

A OCORRÊNCIA DE "PONTOS DE QUEBRA PREFERENCIAIS" EM VÍRUS ALONGADOS

THE OCCURRENCE OF "PREFERENTIAL BREAKING POINTS" IN ELONGATED VIRUS PARTICLES

KARL MARTIN SILBERSCHMIDT ⁽¹⁾
DALTON RAMALHO WEIGL ⁽²⁾
THEREZINHA APARECIDA SALOMÃO ⁽³⁾

SUMMARY

The authors, starting from the concept of the "normal length" of virus particles point out the dependency sometimes observed of the length of virus particles on the method of preparation, to which the virus sample had been submitted.

In preparations, obtained by the relatively mild methods of "dipping" or "exudation", higher percentages of large particles can be seen, when observed with the electron microscope than in preparations of samples deriving from the same virus source, but involving greater mechanical stress (ultra-centrifugation, alkali desintegration, ultrason-waves etc.).

Generally, in preparations of this second type, the group of additional small particles (not represented in preparations obtained by milder methods) consists of rods of approximately the same size, what agrees with the idea, that the smaller elements are fragments of the larger particles.

The rather uniform size of such fragments suggests the occurrence, in large particles, of "weak points", where a breakage under stress would easily occur. Such observations are considered indirect proofs for the occurrence of "preferential breaking points" of virus particles.

The electronmicrographies of particles of several types of virus supply also direct evidence for the occurrence of such preferential breaking points. Sometimes in such micrographies the particles are seen during the very process of breaking, exhibiting intact one side of the particles border line and a gap on the opposite side.

Based upon references of the literature and on their own observations regarding the tobacco rattle virus, the authors point out that the supposed position of the "preferential breaking points" is often acentric, what results in the fragmentation of the particle in pieces corresponding f.i. to 1/3 and 2/3 of the original size of the particle.

Attention is called upon the occurrence of biochemically weak points on the virus particle, a phenomenon, which does not explain but makes easier understandable the occurrence of comparable weak points in relation to mechanical stress.

INTRODUÇÃO

1. O "tamanho normal" das partículas

Com o desenvolvimento da microscopia eletrônica surgiu a possibilidade de observação das partículas virais. Com isso se estabeleceu, para a caracterização de um vírus, uma nova propriedade importante: o

tamanho das partículas. Essa propriedade é muito significativa, especialmente nos vírus cujas partículas são alongadas.

BRANDES & WETTER² (1959), usaram o tamanho das partículas como base auxiliar na classificação e identificação de alguns vírus vegetais que apresentam aquela característica morfológica. Utilizaram, para es-

(1) Do Instituto Biológico, São Paulo. Pesquisador conferencista do CNPq.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

(3) Da Faculdade de Medicina Veterinária e Agronomia, Jaboticabal, São Paulo.

tabelecer o tamanho das partículas de cada vírus, o conceito de “tamanho normal”, isto porque, na preparação de um determinado vírus, quando observada ao microscópio eletrônico, nem tôdas as partículas virais têm exatamente o mesmo tamanho. Puderam assim, estabelecer um tamanho médio, resultante de uma distribuição das partículas em classes crescentes de tamanho. Esse tamanho é chamado de *tamanho normal*. Para citar alguns exemplos escolhidos do trabalho de Brandes & Wetter, podemos mencionar que um vírus de trigo, transmitido através do solo, possui tamanho normal de 130 m μ , que o vírus do mosaico do fumo (TMV) caracteriza-se por um tamanho normal de 300 m μ e que o vírus X da batatinha tem tamanho normal de 515 m μ .

O “tamanho normal” como uma das propriedades características de um vírus, não é prejudicado pelo fato de que alguns vírus, como o “rattle” do fumo, possuem partículas que se distribuem, quando em histograma representativo da frequência das partículas, de modo a apresentar *dois* tamanhos normais.

Nas nossas pesquisas sobre o vírus “rattle” do fumo, atribuímos às partículas pequenas e grandes do vírus tamanhos normais de 57 e 223 m μ respectivamente.

Muitas vezes, nas preparações ao microscópio eletrônico, constatamos partículas virais de tamanhos bem diferentes do tamanho normal e que, de forma alguma, se enquadrariam dentro das frequências próximas ao tamanho normal. Tais partículas devem ser compreendidas como frações ou pedaços de partículas completas. O problema que queremos discutir neste trabalho é a existência de “pontos fracos” nas partículas dos vírus, onde haveria maior facilidade para fraturas, o que explicaria o aparecimento preferencial dos fragmentos pequenos de um determinado tamanho.

2. *Provas da ocorrência de quebras da partícula e da formação de fragmentos de tamanhos uniformes*

Dispomos de provas indiretas e diretas da ocorrência freqüente de quebras da partícula do vírus.

2.1 *Provas indiretas* — As provas indiretas apoiam-se nos dados relativos à influência que a técnica de obtenção das prepara-

ções exerce sobre a frequência do tamanho das partículas, desde a técnica mais branda até aquela envolvendo mais agitação.

Em outras palavras, preparações obtidas pelo método de “dipping” ou de exsudação contêm maior porcentagem de partículas grandes ou inteiras que preparações do mesmo vírus e do mesmo material, submetidas à ultracentrifugação.

Observações comparativas da distribuição de partículas do vírus “Stengelbont” da batatinha, variante do vírus “rattle” do fumo, em preparação do mesmo material, obtido por exsudação (método brando) e por ultracentrifugação (método agitado) já foram feitas por PAUL & BODE¹⁰ (1955). Interpretando os resultados que reuniram numa tabela do citado trabalho, os autores verificam que “a porcentagem das partículas pequenas (na preparação submetida à centrifugação) aumentou, como parece, à custa da porcentagem das maiores”. “Esse resultado”, continuam os autores, “é fácil de se interpretar, ao admitir-se que em consequência da centrifugação é favorecida uma quebra em frações menores”.

Na discussão os autores voltam ao problema da fragmentação das partículas em consequência da centrifugação e aventam uma hipótese segundo a qual para cada variante do vírus o grau de resistência contra quebra seria específico. Determinam ainda os autores o quociente do tamanho dos fragmentos como sendo 1:2,6.

Nas nossas próprias experiências sobre vírus “rattle” do fumo, originalmente encontrado em tomateiros, incluímos também algumas observações referentes à influência do tratamento do suco de plantas infectadas sobre a distribuição porcentual de partículas em classes crescentes de comprimento, escolhendo, para essa observação classes de 12,5 m μ . Foram medidas e incluídas nas respectivas classes de frequência 235 partículas observadas em preparações obtidas pelo método de “dipping” — Grupo A (Fig. 1) — e 953 partículas observadas em preparações resultantes de uma ultracentrifugação de suco — Grupo B (Fig. 2).

A distribuição porcentual das partículas dos grupos A e B está demonstrada nas figuras 1 e 2.

Uma comparação destes gráficos mostra que:

a) O histograma representativo da frequência das partículas em classes crescentes

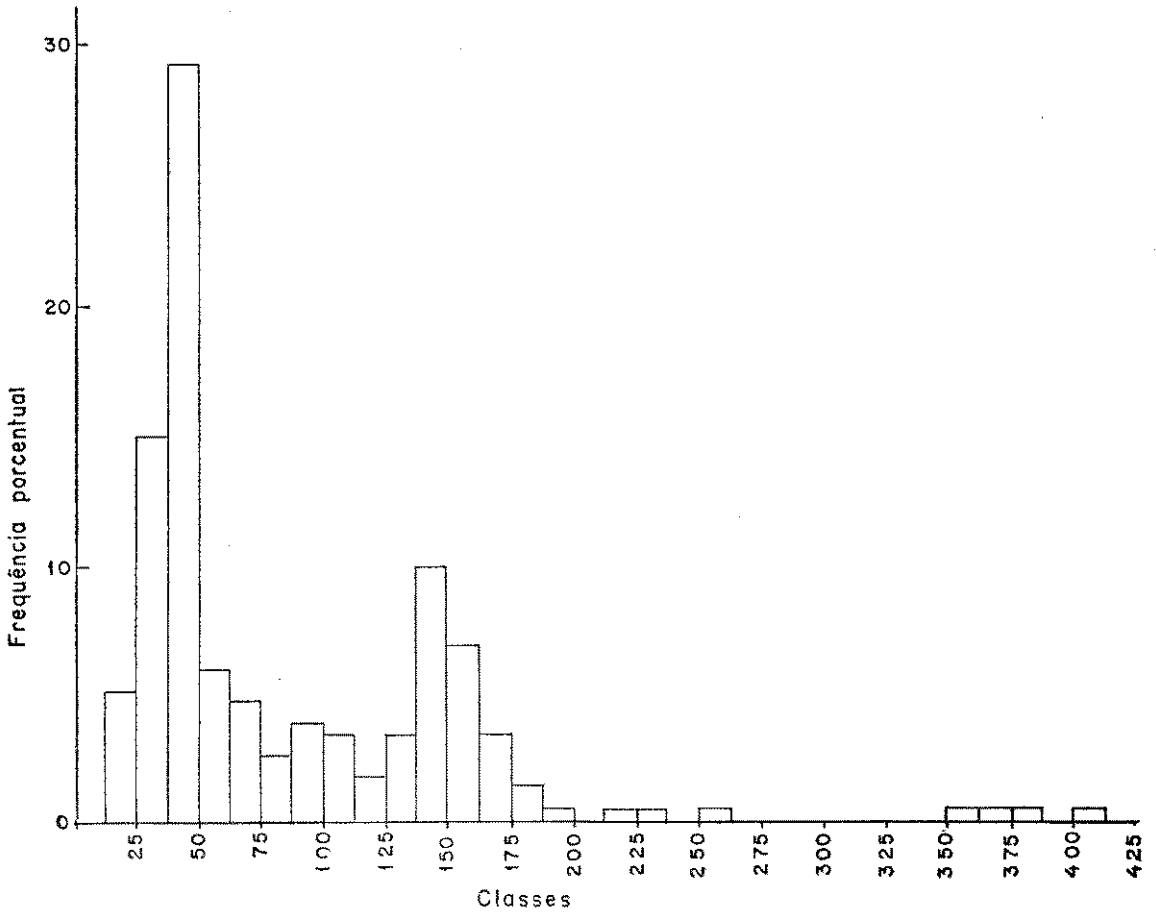


Fig. 1 — Grupo A: Frequência percentual de 235 partículas de “rattle” — virus do fumo, em classes crescentes de 12,5 mμ. Preparações obtidas com o método “Dipping”.

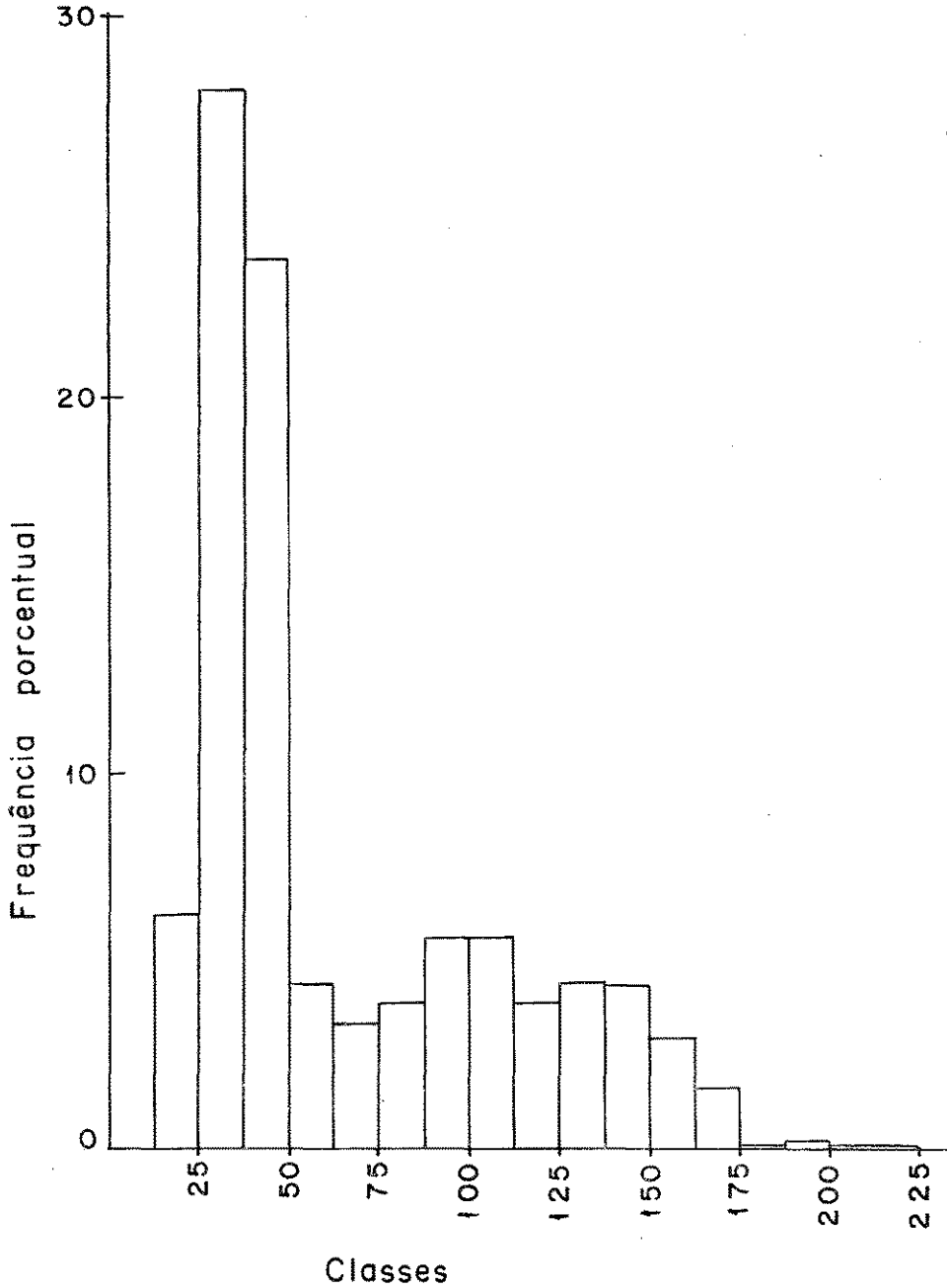


Fig. 2 — Grupo B: Frequência percentual de 953 partículas de "rattle" — vírus do fumo em classes crescentes de 12,5 mμ. Preparações feitas após ultracentrifugação do suco.

de tamanho exhibe, no grupo A, dois picos situados nas classes 37,5-50,0 $m\mu$ e 137,5-150,0 $m\mu$;

b) De tôdas as partículas do grupo A, 39,3% têm tamanhos que se enquadram nas duas classes apontadas no item a;

c) O histograma correspondente à distribuição das partículas do grupo B, nas mesmas classes de tamanho, só tem *um* pico, formado pelas partículas incluídas na classe 25,0 — 37,5 $m\mu$ ou em classes vizinhas a esta. Nota-se que êste pico está transferido para uma classe representativa de partículas de tamanho menor (25,0-37,5 $m\mu$);

d) As classes onde se situam os dois picos do Grupo A englobam 39,3% de tôdas as partículas; as mesmas classes, no Grupo B, apresentam apenas 28,2% das partículas.

A explicação mais viável para a diferença da distribuição das partículas em grupos de tamanhos crescentes é a suposição de que, em consequência de forças mecânicas agindo durante a ultracentrifugação sobre as partículas, algumas delas quebrem em frações menores. Se essa suposição é correta, devemos, no histograma da Fig. 2, não só encontrar um sensível aumento de partículas nas classes representativas de tamanhos pequenos, mas provavelmente ainda um aumento correspondente da frequência de partículas em classes intermediárias. Isso corresponderia à suposição de que a partícula grande, medindo cerca de 146 $m\mu$, quebraria num ponto tal que determinaria um componente menor (de um tamanho aproximado de 46 $m\mu$) e um maior, de tamanho aproximado de 100 $m\mu$. Essa suposição, para a qual falta ainda prova segura experimental, não está, em todo caso, em desacôrdo com as conclusões que podemos tirar da comparação dos dois gráficos.

Partículas pequenas, que se enquadram na classe 37,5-50,0 $m\mu$ constituem no grupo A apenas 14,8% das partículas contadas, mas representam no grupo B, 28,4% dessas partículas. Por outro lado, partículas grandes, enquadradas nas classes entre 125 e 175 $m\mu$ constituem, no grupo A, 24,0% e no grupo B apenas 13,5%. Ao mesmo tempo pode-se notar, no grupo das partículas submetidas à ultracentrifugação (B), um aumento da frequência de partículas de tamanho intermediário. Partículas do tamanho aproximado de 100 $m\mu$ (incluídas nas clas-

ses abrangendo os tamanhos de 75-125 $m\mu$) constituem apenas 11,5% das partículas do grupo A, mas 19,6% daquelas do grupo B. Não podemos afirmar, por enquanto, que são sempre as partículas grandes que sofrem fração no curso da ultracentrifugação. É muito provável que em certos casos também algumas das partículas pequenas sofram quebras. Acreditamos, entretanto, que algumas das peculiaridades dos histogramas A e B podem ser explicadas satisfatoriamente pela suposição de que partículas grandes, de um tamanho de cerca de 150 $m\mu$, intactas em preparações obtidas com o método de "dipping", quebram, em consequência da ultracentrifugação, em um pedaço menor (de cerca de 46 $m\mu$) e um maior (de cerca de 100 $m\mu$).

Observações relativas à influência da ultracentrifugação sobre o tamanho das partículas não foram apenas relatadas por Paul & Bode, mas por diversos outros autores. FRANCKI⁶ (1966), estudou o efeito da ultracentrifugação e de alguns outros fatores; como o pH do solvente e da solução dialisadora sobre a distribuição de partículas em classes crescentes de tamanho. Queremos considerar aqui, apenas a influência da ultracentrifugação e escolher, dos dados que o autor reúne na Tabela 1, pág. 392 só os referentes à preparação 3. O autor fez medições de duzentas partículas de duas preparações contendo TMV. A primeira (A) tinha sofrido apenas uma centrifugação de 9 000 g por 10 minutos, a segunda (B) tinha sido submetida a duas ultracentrifugações a 144 000 g durante uma hora cada vez. Notou êle, na distribuição porcentual das partículas em diversas classes, as seguintes diferenças:

Partículas %

	< 275 $m\mu$	275-350 $m\mu$	> 350
A	23	73	4
B	56	42	2

Isso mostra de novo que, em preparações submetidas à ultracentrifugação, a porcentagem das partículas pequenas aumenta à custa das partículas maiores, o que se pode explicar admitindo que, devido às forças mecânicas agindo sobre as partículas grandes, elas quebram dando origem a fragmentos.

Com o vírus X da batatinha, resultados semelhantes foram obtidos por CHICO & GUTHRIE⁴ (1969). Em preparações obtidas com método de "dipping" (brando), 57-80% das partículas medidas apresentavam um tamanho de 500-600 m μ . Após centrifugação diferencial, apenas 23-43% das partículas caracterizavam-se por esse tamanho indicado.

Não podemos aqui analisar em detalhe todos os fatores que, de acordo com as indicações da literatura, provocam uma fragmentação de partículas alongadas.

Queremos, porém, mencionar que a capacidade de provocar fragmentação de partículas foi atribuída a: 1) Raios ultra-violeta (MC LAREN & KLINKOWSKI¹², 1967); 2) Ondas ultra-sônicas (DE MONTGREMIER, GRABAR & CROISSANT⁵, 1954 e HIDAKA & KIRIYAMA⁷, 1953); 3) Exposição das preparações ao espaço — talvez consequência da ação de raios ultra-violeta (ORLOB¹⁵, 1969); 4) Ação de algumas substâncias químicas, como formalina ou extrato de *Phytolacca americana* (HIDAKA & KIRIYAMA⁷, 1953); 5) pH neutro ou alcalino do líquido em que as partículas se acham suspensas (FRANCKI⁶, 1966) mas, principalmente, a temperaturas elevadas ou muito baixas (HIDAKA & KIRIYAMA⁷, 1953, KASSANIS & MCCARTHY¹⁰, 1967, OLIVEIRA¹⁶, 1967 e KANGIESSER & DEUBNER⁹, 1953).

Alguns trabalhos referem-se ao tamanho dos fragmentos que se formam em consequência da quebra. Tais indicações são para o assunto aqui tratado de interesse especial, porque permitem tirar conclusões relativas a eventuais "pontos fracos" das partículas.

No primeiro trabalho que vamos considerar (BURCI, HERSHEY & INGRAHAM³ 1966), os pontos de quebra preferenciais foram determinados não para a partícula de um vírus, mas sim para a molécula de DNA do bacteriófago D₅. Verificou-se, nos estudos reunidos no referido trabalho, que as moléculas, sob o impacto de forças mecânicas, formam fragmentos que representam 0,6 e 0,4 respectivamente do tamanho original da molécula. Os pedaços maiores, expostos a forças mecânicas ainda mais poderosas, quebram em pedaços que representam respectivamente 0,4 e 0,2 do tamanho original da molécula. Merece ser destacado o fato de que a molécula não quebra em dois pedaços iguais, o que leva os autores a admitir a existência de pontos de quebra acêntricos que explicam a formação de fragmentos de-

iguais. Uma das hipóteses formuladas pelos autores prevê a ocorrência de pontos de quebra em posições distantes 0,4 e 0,6 do tamanho da molécula, medindo-se essa distância de cada extremidade da molécula. Outra hipótese admite a ocorrência de 4 pontos fracos, dividindo a molécula em 5 segmentos iguais. Esses resultados são bastante elucidativos para a melhor compreensão da localização de pontos de quebra em partículas completas do vírus, porque é provável que também nelas "os pontos fracos" se situem na molécula do ácido nucléico.

SCHRAMM¹⁷ (1954), referindo-se à decomposição alcalina do TMV, menciona a formação de fragmentos que corresponderiam à 6.^a parte do valor original. Em estudos mais recentes e ainda relacionados com a decomposição alcalina do TMV, ONDA, TANIGUCHI & MATSUI¹⁴ (1970), verificam que a degradação pára quando um terço do bastonete é decomposto. Seria então uma fragmentação na proporção 2:1. Hidaka e colaboradores, nos estudos já mencionados sobre a influência de vários fatores inativadores sobre o TMV, chegaram a destacar partículas medindo 25 m μ ou menos. O tamanho de 25 m μ corresponderia exatamente à metade do tamanho dos fragmentos observados por Schramm. A resultados comparáveis com os já relatados chegaram também Kassanis & McCarthy em estudos relacionados com a influência da temperatura sobre as propriedades de diversas variantes do vírus TMV. Numa determinada fase desses estudos, em que preparações purificadas de uma variante nova foram expostas a 20°C em meio alcalino (pH 8), foi libertado RNA numa quantidade correspondente a um terço da partícula. Finalmente, ainda em conexão com o assunto, devem ser mencionados os resultados, caracterizados como preliminares pelos próprios autores, DE MONTGREMIER, GRABAR & CROISSANT⁵ (1954), que submeteram preparações purificadas de partículas do vírus X da batatinha, a ultrassom. Chegaram os autores a observar fragmentos da partícula do vírus X da batatinha, do tamanho normal de 466 m μ . Os menores fragmentos mediram 33 m μ ; os outros, múltiplos aproximados desse tamanho.

Os exemplos citados são suficientes para mostrar que muitos dados, obtidos por métodos indiretos, falam a favor da existência de "pontos preferenciais" de quebra nas partículas de vírus.

2.2 *Provas diretas da quebra de partículas e da ocorrência de "pontos preferenciais" de quebra* — Falta ainda demonstrar se as quebras de partículas, postuladas pelos resultados obtidos com métodos indiretos, podem ser observadas diretamente por meio do microscópio eletrônico e se tais observações podem fornecer algumas indicações a respeito da ocorrência de "pontos preferenciais" de quebra. Antes de fazer uma revisão sucinta da literatura a respeito, devemos mencionar uma das dificuldades que na resolução desse problema deve ser levada em consideração. Se alguns fatores tendem a provocar uma quebra das partículas (por exemplo: pH neutro ou levemente alcalino), outros (por exemplo: pH ácido) causam agregação das partículas, isto é, uma justaposição das extremidades das partículas. Na interpretação de micrografias eletrônicas deve-se então tomar o cuidado de estudar as condições externas em que as preparações

foram obtidas, para poder diferenciar entre partículas quebradas e agregadas. Achamos, para a apreciação deste problema, especialmente convincentes os casos em que as partículas se acham em plena fase de quebra, isto é, apresentam ao longo de um de seus lados, o início de uma fenda transversal, enquanto que o outro lado encontra-se intacto. Nesse ponto às vezes os dois componentes da partícula formam um ângulo agudo (Fig. 3). Para o nosso problema parece-nos importante a observação em detalhe de tais partículas, a que podemos chamar aqui "partículas descontínuas", porque elas, apresentando rachadura nítida, não podem ser confundidas com partículas agregadas.

Tais partículas descontínuas são ilustradas p.ex. num trabalho de LEE¹¹ (1968), sobre um vírus do trigo, cujas partículas possuem forma oval-alongada. Na Figura 9 do referido trabalho pode-se ver nitidamente que, nesse caso, o ponto de quebra é acêntrico e que os dois componentes da partícula,

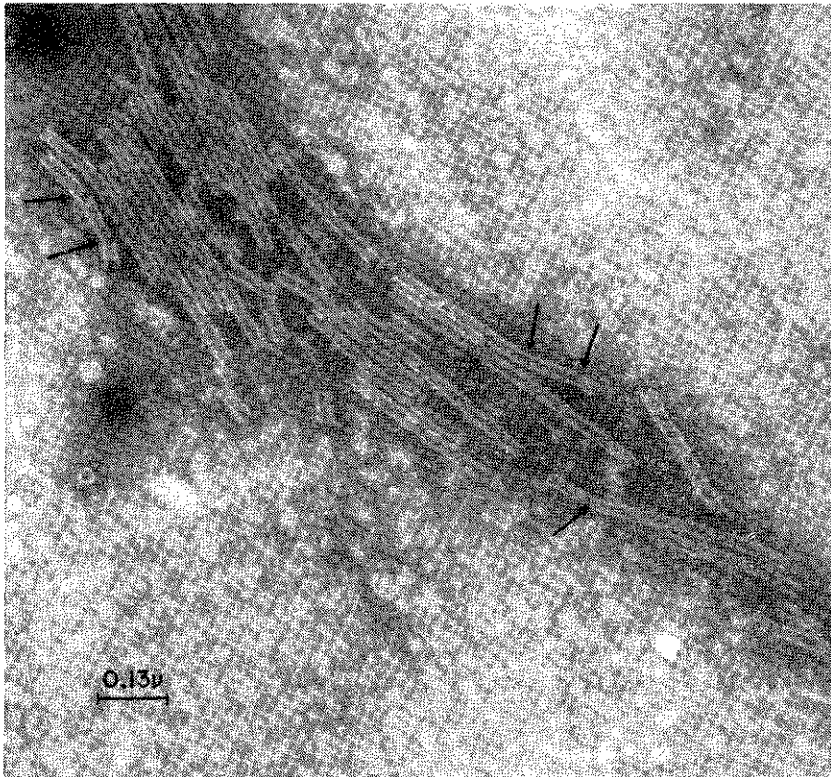


Fig. 3 — Micrografia eletrônica de partículas de vírus "rattle" do fumo, observadas em preparações obtidas pelo método "dipping". As setas indicam os pontos fracos nas partículas "descontínuas".

ainda unidos, têm comprimentos relativos de 1 e 0,44. Na Figura 8d é ilustrada outra partícula descontínua, cujo ponto de quebra está localizado de maneira a favorecer a formação de componentes dos tamanhos relativos de 1 e 0,5. Em outras figuras não é fácil medir o exato tamanho relativo dos componentes; entretanto, elas permitem distinguir a localização acêntrica dos pontos de quebra e a acentuação da ruptura na medula da partícula.

Outras partículas em vias de quebra ou descontínuas podem ser observadas também nas figuras que acompanham o trabalho de ATABEKOV *et alii*¹ (1970) sobre propriedades dos vírus "híbridos"; a Fig. 6 mostra 3 partículas descontínuas, tendo duas delas pontos acêntricos de quebra, ao passo que a terceira partícula parece ter quebrado no centro.

No curso de nossos estudos sobre o vírus causador da doença "rattle" do fumo (SILBERSCHMIDT, WEIGL & SALOMÃO¹⁹ (1969) obtivemos preparações que permitiram a observação de um número relativamente elevado (81) de partículas descontínuas desse vírus. Para poder determinar o tamanho desses componentes, projetamos as micrografias eletrônicas numa tela e medimos com régua o tamanho dos componentes das partículas descontínuas. Dos resultados se pode tirar a conclusão de que, em muitos casos, os componentes das partículas descontínuas têm um comprimento correspondente àquele do tamanho normal das partículas longas ou curtas do vírus "rattle" do fumo. Interpretamos os resultados admitindo que havia nas preparações numerosos "agregados" de partículas, e que provavelmente nos agregados as extremidades das partículas representam pontos fracos. Mas o resultado das nossas medidas mostrou também que alguns componentes das partículas tinham um comprimento ainda menor do que o tamanho normal das partículas curtas do vírus "rattle". A ocorrência de semifragmentos tão pequenos só pode ser explicada admitindo-se que havia pontos de quebra também nas partículas e não só nos agregados. A maioria dos componentes pequenos das partículas descontínuas, que podiam ser medidas com suficiente exatidão, caracterizava-se por um tamanho de cerca de 35 m μ . Componentes desse tamanho podem resultar da ocorrência de pontos de quebra ou no centro das partículas pequenas ou, em partículas grandes,

numa distância correspondente a 1/6 do tamanho da partícula, a contar de uma das extremidades. O caso mais freqüentemente observado nas nossas micrografias eletrônicas foi a fragmentação inicial no centro das partículas pequenas.

3. Possíveis causas da ocorrência de "pontos fracos" nas partículas

Já ao expor as provas indiretas da ocorrência de quebras de partículas, explicamos que essas quebras são a conseqüência de forças mecânicas que agem sobre a partícula, às vezes de maneira tal que uma extremidade fica exposta a um potencial mais forte de que a outra. Isso explica a ocorrência de quebras, mas não ainda a existência de pontos fixos de quebra nas partículas. As partículas "descontínuas" ilustradas por Lee, demonstram claramente que a ruptura ocorre primeiramente na medula, isto é, na molécula gigante do ácido ribonucléico. Essa molécula, composta de uma cadeia muito grande, em que os nucleotídeos estão enquadados numa seqüência significativa, pode ser, no laboratório, decomposta pela ação de diversas substâncias químicas. Algumas dessas substâncias agem de maneira drástica, como o ácido clorídrico diluído ou uma solução fraca de álcali; sob a influência desta última, por exemplo, ocorre uma hidrólise completa de todas as ligações entre nucleotídeos, mas existem também substâncias que causam degradações mais limitadas e específicas na molécula. Entre estas, queremos mencionar aqui, baseando-nos no esquema apresentado por INGRAM⁸ (1966), apenas duas — a ribonuclease T₁, derivada da taka-diastase, e uma outra ribonuclease — a pancreática. A primeira delas rompe a cadeia do ácido nucléico num ponto em que um dos fragmentos resultantes termina em ácido guanílico. A ribonuclease pancreática tem especificidade para bases pirimidínicas (citosina e uracil).

Citamos os pontos específicos do ataque dos enzimas apenas como exemplos da ocorrência de ligações bioquimicamente distintas na cadeia da molécula do ácido ribonucléico, sem dispormos de prova alguma para a suposição de que tais ligações são vulneráveis a um impacto mecânico. Podemos até afirmar que nem todas as ligações, sujeitas à ação da ribonuclease, constituem pontos preferenciais de quebra, porque neste caso

provavelmente a partícula fragmentar-se-ia em grande número de pedaços pequenos. Mas assim mesmo achamos interessante chamar a atenção sobre a ocorrência, já provada, de ligações especificamente susceptíveis à ação da ribonuclease, porque, já que existem na molécula pontos bioquimicamente fracos, não é improvável que existam também pontos mecânicamente fracos.

RESUMO

No trabalho focaliza-se primeiramente o conceito do “tamanho normal” das partículas e em seguida discute-se a relação existente entre o método da preparação e o comprimento das partículas virais.

Preparações obtidas por métodos relativamente brandos (“dipping”, exsudação), quando observadas ao microscópio eletrônico contêm maiores porcentagens de partículas longas que preparações obtidas por métodos que envolvem grandes tensões mecânicas (ultra-centrifugação, ultra-som, temperatura elevada). Estas apresentam maior porcentagem de partículas pequenas, consistindo de bastonetes aproximadamente do mesmo comprimento. Isso está de acôrdo com a hipótese de que as partículas curtas, encontradas em preparações que envolvem tensões, são fragmentos das partículas longas. O tamanho uniforme dos fragmentos curtos sugere a ocorrência de pontos fracos nas partículas longas nas quais, sob tensão, a quebra poderia ocorrer. Tais observações são consideradas neste trabalho como provas indiretas da ocorrência de “pontos de quebra preferenciais” das partículas virais.

Finalmente são aduzidas observações da microscopia eletrônica a respeito de partículas chamadas “descontínuas”, isto é, em vias de ruptura. A ocorrência de tais partículas “descontínuas” e a relação existente entre o tamanho dos fragmentos são consideradas neste trabalho como provas diretas da existência de “pontos de quebra preferenciais” das partículas longas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ATABEKOV, I. G.; NOVIKOV, V. K.; VISHNICHENKO, V. K. & KAFTANOVA, A. S. — Some properties of hybrid viruses reassembled in vitro. *Virology*, 41(3):519-32, 1970.
2. BRANDES, J. S. & WETTER, C. — Classification of elongated plant viruses on the basis of particle morphology. *Virology*, 8:99-115, 1959.
3. BURGI, E.; HERSHEY, A. O. & INGRAHAM, L. — Preferred breakage points in T₂ DNA molecules subjected to shear. *Virology*, 28:11-4, 1966.
4. CHICO, A. W. & GUTHRIE, J. W. — Changes in potato virus X particle length following purification by differential centrifugation. *Phytopathology*, 59:1021.
5. DE MONTGREMIER, H. A.; GRABAR, F. & CROISSANT, O. — Action des ultrasons sur des suspensions de virus X. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 238(6):722-4, 1954.
6. FRANCKI, R. I. B. — Some factors affecting particle length distribution in tobacco mosaic virus preparations. *Virology*, 30(3):388-96, 1968.
7. HIDAKA, Z. & KIRIYAMA, K. — Studies on the types of inactivation of purified tobacco mosaic virus. Experiments with temperature, sonic waves, formalin, extract from *Phytolacca americana* and bukulin extract from *Pachyma hoelen. Virus* [Kyoto Univ.] 3(1):30-50, 1953. Resumo em *Rev. Appl. Myc.*, 35(4):240, 1956.
8. INGRAM, V. M. — *The biosynthesis of macromolecules*. 2. ed. New York, W. Ar. Benjamin, 1966. 223 p.
9. KANNGIESSER, W. & DEUBNER, R. — Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Kartoffel — X — Virus in gefriergetrocknetem Tabakrohsaft. *Naturwissenschaften*, 40(160):442-3, 1953.
10. KASSANIS, B. & MCCARTHY, D. — The quality of virus as affected by the ambient temperature. *J. Gen. Virol.* 1(4):425-40, 1967. Resumo em *Rev. Appl. Mycol.* 47:84, 1968.
11. LEE, P. E. — Partial purification of wheat striate mosaic virus and fine structural studies of the virus. *Virology*, 34:583-9, 1968.
12. McLAREN, A. D. & KLINKOWSKI, A. — Some gross changes in particles of tobacco mosaic virus caused by large doses of ultraviolet radiation. *J. Gen. Vir.*, 1:391-4, 1967.
13. OLIVEIRA, A. R. — *Sorologia aplicada ao estudo do vírus do anel do pimentão*. Campinas, S.P., Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 1967. 40 p. Tese [dout.] Univ. S. Paulo.
14. ONDA, H.; TANIGUCHI, T. & MATSUI, C. — Polar stripping of tobacco mosaic virus by alkali. *Virology*, 42:551-3, 1970.

SILBERSCHMIDT, K. M.; WEIGL, D. R. & SALOMAO, T. A. — A ocorrência de "pontos de quebra preferenciais" em vírus alongados. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31:47-56, 1971.

15. ORLOB, G. B. — Morphological changes in tobacco mosaic virus after exposure to space. *Can. J. Microbiol.*, 15(2):245-6, 1968.
16. PAUL, H. L. & BODE, O. — Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Kartoffelviren. II. Vermessung der Teilchen von drei Stämmen des Rattle-virus. *Phytopath. Z.*, 24(3):341-51, 1955.
17. SCHRAMM, G. — Die Struktur des Tabakmosaikvirus und seiner Mutanten. *Adv. Enzymol.*, 15:449-84, 1954.
18. SILBERSCHMIDT, K. M.; WEIGL, D. R. & SALOMÃO, T. A. — Electron microscopic observations on the causal agent of the Brazilian tomato ringspot disease. *Phytopath. Z.*, 60:278-90, 1967.
19. SILBERSCHMIDT, K. M.; WEIGL, D. R. & SALOMÃO, T. A. — Breaking points of particles in electronmicroscopic preparations of a strain of Tobacco rattle virus (TRV). *Phytopath. Mediterranea*, 8(1):45-50, 1969.

Recebido para publicação em 16 de julho de 1971.