In: Corbett, M. K. ed. *Plant Virology*. Gainesville, Univ. Florida Press, 1-16.
- Costa, A. S., A. R. Oliveira, E. W. Kitajima & S. Matsuoka. 1969. Ocorrência do mosaico do feijão macassar em São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Fitopat.*, 3: 56-57.
- Costa, A. S., E. W. Kitajima, S. Mayasaka & L. D. Almeida. 1971. Moléstias do feijoeiro causadas por vírus. I. Simpósio Brasil-

- Dale, W. T. 1949. Observations on a virus disease of cowpea in Trinidad. *Ann. Appl. Biol.*, 36: 327-333.
- Dale, W. T. 1953. The transmission of plant viruses by biting insects, with particular references to cowpea mosaic. *Ann. Appl. Biol.*, 40: 384-392.
- Dales, S., H. S. Enggers, I. Tamm & G. E. Palade. 1965. Electron microscopic study of the formation of poliovirus. *Virology*, 26: 379-389.
- Davison, E. M. 1969. Cell to cell movement of tobacco ringspot virus. *Virology*, 37: 694-695.
- De Jager, C. P. & A. van Kammen. 1970. The relationship between the components of cowpea mosaic virus. III. Location of genetic information for two biological functions in the middle component of CPMV. *Virology*, 41: 281-287.
- De Zoeten, G. A. & G. Gaard. 1969. Possibilities for inter- and intracellular translocation of some icosahedral plant viruses. *J. Cell Biol.*, 40: 814-824.
- De Zoeten, G. A., G. Gaard & F. B. Diez. 1972. Nuclear vesiculation associated with pea enation mosaic virus-infected plant tissue. *Virology*, 48: 638-647.
- Diener, T. O. 1965. Isolation of infectious RNA from southern bean mosaic virus. *Virology*, 27: 425-428.
- Edwardson, J. R., D. E. Purcifull & R. G. Christie. 1966. Electron microscopy of two small spherical plant viruses in thin section. *Can. J. Bot.*, 44: 821-830.
- Esau, K., J. Cronshaw & L. L. Hoefert. 1967. Relation of beet yellows virus to the phloem and to movement in the sieve tube. *J. Cell Biol.*, 32: 71-87.

- Esau, K. & J. Cronshaw. 1967. Tubular components in cells of healthy and tobacco mosaic virus-infected *Nicotiana*. *Virology*, 33: 26-35.
- Esau, K. & L. L. Hoefert. 1971. Cytology of beet yellows virus infection in *Tetragonia*. I. Parenchyma cells in infected leaf. *Protoplasma*, 72: 255-273.
- Esau, K. & L. L. Hoefert. 1972. Development of infection with beet western yellows virus in the sugarbeet. *Virology*, 48: 724-738.
- Fujisawa, I., C. Matsui & A. Yamaguchi. 1967. Inclusion bodies associated with sugar beet mosaic. *Phytopathology*, 57: 210-213.
- Fulton, R. W. 1967. Purification and some properties of tobacco streak and Tulare apple mosaic viruses. *Virology*, 32: 153-162.
- Geelen, J. L. C., A. van Kammen & J. M. Verduin. 1972. Structure of the capsid of cowpea mosaic virus. The chemical subunit: molecular weight and number of subunits per particle. *Virology*, 49: 205-213.
- Ghabrial, A. A., R. J. Shepherd & R. G. Grogan. 1967. Chemical properties of three strains of southern bean mosaic virus. *Virology*, 33: 17-25.
- Grogan, R. G. & K. A. Kimble. 1964. The relationship of severe bean mosaic from Mexico to southern bean mosaic virus and its related strain in cowpea. *Phytopathology*, 54: 75-78.
- Herrmann, R. G. & K. V. Korvallik. 1970. Selective presentation of RNA - regions and membranes in chloroplast and mitochondri. *J. Cell Biol.*, 45: 196-202.

- Hibben, C. R. & R. E. Bozarth. 1972. Identification of anash strain of tobacco ringspot virus. *Phytopathology*, 62: 1023-1029.
- Hoefert, L. L. 1969. Proteinaceous and virus - like inclusions in cells infected with beet mosaic virus. *Virology*, 37: 498-501.
- Hoefert, L. L., S. E. Duffus & K. Esau. 1970. Electron microscopy of Beta leaves infected with beet yellow stunt virus. *Virology*, 42: 814-824.
- Huxley, H. E. & G. Zubay. 1960. Electron microscope observations on the structure of microsomal particles from Escherichia coli. *J. Mol. Biol.*, 2: 10-18.
- Karnovsky, M. J. 1961. Simple methods for staining with lead at high pH in electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 11: 729-732.
- Kim, K. S. & J. P. Fulton. 1969. Electron microscopy of pokeweed leaf cells infected with pokeweed mosaic virus. *Virology*, 37: 814-824.
- Kim, K. S. & J. P. Fulton. 1971. Tubules with viruslike particles in leaf cells infected with bean pod mottle virus. *Virology*, 43: 329-337.
- Kim, K. S. & J. P. Fulton. 1972. Fine structure of plant cells infected with bean pod mottle virus. *Virology*, 49: 112-121.
- Kitajima, E. W. 1965. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. *J. Electronmicroscopy (Tokyo)*, 14: 119-121.
- Kitajima, E. W. & J. A. Lauritis. 1969. Plant virions in plasmodesmata. *Virology*, 37: 681-685.

- Kitajima, E. W., J. A. Betti & A. S. Costa. 1971. Isometric virus-like particles in leaf tissues of Fragaria Vesca L. infected with strawberry mottle virus. Ciência e Cultura, 23: 649-655.
- Kitajima, E. W., G. Muller & A. S. Costa. 1972. Electron microscopy of tristeza- infected Passiflora gracilis Jacq. Proc. 6th Conf. Int. Org. Citrus Virologists. (in press).
- Kitajima, E. W., I. J. B. Camargo, T. Yano & A. S. Costa. 1973. Purificação parcial do vírus do mosaico em desenho do feijoeiro. VI Congresso da SBF, Pelotas, RS.
- Krass, C. S. & R. E. Ford. 1969. Ultrastructure of corn systemically infected with maize dwarf mosaic virus. Phytopathology, 59: 431-439.
- Labaw, L. W. & R. W. G. Wyckoff. 1957. The structure of southern bean mosaic virus protein crystals. Arch. Biochem. Biophys., 67: 225-236.
- Labaw, L. W. & R. A. Olson. 1970. Further electron microscopic observations of bacteriochlorophyll protein crystals. J. Ultrast. Res., 31: 456-464.
- Lauffer, M. A., N. W. Taylor & C. C. Wunder. 1952. The influence of the composition of the medium upon the sedimentation rate of proteins. I. Studies on southern bean mosaic virus protein. Arch. Biochem. Biophys., 40: 453-471.
- Lawson, R. H. & S. Hearon. 1970. Subcellular localization of chrysanthemum aspermy virus in tobacco and chrysanthemum leaf tissue. Virology, 41: 30-37.
- Lister, R. M. 1966. Possible relationships of virus specific products of tobacco rattle virus infections. Virology, 28: 350-353.

- Luft, J. H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol., 9: 409-414.
- MacWhorter, F. P. 1941. Plant virus differentiation by trypan blue reactions within infected tissue. Stain Technol., 16: 143-149.
- MacWhorter, F. P. 1965. Plant virus inclusions. Ann. Rev. Phytopathol., 3: 387-312.
- Magdoff-Fairchild, B. 1967. Electrophoretic and buoyant density variants of southern bean mosaic virus. Virology, 31: 142-153.
- Markham, R. 1962. The analytical ultracentrifuge as a tool for investigation of plant viruses. Adv. Virus Res., 9: 241-270.
- Miller, G. L. & W. C. Price. 1946. Physical and chemical studies of southern bean mosaic virus. I. Size, shape, hydration and elementary composition. Archs. Biochem., 10: 467-477.
- Miller, A. , W. Karlsson & N. K. Boardman. 1966. Electron microscopy of ribosomes isolated from tobacco leaves. J. Mol. Biol., 17: 487-489.
- Milloning, G. 1964. Studio sui fattori che determinano la preservazione della ultrastruttura. In: From molecule to cell. Symposium on Electron Microscopy. P. Buffa, ed. Roma, pp. 347-362.
- Milne, R. G. 1967. Electron microscopy of leaves infected with sowbane mosaic virus and other small polyhedral viruses. Virology, 32: 589-600.

- Morgan, R. S., H. S. Slayter & D. L. Weller. 1968. Isolation of ribosomes from cysts of Entamoeba invadens. J. Cell Biol., 36: 45-51.
- Niblett, C. L. & J. S. Semancik. 1969. Conversion of the electrophoretic forms of cowpea mosaic virus in vivo and in vitro. Virology, 38: 685-693.
- Oliveira, M. A. 1947. Contribuição ao estudo dos vírus causadores do mosaico no feijão macassar (Vigna spp). Instituto Agrônômico do Sul (Pelotas). Bol. Tec., 1: 1-35.
- Oliveira, A. R., A. S. Costa & I. J. B. Camargo. 1969. Purificação e serologia do vírus do mosaico da Vigna. Rev. Soc. Bras. Fitop., 3: 26-28.
- Olson, R. A., W. H. Jennings & C. H. Hanna. 1969. paracrystalline aggregates of bacteriochlorophyll protein from green photosynthetic bacteria. Arch. Biochem. Biophys., 130: 140-147.
- Paliwal, Y. C. 1970. Electron microscopy of bromegrass mosaic virus in infected leaves. J. Ultrast. Res., 30: 491-502.
- Price, W. C., R. C. Williams & R. W. G. Wyckoff. 1945. The electron micrography of crystalline plant viruses. Science, 102: 277-278.
- Price, W. C. 1946. Purification and crystallization of southern bean mosaic virus. Can. J. Bot., 33: 45-54.
- Price, W. C., R. C. Williams & R. W. G. Wyckoff. 1946. Electron micrographs of crystalline plant viruses. Archs. Biochem., 9: 175-185.
- Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 17: 208-213.

- Richardson, N. K., L. Jarret & E. H. Finke. 1960. Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol.*, 35: 313-323.
- Roberts, I. M. & B. D. Harrison. 1970. Inclusion bodies and tubular structures in Chenopodium amaranticolor plants infected with strawberry latent ringspot virus. *J. Gen. Virol.*, 7: 47-54.
- Russo, M., G. P. Martelli & A. Quacquarelli. 1968. Studies on the agent of artichoke mottled crinkle. IV. Intracellular localization of the virus. *Virology*, 34: 679-693.
- Russo, M. & G. P. Martelli. 1972. Ultrastructural observations on tomato bushy stunt virus in plant cells. *Virology*, 49: 122-129.
- Sabatini, D. D., K. Bensch & R. J. Barnett. 1963. Cytochemistry and electron microscopy. The preservations of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixative. *J. Cell Biol.*, 17: 19-58.
- Schneider, I. R. & J. F. Worley. 1959a. Upward and downward transport of infections particles of southern bean mosaic virus through steamed portions of bean stems. *Virology*, 8: 230-242.
- Schneider, I. R. & J. F. Worley. 1959b. Rapid entry infections particles of southern bean mosaic virus into living cells following transport of particles in water stream. *Virology*, 8: 243-249.
- Semancik, J. S. 1966. Studies on electrophoretic heterogeneity in isometric plant viruses. *Virology*, 30: 698-704.
- Shelton, E. & E. L. Kuff. 1966. Substructure and configuration of ribosomes isolated from mammalian cells. *J. Mol. Biol.*, 22: 23-26.

- Shepherd, R. J. & R. W. Fulton. 1962. Identity of a seed-borne virus of cowpea. *Phytopathology*, 52: 489-493.
- Shepherd, R. J. 1964. Properties of a mosaic virus of cowpea and its relationship of bean pod mottle virus. *Phytopathology*, 54: 466-473.
- Smith, C. E. 1924. Transmission of cowpea mosaic by bean-leaf beetle. *Science, N. S.*, 60: 268-270.
- Smith, K. M. & R. C. Williams. 1958. Insect virus and their structure. *Endeavor*, 17: 12-21.
- Tremaine, J. H. 1966. The amino acid and nucleotide composition of the bean and cowpea strains of southern bean mosaic virus. *Virology*, 30: 348-353.
- van der Scheer, C. & J. Groenewegen. 1971. Structures in cells of Vigna unguiculata infected with cowpea mosaic virus. *Virology*, 46: 493-497.
- van Kammen, A. 1967. Purification and properties of the components of cowpea mosaic virus. *Virology*, 31: 633-644.
- van Kammen, A. 1968. The relationship between the components of cowpea mosaic virus. I. Two ribonucleoprotein particles necessary for infection. *Virology*, 34: 312-318.
- Vital, A. F., T. J. G. Loreto, J. A. Lima, S. Krutman & R. H. Fulton. 1969. Mosaicos dos feijões macassar - Vigna sinensis em Pernambuco. *Rev. Soc. Bras. Fitop.*, 3: 43-44.
- Walkey, D. G. A. & M. J. W. Webb. 1970. Tubular inclusion bodies in plants infected with viruses of the NEPO type. *J. Gen. Virol.*, 7: 159-166.
- Watson, M. L. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem.*

- Weintraub, M. & H. W. J. Ragetti. 1968. Fine structure of inclusions and organelles in Vicia faba infected with bean yellow mosaic virus. Virology, 28: 290-302.
- Weintraub, M. & H. W. J. Ragetti. 1970a. Electron microscopy of bean and cowpea strains of southern bean mosaic virus within leaf cells. J. Ultrast. Res., 32: 167-189.
- Weintraub, M. & H. W. J. Ragetti. 1970b. Identification of the constituents of southern bean mosaic virus in crystals of infected cells and their distribution within the virion. Virology, 41: 729-739.
- Wergin, W. F., P. J. Gruber & E. H. Newcomb. 1970. Fine structural investigation of nuclear inclusions in plants. J. Ultrast. Res., 30: 533-557.
- Wood, H. A. & J. B. Bancroft. 1965. Activation of a plant virus by related incomplete nucleoprotein particles. Virology, 27: 94-102.
- Wu, G. & G. Bruening. 1971. Two proteins from cowpea mosaic virus. Virology, 46: 596-612.
- Yerkes, W. D. & G. Patino. 1960. The severe bean mosaic virus, a new bean virus from Mexico. Phytopathology, 50: 334-338.
- Zaumeyer, W. J. & L. L. Harter. 1943. Two new viruses diseases of beans. J. Agric. Res., 67: 305-328.