

OCORRÊNCIA E ESTUDOS ELECTRONO-MICROSCÓPICOS DO VÍRUS DO  
MOSAICO DO TRIGO, TRANSMITIDO PELO SOLO, NO ESTADO DO  
RIO GRANDE DO SUL<sup>1</sup>

VANDERLEI R. CAETANO,<sup>2</sup> E.W. KITAJIMA<sup>3</sup> & A.S. COSTA<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Centro Nacional de Pesquisa do Trigo, EMBRAPA, 99100 – Passo Fundo, RS,

<sup>2</sup> Depto. Biol. Cel., Univ. Brasília, 70.000 – Brasília, DF e <sup>3</sup> S. Virologia, Inst.

Agrônomo, 13100 – Campinas, SP

(Aceito para publicação em 22/11/77)

RESUMO

Uma moléstia de trigo caracterizada por sintomas de mosaico ocorre de maneira generalizada nos trigais do Estado do Rio Grande do Sul. Sua disseminação natural se dá através do solo, associada ao fungo *Polymyxa graminis* Led. A hipótese de que esta anomalia seria causado pelo vírus do mosaico do trigo, transmitido pelo solo, baseada em sintomatologia e disseminação pelo solo, foi corroborada pelas evidências obtidas através de testes de transmissão mecânica, pelo solo e pelos lavados de raiz, propriedades físicas *in vitro* do agente etiológico, bem como dos estudos sobre a morfologia de bastonetes associadas à infecção e a ultraestrutura dos tecidos afetados.

(Fitopatologia Brasileira 3:39 – 46. 1978)

ABSTRACT

**The occurrence and electron microscopy of the soil-borne wheat mosaic virus at the State of Rio Grande do Sul, Brazil**

A disease of wheat, characterized by mosaic symptoms of the leaves, is widespread in the culture of this cereal throughout the State of Rio Grande do Sul, Brazil. This condition

1 Estes trabalhos foram realizados quando o autor principal se achava no Inst. Pesq. Agropec. Sul, Pelotas, RS, e recebeu auxílios financeiros do FECOTRIGO, FAPESP e CNPq; apresentado durante o X Cong. Soc. Bras. Fitopatologia (Recife, PE; Fevereiro/77).

4 Bolsista do CNPq (Pesquisador-conferencista).

is transmitted through the soil in the nature, being associated with the presence of the soil fungus *Polymyxa graminis*.

The hypothesis that this disease is caused by the soil-borne wheat mosaic virus, based on symptomatology and dissemination associated with the soil, was confirmed by transmission testes (mechanical, soil and root washings), physical properties *in vitro* of the pathogen, morphology of the rodlike particles found associated with the disease, as well as the ultrastructure of the affected cells.

(Fitopatologia Brasileira 3:39 – 46. 1978)

## INTRODUÇÃO

Embora o trigo seja cultivado há décadas no Brasil, principalmente nos estados do sul do país, só recentemente algumas viroses foram reconhecidas afetando este cereal: um amarelecimento generalizado, causado pelo vírus do nanismo amarelo da cevada (barley yellow dwarf), já bastante disseminado no sul do país, e causando sérios prejuízos (Caetano, 1972) e a “espiga branca” (Caetano *et al.*, 1970), causada por um vírus transmitido por cigarrinha (Costa *et al.*, 1973) e possivelmente pertencente ao grupo do vírus da “hoja blanca” do arroz (Kitajima *et al.*, 1971). Uma nova anomalia de possível etiologia viral foi recentemente verificada num lote experimental, no Centro de Pesq. Agrop. Cerrado, no Distrito Federal, caracterizada por um mosaico estriado e associada a partículas do tipo rhabdovírus (Kitajima *et al.*, 1976).

Uma outra enfermidade, tida como de causa viral, começou a preocupar os triticultores a partir de fins da década dos 60, representada por sintomas de mosaico nas folhas, e cuja disseminação estaria associada ao solo. Observações preliminares indicaram estar esta forma de mosaico bastante disseminada no Estado do Rio Grande do Sul, causando mesmo certos prejuízos (Caetano *et al.*, 1971; Prestes *et al.*, 1972). Constatou-se, por outro lado, a ocorrência do fungo *Polymyxa graminis* Led., no sistema radicular das plantas afetadas (Caetano *et al.*, 1971; Pierobom *et al.*, 1972).

Esses dados iniciais sugeriram que esta anomalia seria causada pelo vírus do mosaico do trigo, transmitido pelo solo (soil-borne wheat mosaic virus) descrito inicialmente nos Estados Unidos (McKinney, 1925) e que também acha-se descrito na Itália e no Japão (vide Brakke, 1971).

O presente artigo relata os resultados de uma série de estudos realizados visando confirmar esta hipótese.

## MATERIAL E MÉTODOS

*Fonte de inóculo:* esta constituiu-se de plantas de campo, ostentando sintomas típicos (Figs. 1 e 2) e do solo, proveniente da mesma área aonde a planta fora recolhida.

*Plantas teste:* utilizaram-se como planta indicadoras, nos testes de transmissão, as seguintes variedades de trigo: ‘IAS-51’, ‘Toropi’ e ‘Lagoa Vermelha’.

*Testes de transmissão:* (a) **transmissão mecânica** – o inóculo constituiu-se do suco de folhas com sintomas típicos de mosaico, extraído em presença de tampão fosfato pH 8, 0,1M (1:1 p/v), o qual era esfregado nas folhas das plantas indicadoras, previamente polvilhadas com carborundo; (b) **Transmissão com lavados de raiz** – essencialmente empregou-se a técnica descrita por Brakke & Rao (1967). Cinquenta sementes foram postas a germinar numa placa de Petri forrada com papel filtro umedecido. Dois dias após a germinação adicionaram-se 30ml do lavado de raiz, o qual era mantido na placa durante 24hs. a 5°C. Após este período, as mudi-



nhas eram transplantadas em vasos contendo solo esterilizado, fazendo-se a leitura dos sintomas periodicamente. Numa outra alternativa, as variedades indicadoras eram semeadas em vaso com 2/3 de areia e 1/3 solo, ambos esterilizados. Quatro dias após a semeadura, o vaso foi regado com lavado de raiz, mantendo-se a seguir esses vasos a 50°C, durante dois dias. Os lavados de raiz, utilizados nestes ensaios, foram obtidos do sistema radicular das plantas afetadas, enxaguadas em água destilada por 30 minutos à temperatura ambiente, após uma lavagem prévia em água corrente; (c) **transmissão pelo solo** — sementes das plantas indicadoras foram semeados em solos provenientes dos locais de onde foram recolhidas as plantas com mosaico, tendo sido os vasos mantidos em condições de casa-de-vegetação (18–30°C) ou naturais (5–10°C).

*Determinação das propriedades físicas in vitro do patógeno:* (a) **ponto final de diluição** — o inóculo original foi diluído a  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , e a seguir inoculado mecanicamente nas plantas indicadoras; (b) **ponto de inativação térmica** — numa primeira série, o inóculo foi aquecido por 10 minutos a 30, 40, 50, 60 e 70°C, e a seguir inoculado. Numa outra série, as temperaturas usadas foram 60, 65 e 70°C.

Todos estes testes acima citados foram conduzidos no IPEAS, Pelotas, RS. *Microscopia eletrônica:* (a) **preparações “leaf dip”** — amostras de folhas de plantas com sintomas de mosaico no campo, ou exibindo-os após serem inoculadas experimentalmente com material procedente de plantas afetadas, foram colhidas e acondicionadas em sacos plásticos e levadas à S. Virologia, Inst. Agrônomo de Campinas, SP. Preparações rápidas para exame ao microscópio eletrônico foram feitas pela técnica de “leaf dip”, metalizadas ou contrastadas negativamente, para detecção de eventuais partículas virais; (b) **exames histológicos** — pequenos fragmentos do tecido foliar de plantas afetadas e sadias, controle, foram fixadas em glu-

taraldeído a 3% em tampão fosfato 0,04M, pH 7,2, pós-fixados com solução a 1% de OsO<sub>4</sub>, em tampão fosfato 0,15M, incluídos em Epon, seccionados e examinados. Os trabalhos de microscopia eletrônica foram feitas em um microscópio eletrônico Elmiskop I, da Siemens.

## RESULTADOS

Dez a 25% das plantas inoculadas mecanicamente, com suco extraído de plantas com sintomas de mosaico, exibiram os primeiros sintomas 20–25 dias após a inoculação. Houve uma redução da infecção da ordem de 43% quando o suco foi diluído a 1:10 em relação ao inóculo original, e quando a diluição foi de 1:100 não se verificou transmissão. Com sucos aquecidos a 60°C, em dois testes, a taxa de transmissão foi de 2 a 5%, respectivamente, enquanto a 65°C aquela foi nula.

Em inoculações feitas com lavado de raiz os sintomas levaram 25–30 dias para se manifestarem. Em leituras feitas 40 dias após a inoculação, nas experiências realizadas em placas de Petri, aonde foram germinadas as sementes, a eficiência da transmissão verificada foi de 50–80%. Contudo, em inoculações com lavados de raiz, em plântulas desenvolvidas, no vaso, a eficiência foi menor, variando de 30–60%. A taxa de transmissão do mosaico, quando houve a semeadura em solo contaminado, por outro lado, foi muito alta, atingindo mesmo 100%, principalmente quando a planta foi mantida fora da casa-de-vegetação. Dentro desta, porém, a transmissão foi sensivelmente menor, nunca ultrapassando a 10%.

Quanto aos sintomas, sua manifestação sempre se iniciava pelas folhas em fase de desenvolvimento. Há inicialmente o aparecimento de algumas poucas estrias cloróticas de 1 mm x 3–4 mm. Conforme as condições ambientais e da variedade do trigo, como no caso do ‘IAS-51’, estas estrias se tornam mais maiores e de bordos irregulares. Nas variedades

des 'Lagoa Vermelha' e 'Toropi', isto já não ocorria, nelas surgindo sintomas típicos de mosaico (Fig. 2). As plantas inoculadas, em geral, perfilham intensamente assumindo frequentemente a forma de roseta. No caso de variedades mais susceptíveis como a 'IAS-51', se a infecção for precoce, não há granação. Em outras mais tolerantes, como a 'Lagoa Vermelha' e 'Toropi', as plantas apesar de exibirem sintomas podem se desenvolver quase normalmente (Fig. 1) embora haja drástica redução na produção de grãos.

Preparações "leaf dip" de plantas de trigo ostentando sintomas típicos da moléstia, após inoculação experimental ou em condições de campo, apresentavam consistentemente partículas em forma de bastonetes de ca. 20nm em diâmetro (Fig. 3). O histograma da distribuição dos comprimentos das partículas exibiu duas classes modais: uma entre 150 e 20nm, e outra nas proximidades de 300nm (a calibração da magnificação foi feita usando-se a réplica de grade de difração de 2.140 linhas/mm e também medindo-se as partículas do vírus do mosaico do fumo). Tais bastonetes não foram detectados em preparações similares feitas de plantas sadias.

O exame de secções ultrafinas, de tecido foliar de trigo mostrando sintomas típicos de mosaico, revelou a frequente ocorrência de partículas aparentemente rígidas, 15–18nm em diâmetro e de comprimento variável, provavelmente em função do ângulo de seccionamento, e espalhadas ao acaso no citoplasma (Figs. 4–6), e que devem representar os bastonetes encontrados nas preparações "leaf dip" *in situ*. Elas ocorriam em praticamente todos os tipos de células foliares, inclusive nos vasos crivados e lenhosos (Fig. 7). Inclusões, de certa densidade eletrônica, aparentemente constituída de elementos tubulares convolutos, 30–40nm em diâmetro, formando um emaranhado de dimensões variadas, foram frequentemente notadas nas imediações da área citoplasmática contendo os bastonetes (Figs. 4 e 5).

Ocasionalmente, pequenos cristais, exibindo uma periodicidade de 5–7nm, ocorriam no citoplasma (Fig. 6). Os cloroplastos geralmente apareciam normais, mas às vezes apresentavam-se com sinais de degenerescência, caracterizada por um estroma menos denso e desorganização do sistema lamelar, além da presença de numerosos glóbulos electrónicos. O núcleo, por outro lado, exibiu ocasionalmente uma condensação exagerada de seu material cromático (Fig. 5).

Em tecidos de folhas de plantas sadias, essas anomalias não puderam ser constatadas.

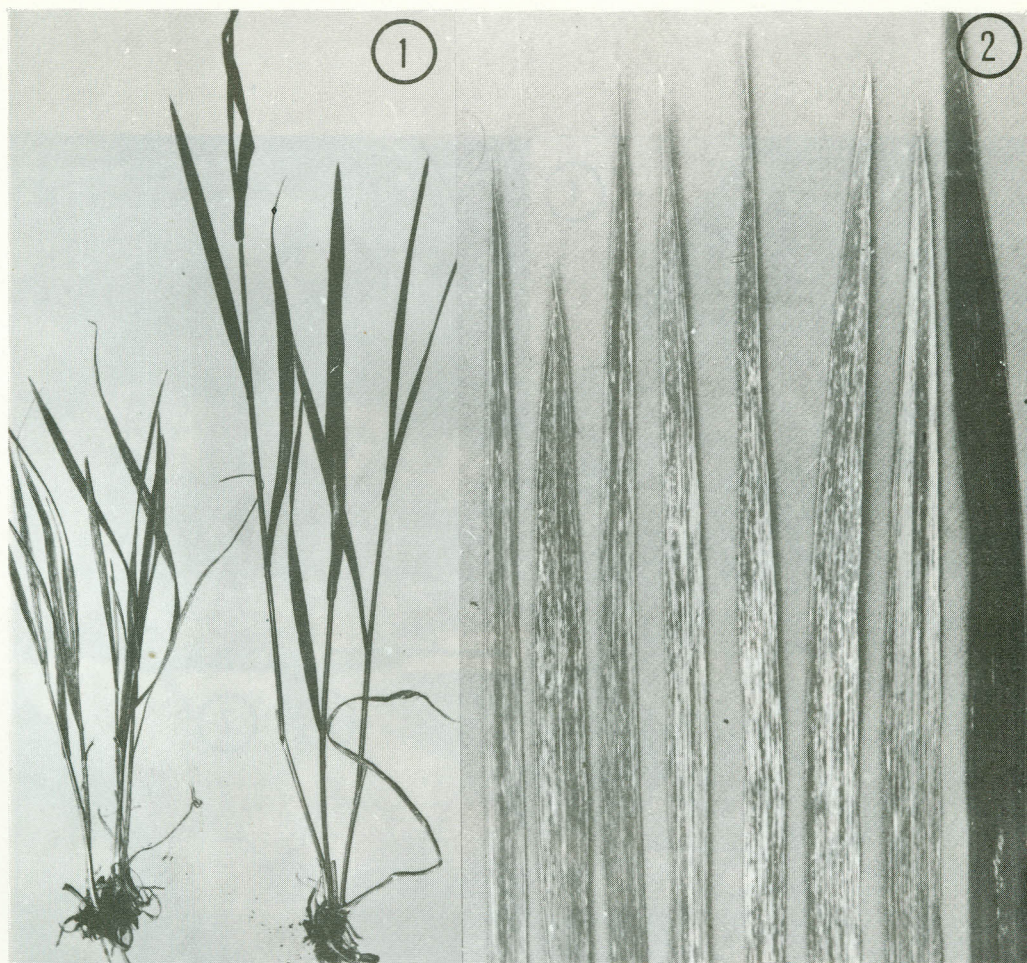
## DISCUSSÃO

A soma das evidências até agora coligadas indicam, com relativa margem de segurança, que o mosaico verificado afetando de uma maneira generalizada a cultura do trigo no Estado do Rio Grande do Sul, seria causado pelo vírus do mosaico do trigo, transmitido pelo solo (VMT).

A sintomatologia nas plantas infetadas, natural ou artificialmente, a transmissibilidade do agente causal por métodos mecânicos, pelo solo contaminado ou ainda pelos lavados de raízes de plantas afetadas, e as propriedades físicas *in vitro* determinadas (ponto final de diluição e de inativação térmica) são similares àquelas descritas para o VMT nos Estados Unidos, Japão e Itália (Brakke, 1971).

Confirmando as similaridades nas propriedades biológicas, os exames ao microscópio eletrônico de preparações "leaf dip" constataram a presença de partículas em forma de bastonetes, 20nm em diâmetro e com 2 comprimentos modais: uma entre 150 e 200nm e outra a cerca de 300nm, à semelhança do que foi descrito para o VMT (Brandes *at al.*, 1964). Ensaios de purificação tem demonstrado que estes bastonetes representam as partículas do VMT (Gumpf, 1971; Tsuchizaki *et al.*, 1973). Gumpf (1971) havia verificado que a infetividade do VMT





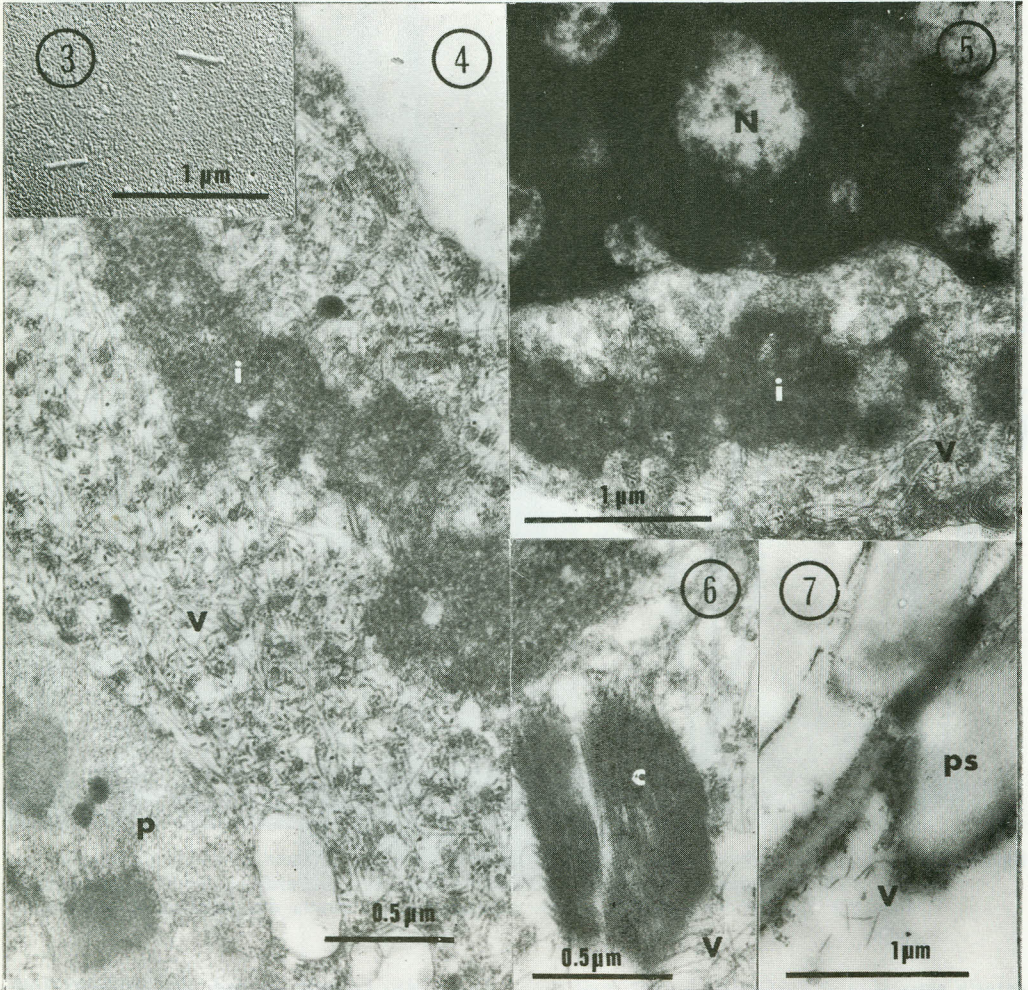
**Figuras 1 e 2.** Sintomas exibidos pelas plantas de trigo, var. 'Toropi', afetadas pelo vírus do mosaico do trigo (VMT). **Figura 1.** Aspecto geral da planta infetada à esquerda (à direita, planta sadia). **Figura 2.** Detalhe dos sintomas foliares; a última folha, à direita, é procedente de uma planta sadia.

estaria associada às partículas longas, mas recentemente Tsuchizaki *et al.* (1975) puderam demonstrar que os dois tipos de partículas, curtas e longas, seriam necessários para iniciar a infecção, constituindo-se assim o VMT em mais um caso de sistema multicomponente (Jaspers, 1974).

As alterações ultraestruturais das células de folhas infetadas pelo VMT no Esta-

do do Rio Grande do Sul, são também similares àquelas descritas para a infecção pelo VMT nos Estados Unidos e no Japão (Peterson, 1970; Hibino *et al.*, 1974a, b). Foram encontradas inclusões citoplasmáticas formadas de túbulos convolutos, às quais Hibino e Saito (1976) puderam associar atividade de diaforase. Embora partículas VMT fossem encontradas dispersas no citoplasma, não se verificou sua ocorrência no vacúolo,





**Figura 3.** Micrografia eletrônica de uma preparação "leaf dip" metalizada com crômio, mostrando partículas em forma de bastonete, do VMT.

**Figuras 4 a 7.** Micrografias eletrônicas de seções ultrafinas de tecido foliar de trigo infetado pelo VMT. **Figura 4.** Parte do citoplasma de uma célula do parenquima palisádico, exibindo um grande número de partículas do vírus (*V*), além da inclusão (*i*) constituída de material tubular convoluto. *p* – cloroplasto; **Figura 5.** Detalhe de uma zona citoplasmática adjacente ao núcleo (*N*), contendo grande número de partículas do VMT (*V*) e a inclusão (*i*). Nota-se que a cromatina do núcleo acha-se condensada. **Figura 6.** Uma inclusão cristalina (*c*) no citoplasma. Partículas do VMT (*V*) ocorrem ao seu redor. **Figura 7.** Detalhe de um vaso lenhoso, mostrando partículas do VMT (*V*) em seu interior. *ps* – parede secundária.



ou formando agregados, como descrito por Hibino *et al.* (1974a, b). Os ocasionais cristais citoplasmáticos são idênticos àqueles relatados por Peterson (1970) e Hibino *et al.* (1974a). Estes sugeriram que tais cristais constituíssem material normal das células foliares de trigo, porquanto eles constataram sua presença em tecido sadio. Contudo, no presente caso, foram eles notados apenas em tecidos infetados.

O fungo *Polymyxa graminis*, identificado como vector do VMT (Rao & Brakke, 1969), acha-se presente nos solos aonde ocorria o mosaico do trigo no Estado do Rio Grande do Sul (Caetano *et al.*, 1971; Pierobon *et al.*, 1972). Não há, contudo, até agora,

dados experimentais definitivos sobre o envolvimento de *P. graminis* como vector, embora as evidências circunstanciais, como a transmissão pelos lavados de raiz, e pelo solo, sejam bastante sugestivos.

Não sendo o VMT transmissível pela semente (Brakke, 1971) torna-se difícil explicar sua presença no sul do Brasil, uma vez que o trigo não é planta nativa da região, bem como, provavelmente, o VMT. A introdução de planta viva, contaminada, ou de solos contaminados, mesmos dessecados, nos quais McKinney (1937, citado em Brakke, 1971) menciona que o patógeno possa sobreviver, representariam duas das possibilidades para explanação do evento.

#### LITERATURA CITADA

- BRAKKE, M.K. Soil-borne wheat mosaic virus. C.M.I/A.A.B. Descriptions of Plant Viruses. nº 77. 1971.
- BRAKKE, M.K. & RAO, A.S. Maintenance of soil-borne wheat mosaic virus by transfer through soil washings. Plant Dis. Repr. 51:1005-1008. 1967.
- BRANDES, J., PHILLIPPE, M.R. & THORNBERRY, H.H. Electron microscopy of particles associated with soil-borne wheat mosaic. Phytopathol. Z. 50: 181-190. 1964.
- CAETANO, V.R. Estudos sobre o vírus do nanismo amarelo da cevada, em trigo, no Rio Grande do Sul. Tese para obtenção do grau de Doutor. Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, U.S.P. (mimeog.). 75 p. 1972.
- CAETANO, V.R., KITAJIMA, E.W. & COSTA, A.S. Espiga branca do trigo, uma possível moléstia do vírus. Bragantia 29: XLI-XLIV. 1970.
- CAETANO, V.R., PIEROBOM, C.R., LUZZARDI, C.G. & PRESTES, A.M. Mosaico do trigo começa a causar problema. Indicação da Pesquisa XIII. Inst. Pesq. Agropec. Sul, DNPEA, Minist. Agric. (mimeog.). 2 p. 1971.
- COSTA, A.S., CAETANO, V.R. & KITAJIMA, E.W. Transmissão da espiga branca do trigo por cigarrinha. Res. 6º Cong. Soc. Bras. Fitopatologia (Pelo-tas). 1973.
- GUMPF, D.J. Purification and properties of soil-borne wheat mosaic virus. Virology 43:586-596. 1971.
- HIBINO, H. & SAITO, Y. Diaphorase activity located in inclusions induced by soil-borne wheat mosaic virus. Virology 72:421-428. 1976.
- HIBINO, H., TSUCHIZAKI, T. & SAITO, Y. Comparative electron-microscopy of cytoplasmic inclusions induced by 9 isolates of soil-borne wheat mosaic virus. Virology 57:510-521. 1974a.

- HIBINO, H., TNUCHIZAKI, T. & SAITO, Y. Electron microscopy of inclusion development in rye leaf cells infected with soil-borne wheat mosaic virus. *Virology* 57:522-530. 1974b.
- JASPARS, E.M.J. Plant viruses with a multipartite genome. *Adv. Virus Res.* 19: 37-149. 1974.
- KITAJIMA, E.W., CAETANO, V.R. & COSTA, A.S. Inclusões intracelulares associadas à espiga branca do trigo. *Bragantia* 30:CI-CVIII. 1971.
- KITAJIMA, E.W., CUPERTINO, F.P. & CAETANO, V.R. Partículas do tipo rhabdovirus associadas à manchas cloróticas em trigo, no Distrito Federal. Res. 9º Cong. Soc. Bras. Fitopat. (Campinas). 1976.
- MCKINNEY, H.H. A mosaic disease of winter wheat and winter rye. U.S. Dept. Agric. Bull. 1361, 10 p. 1925.
- PETERSON, J.F. Electron microscopy of soil-borne wheat mosaic virus in host cells. *Virology* 42:304-310. 1970.
- PIEROBOM, C.R., LUZZARDI, G.C. & CAETANO, V.R. Ocorrência de *Polymyxa graminis* Led. em trigo no Rio Grande do Sul. Res. 5º Cong. Soc. Bras. Fitopatologia (Fortaleza). 1972.
- PRESTES, A.M., CAETANO, V.R., CAETANO, VESLEI R., LINHARES, A.G., MEDEIROS, M.C., LANGER, F.A., DOTTO, S.R., ROSA, O.S., SOUSA, C.N.A., GOMES, E. & SANTIAGO, J.C. Levantamento da ocorrência de mosaico do trigo no Rio Grande do Sul em 1971. Res. 5º Cong. Soc. Bras. Fitopatologia (Fortaleza). 1972.
- RAO, A.S. & BRAKKE, M.K. Relation of soil-borne wheat mosaic virus and its fungal vector, *Polymyxa graminis*. *Phytopathology* 59:581-587. 1969.
- TSUCHIZAKI, T., HIBINO, H. & SAITO, Y. Comparisons of soil-borne wheat mosaic virus isolates from Japan and the United States. *Phytopathology* 63:634-639. 1974.
- TSUCHIZAKI, T., HIBINO, H. & SAITO, Y. The biological functions of short and long particles of soil-borne wheat mosaic virus. *Phytopathology* 65: 523-532. 1975.