



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL

**CARACTERIZAÇÃO DE UM POTYVIRUS OBTIDO EM TOMATE
(*Lycopersicon esculentum* MILL.) E PIMENTÃO (*Capsicum annum* L.)
NO DISTRITO FEDERAL.**


PAULO ERNESTO MEISSNER FILHO

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas, na área de Fitopatologia.

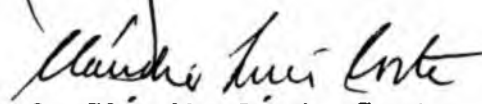
**BRASÍLIA
1986**

Trabalho realizado junto ao Laboratório de Fitopatologia, Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob a orientação do Prof. Francisco Pereira Cupertino.

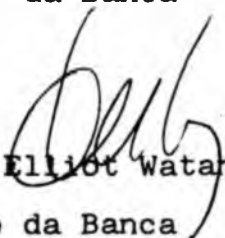
Aprovado por:



Prof. Francisco Pereira Cupertino
Presidente da Banca



Prof. Cláudio Lúcio Costa
Membro da Banca



Prof. Elliot Watanabe Kitajima
Membro da Banca

Aos meus pais, minhas irmãs e a
Lúcia pelo apoio e compreensão,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Francisco Pereira Cupertino pela orientação, amizade, estímulo, ensinamentos transmitidos e fornecimento dos isolados do vírus.

Ao Prof. Cláudio Lúcio Costa pela identificação dos afídios testados neste trabalho, sugestões nos experimentos e correções nos manuscritos.

Ao Prof. Elliot Watanabe Kitajima pelas facilidades no Laboratório de Microscopia Eletrônica e sugestões.

Ao Prof. Armando Takatsu pelas correções e sugestões nos manuscritos.

Ao Prof. Sérgio do Lab. de Microscopia Eletrônica pela ajuda nos trabalhos de microscopia eletrônica.

A todos os demais professores dos Departamentos de Biologia Vegetal e Biologia Celular pelos ensinamentos e convivência durante o Curso de Mestrado em Fitopatologia.

À CAPES pelo fornecimento da bolsa de estudos.

Ao Dr. Tracy Zimmermann pelo fornecimento de antissoro para o TEV.

Ao Dr. Horino (CNPB), Dr. Hiroshi Nagai (IA), Fátima (CENARGEN), Homero B.S.V. Pessoa (CNPB), Asgrow do Brasil Sementes Ltda., Agroflora S/A, Agroceres S/A, J.E.F. Bezerra (IPA), L. Nunes e Nunes (CNPFT), M.M. Barradas (Instituto Biológico) pelas sementes fornecidas.

Aos amigos Paulo Sérgio T. Brioso, Vera Lúcia A. Marinho, Antonio Carlos Ávila e Dr. Francisco J.B. Reifschneider pelo valioso apoio no decorrer dos trabalhos de tese.

A todos os meus colegas de curso, especialmente Maria do Carmo G. Dristig, Gilmar P. Henz, Olinda Maria Martins, Sueli Maria Gomes, Francisco Solano A. Mattos, Cláudia Regina B. de Oliveira, Albino Bongioiolo Neto, Soraia Araújo e Simoni C. Dias pela amizade e apoio.

A todos os demais colegas do Mestrado em Fitopatologia e Ecologia pelo companheirismo.

À Leila Terezinha P. dos Santos e todos os funcionários do Laboratório de Fitopatologia pela colaboração.

Ao Nestor pelos serviços fotográficos e ao Geraldo pelos desenhos da tese.

A Sra. Antonietta Rubin pela amizade e ajuda nos trabalhos de microscopia eletrônica.

A todos os funcionários da Estação Experimental de Biologia do Dept^o de Biologia Vegetal e Lab. de Microscopia Eletrônica pelo apoio e amizade.

Ao Ribamar pela amizade e serviços datilográficos.

A Luiz Carlos Mesquita pela correção do inglês do Summary e companheirismo.

Aos colegas Jason, William e Wilson pelo bom companheirismo.

A todas as demais pessoas ou entidades que de uma forma ou de outra colaboraram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

	Página
Apresentação	i
Dedicatória	ii
Agradecimentos	iii
Índice Geral	v
Índice de Tabelas	viii
Índice de Figuras	ix
I. INTRODUÇÃO	1
II. MATERIAIS E MÉTODOS	7
2.1. Obtenção e isolamento do vírus	7
2.2. Manutenção e preservação dos isolados	9
2.3. Círculo de hospedeiras	9
2.3.1. Reação de <u>Capsicum</u> ao vírus	10
2.3.2. Reação de <u>Lycopersicon</u> ao vírus	11
2.4. Testes de transmissão do vírus pela semente .	11
a) Pimentão	12
b) Tomate	13
2.5. Transmissão do vírus por afídios	13
a) Avaliação da transmissão dos quatro isola-	
dos por <u>M. persicae</u>	13
2.6. Propriedades físicas "in vitro"	14
2.7. Purificação do vírus	15
2.8. Sorologia	17

Índice Geral (Cont...)

	Página
II. Materiais e Métodos (cont...)	
2.8.1. Testes Sorológicos	17
2.9. Microscopia eletrônica	20
2.9.1. "Leaf-dip"	20
2.9.2. Exame de preparações semi-purificadas ou purificadas	20
2.9.3. Exame de secções ultrafinas	20
2.10. Levantamento da incidência do vírus no Distrito Federal	21
III. RESULTADOS	23
3.1. Isolamento, manutenção e preservação dos isolados do vírus	23
3.2. Círculo de hospedeiras	23
3.3. Reação de <u>Capsicum</u> ao vírus	29
3.4. Reação de <u>Lycopersicon</u> spp.	35
3.5. Transmissão do vírus	39
3.5.1. Transmissão pela semente	39
a) Pimentão	39
b) Tomate	39
3.5.2. Transmissão por afídio	39
a) Avaliação da transmissão dos quatro isolados pelo afídio <u>M. persicae</u>	39
3.6. Propriedades físicas "in vitro"	39
3.7. Purificação do vírus	41
3.8. Sorologia	46
3.9. Microscopia eletrônica	50
3.9.1. "Leaf-dip"	50
3.9.2. Preparações parcialmente purificadas ou purificadas	50

Índice Geral (Cont...)

	Página
III. Resultados (cont...)	
3.9.3. Cortes ultrafinos	52
3.10. Incidência do vírus no Distrito Federal em 1986	52
IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	54
V. RESUMO	58
VI. SUMMARY	60
VII. BIBLIOGRAFIA CITADA	62

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
. Tabela 1. Origem dos isolados do vírus	8
. Tabela 2. Injeções e sangrias para obter antissoro pa ra os isolados UnB-1 e 27 do vírus	18
. Tabela 3. Espécies testadas que não se infetaram com o vírus	24
. Tabela 4. Reação de <u>Capsicum</u> spp. aos isolados UnB-1 e 27 do vírus	32
. Tabela 5. Reação de <u>Lycopersicon</u> spp. aos 4 isolados do vírus	37
. Tabela 6. Transmissão dos quatro isolados do vírus por <u>M. persicae</u>	40
. Tabela 7. Propriedades físicas "in vitro" dos 4 isola dos do vírus	42

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
. Figura 1. Reação de hospedeiras aos quatro isolados do <u>vírus</u>	27
. Figura 2. Reação de algumas hospedeiras aos isolados do <u>vírus</u>	28
. Figura 3. Reação de cultivares e introduções de <u>Capsicum</u> ao <u>vírus</u>	30
. Figura 4. Redução no crescimento causado pelo <u>vírus</u> em <u>Capsicum</u> , observado 30 dias após a inoculação ..	31
. Figura 5. Reação de <u>Lycopersicon</u> ao <u>vírus</u>	36
. Figura 6. Esquema de purificação do <u>vírus</u> adaptado de <u>Ávila et al.</u> (1986)	44
. Figura 7. Espectro de absorção de luz ultravioleta para o isolado UnB-1 do <u>vírus</u> purificado a partir de fumo 'TNN'	47
. Figura 8. Testes sorológicos com antissoro para o isolado UnB-1	49
. Figura 9. Testes sorológicos com antissoros (As) para os isolados UnB-1 e 27 e estirpes PVY ^O e PVY ^N da <u>batata</u>	51

Índice de Figuras (Cont...)

Página

. Figura 10. Preparação parcialmente purificada de vírus e cortes ultrafinos 53

I. INTRODUÇÃO

O tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) é uma das hortaliças mais conhecidas e de maior consumo no mundo (Maranca, 1981; Esquinas-Alcazar, 1981; Filgueira, 1982). O valor nutritivo do tomate não é elevado, mas tendo em vista o seu alto grau de consumo, ele se torna uma importante fonte de vitaminas e minerais (Esquinas-Alcazar, 1981). Em 1980, a produção mundial de tomate foi de 50.153 mil toneladas; nesse ano, o Brasil produziu 1.611 toneladas (FAO, 1980). No Brasil, o tomate ocupa o segundo lugar entre as culturas oleráceas, por ordem de importância econômica (Filgueira, 1982).

Em 1982, o Sistema Nacional de Centrais de Abastecimento (SINAC) registrou uma comercialização de 86 mil toneladas de pimentão (Capsicum annum L.) (Nagai, 1983).

Tomate e pimentão podem ser infetados por mais de 30 vírus (Edwardson & Christie, 1979; Hollings & Brunt, 1981; Valliela, 1969). No Brasil, conhecem-se pelo menos 12 doenças de vírus afetando essas duas culturas (Costa, 1948; Costa et al., 1964; Nagai, 1983). Dentre essas doenças o mosaico Y, causado pelo vírus Y da batata ("Potato Virus Y", PVY) é uma das mais importantes delas, estando largamente disseminada e podendo causar perdas de 20 a 70% nessas culturas (Costa et al., 1964; Ferreira, et al., 1982; Dossa & Mungur, 1982; Nagai, 1983). O PVY foi descrito em 1931 por Smith (citado por Bokx & Huttinga, 1981).

O vírus Y pertence ao grupo dos Potyvirus, sendo o membro típico. Até o momento, o grupo contém 85 vírus descritos. Sendo membros do grupo o Vírus A da batata ("Potato virus A",

PVA), "Pepper mottle virus", (PeMV), "Tobacco etch" (TEV), "Pepper veinal mottle" (PVMV), Mosaico Comum do Feijoeiro ("Bean common mosaic virus", BCMV), Mosaico Amarelo do Feijoeiro ("Bean yellow mosaic virus", BYMV), Mosaico da Soja ("Soybean mosaic virus", SoyMV), Mosaico da Alface ("Lettuce mosaic virus", LMV), além de outros.

Os Potyvirus possuem partículas flexuosas com 11 x 680 - 900 nm, apresentando simetria helicoidal e contendo aproximadamente 5% de ácido nucleico e 95% de proteína. Têm um coeficiente de sedimentação em torno de 150 S e densidade de flutuação boiante de 1,31 g/cm³ em cloreto de césio (Hollings & Brunt, 1981).

As partículas intactas contêm ARN de fita simples com peso molecular de 3,0 - 3,5 x 10⁶ daltons. A capa proteica da partícula contém um único polipeptídeo com peso molecular de aproximadamente 3,4 x 10⁴ daltons. Os potyvirus induzem a formação de inclusões citoplasmáticas (catavento, espiral etc) que podem ser detectadas pela microscopia ótica ou eletrônica. Essas inclusões possuem proteína com peso molecular de 6,7 - 7,0 x 10⁴ daltons (Hollings & Brunt, 1981) e são características do grupo, podendo - se através delas separar isolados e estirpes (Edwardson et al., 1984). Baseado nesses dados, Edwardson (1974) propôs a classificação dos Potyvirus em 3 grupos de acordo com a morfologia das inclusões por eles induzidas: Subdivisão I formação de "scrolls" e cataventos; Subdivisão II formação de cataventos e agregados lamelares e Subdivisão III contém cataventos, "scrolls" e agregados lamelares. Mais tarde Edwardson et al. (1984) propuseram a formação da Subdivisão IV para englobar os Potyvirus que induzem a formação de cataventos, "scrolls" e agregados lamelares levemente curvados.

Os vírus deste grupo são relativamente estáveis "in vitro" e ocorrem em concentrações moderadamente elevadas nas

plantas, apesar de muitos serem extraídos e purificados com dificuldade. O PVY apresenta um ponto termal de inativação (p.t.i) entre 50 - 60°C, ponto final de diluição (p.f.d) entre 10^{-2} a 10^{-6} e longevidade "in vitro" (l.i.v) a 18 - 22°C de 7 a 50 dias (Bokx & Huttinga, 1981).

Os Potyvirus variam grandemente em sua capacidade imunogênica. Alguns são difíceis de purificar ou de obter em quantidades suficientes para testes sorológicos extensivos (Hollings & Brunt, 1981).

Os Potyvirus reagem bem em vários testes sorológicos, sendo que poucos reagem em placas contendo agar-gel sem terem recebido tratamento prévio. Vários detergentes tem sido incorporados ao gel, tendo o Dodecenil sulfato de sódio (SDS) se mostrado superior (Hollings & Brunt, 1981).

Alguns autores utilizando testes de imunodifusão dupla em agar-gel (Gooding Jr., 1975; Makkouk & Gumpf, 1976) e testes de absorção cruzada (Leiser & Richter, 1979) demonstraram haver diferenças sorológicas entre estirpes de PVY. Já Bokx & Huttinga (1981) consideraram que não existem diferenças sorológicas consistentes entre os grupos Y^O , Y^N e Y^C de PVY provenientes de batata.

O vírus Y da batata é considerado relacionado sorologicamente com TEV (Purcifull & Gooding, 1970; Bokx & Huttinga, 1981), BCMV (Edwardson & Christie; Moghal & Francki, 1981), "Celery mosaic virus" (CeMV), "Maize dwarf mosaic virus" (MDMV) (Edwardson & Christie), "Turnip mosaic virus" (TuMV) (Edwardson & Christie; Walkey & Weble, 1984), PVMV (Bokx & Huttinga, 1981; Edwardson & Christie), Virus do mosaico da melancia-1 ("Watermelon mosaic virus-1, WMMV-1) (Edwardson & Christie), LMV (Alba & Oliveira, 1976; Moghal & Francki, 1981), BYMV (Alba & Oliveira, 1976;

Walkey & Weble, 1984), "Passionfruit woodiness virus" (PWV) (Moghal & Francki, 1976), "Peru tomato virus" (PTV) (Fernandez-Northcote & Fulton, 1980), "Henbane mosaic virus" (HMV), PVA, Vírus do mosaico do picão ("Bidens mottle virus", B1MV) (Bokx & Huttinga, 1981), "Clover yellow virus" (CYVV) (Walkey & Weble, 1984).

Outros autores não encontraram diferenças sorológicas entre o Vírus Y da batata, o PVMV e TEV (Gooding, 1975), BYMV, "Pea mosaic virus" (PMV), LMV, BCMV, Vírus do mosaico da cana-de-açúcar ("Sugarcane mosaic virus", SCMV) (Moghal & Francki, 1976).

Há uma grande massa de informação sobre o relacionamento sorológico entre os vários Potyvirus. Existe uma certa discordância nos resultados obtidos, o que pode ser explicado pelo fato de o relacionamento dentro desse grupo ser altamente complexo. Diversos métodos são utilizados para estudar o relacionamento e pode haver variação na atividade sorológica dos isolados estudados (Hollings & Brunt, 1981).

Os Potyvirus são transmitidos de uma maneira não persistente por afídios e alguns membros pela semente ou por fungo. Experimentalmente são transmitidos por inoculação mecânica (Bokx & Huttinga, 1981; Hollings & Brunt, 1981).

A maioria deles apresenta círculo de hospedeiras restrito (Hollings & Brunt, 1981). O vírus Y infeta principalmente Solanaceae, podendo afetar plantas das famílias Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Compositae e Leguminosae (Bokx & Huttinga, 1981).

As estirpes de PVY descritas em batata por diversos autores (Borges, 1971; Delhey, 1982; Kahn & Monroe, 1963; Klinkowski & Schmelzer, 1960; Leiser & Richter, 1979; Montenegro et al., 1968; Nóbrega & Silberschmidt, 1944) podem na sua maioria ser classificados nos grupos Y^O , Y^N e Y^C (Bokx & Huttinga, 1981),

ou seja, grupo Y^0 são aquelas estirpes que produzem rugosidade sistêmica severa e queda de folhas em batata, necrose sistêmica em Physalis floridana e mosqueado em fumo. Grupo Y^N ocasionam necrose das nervuras em fumo, mosqueado em P. floridana e mosqueado fraco em batata. Grupo Y^C , a estirpe típica não é transmitida sozinha por Myzus persicae, causa mosaico em cultivares de batata suscetíveis e os sintomas produzidos em P. floridana e fumo são semelhantes aos do grupo Y^0 .

Estirpes de PVY ocorrentes em pimentão e tomate tem sido descritas por vários autores em diversos países. A diferenciação das mesmas tem sido feita através da reação de hospedeiras (Cook, 1963; Cook, 1967; Graça et al., 1969; Makkouk & Gumpf, 1974; Nagai & Smith, 1968). Outras estirpes foram separadas baseando-se na reação apresentada em hospedeiras e resultados de testes sorológicos (Makkouk & Gumpf, 1976; Zitter, 1972). Não é possível uma comparação entre estas estirpes, tendo em vista que cada autor utilizou espécies ou cultivares diferentes no círculo de hospedeiras.

No Brasil o Vírus Y da batata foi descrito pela primeira vez por Nóbrega & Silberschmidt (1944), infectando batata. Mais tarde o vírus foi encontrado em tomateiro (Costa et al., 1960; Costa et al., 1969; Nagai & Araújo, 1974; Silberschmidt, 1956) e pimentão (Araújo et al., 1974; Nagai et al., 1969; Nagai & Araújo, 1974). Nagai (1968, 1971a e b) dividiu as estirpes de PVY no grupo N (Y^N) e no grupo W (Y^W , Y^f , Y^{ft}), de acordo com a reação em N. physaloides, N. tabacum e a capacidade de em condições naturais infectar pimentão e tomate. Dentro de cada grupo, segundo Nagai & Costa (1972) e Nagai (1983), as estirpes são identificadas de acordo com a reação dos pimentões da Série Agrônômico. Assim foi descrita a estirpe do vírus Y de Atibaia que é capaz de infectar o pimentão 'Agrônômico 8' (Nagai et al., 1969), a estirpe Y^{ft}

que infeta a pimenteira P.I. 264281 (Nagai, 1971b), as estirpes Y^f e Y^{ft} que são separadas de acordo com a reação de pimenta (P.I. 264281 e Ambato) e pimentões (Agrônômico 9 e 12). Em termos de Brasil a classificação proposta por Nagai é a que tem sido utilizada para estirpes de PVY provenientes de pimentão e tomate.

A variabilidade de PVY tem sido assinalada por vários autores dentro e fora do Brasil. Esse fato é relevante tanto sob o ponto de vista prático, no que se refere ao melhoramento de plantas, quanto teórico no que toca à caracterização desse vírus, como membro do grupo Potyvirus.

Na literatura já existem várias estirpes de PVY descritas. A distinção entre elas é geralmente feita utilizando os sintomas apresentados em um grupo de hospedeiras. Cada autor utiliza espécies diferentes, ficando difícil a comparação de "estirpes novas" com as já existentes na literatura, tendo em vista que muitas plantas diferenciadoras não são fáceis de serem encontradas. Há a necessidade de uma padronização das espécies diferenciadoras de estirpes.

O presente trabalho compara quatro isolados coletados no Distrito Federal, quanto ao círculo de hospedeiras, propriedades físicas, eficiência de transmissão por afídio, relacionamento sorológico e inclusões produzidas. Visa também apresentar critérios para a separação de estirpes de PVY, produção de antissoro e localização de fontes de resistência aos quatro isolados em pimentão e tomate, bem como avaliar a incidência desta virose nas culturas de pimentão e tomate no Distrito Federal.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DO VÍRUS

Os quatro isolados do vírus testados de números UnB -1, 17, 27 e 32 foram encontrados infetando pimentão ou tomate no Distrito Federal (Tabela 1).

O vírus foi recuperado de amostras de pimentão ou tomate por meio de inoculação mecânica do suco ou de transmissão pelo afídio-vetor, Myzus persicae Sulz.

Para inoculação mecânica, folhas infetadas foram maceradas na presença de tampão fosfato a 0,02 M, pH 7,0 mais 0,1% de sulfito de sódio, sendo o extrato aplicado às folhas das plantas-teste, previamente polvilhadas com pó fino de carborundo, com auxílio de cotonetes de algodão ou pistilos de porcelana. Após a inoculação o excesso de carborundo foi lavado com água de torneira. Nas recuperações feitas a partir de folhas infetadas de pimentão, foi usada a diluição (peso/volume) de 1:10, para evitar o efeito de inibidores no suco (Nagai, 1983). Nos demais casos, essa diluição foi de 1:5.

Na transmissão do vírus por afídio, utilizaram-se indivíduos ápteros de colônias mantidas em plantas sadias de couve 'Gongarsol'. Os afídios foram submetidos a jejum prévio de 60 minutos em placas de Petri, sendo depois colocados para se alimentar em folhas infetadas de tomate, pimentão ou fumo por um período de 10 minutos. A seguir, os pulgões foram transferidos para plantas de fumo em vaso. O período de acesso de transmissão foi de 30 minutos a 24 horas durante o qual as plantas-teste foram cobertas com campânulas de vidro com tampa telada. Passado o

Tabela 1. Origem dos isolados do vírus.

Isolado nº	Origem e sintomas apresentados na hospedeira original	Método de isolamento
UnB-1	Recuperado originalmente de folhas de pimentão 'Agrônômico 10G' com sintomas de mosaico, coletadas no CNPH (F.P. Cupertino, com. pessoal)	Recuperação inicial por meio de pulgão, seguido de inoculações sucessivas em fumo e sendo posteriormente transferido para pimentão por métodos mecânicos.
UnB-17	Obtido de plantas de pimentão 'Ikeda' com sintomas de mosaico, provenientes de Tabatinga, DF	Recuperado por meio de afídio para fumo 'TNN'.
UnB-27	Obtido de plantas de tomate 'Iguaçu' com sintomas de encarquilhamento, provenientes de Tabatinga, DF	Recuperado através de pulgão para fumo 'TNN'.
UnB-32	Obtido de plantas de tomate 'Caqui' provenientes da Vargem Bonita, DF, com sintomas de mosaico	Recuperado mecanicamente para fumo 'Turkish'.

período de transmissão, os pulgões foram mortos, através da aplicação de inseticida.

Dentre as amostras recuperadas para fumo, 10 foram testadas em grupo de hospedeiras constituído por N. rustica, N. tabacum 'Turkish', C. quinoa, L. esculentum 'Ângela Gigante I 5.100', Capsella bursapastoris, C. murale, N. glutinosa, N. physaloides, L. esculentum 'Santa Cruz', C. annuum 'Agronômico 10 G' e 'Itaipu'.

Assim que os isolados foram separados tentou-se a purificação biológica dos mesmos através de lesão local em C. quinoa, C. amaranticolor e P. floridana (Bokx & Huttinga, 1981).

2.2. MANUTENÇÃO E PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS

Todos os isolados foram preservados em folhas desidratadas a baixa temperatura (4 - 5 °C) (Lin et al., 1979) e em plantas vivas de fumo 'TNN', N. physaloides, tomate e pimentão em telado. A cada 10 - 15 dias o inóculo era repicado para outro grupo de plantas.

2.3. CÍRCULO DE HOSPEDEIRAS

Na determinação do círculo de hospedeiras, testaram-se, por inoculação mecânica 4 - 5 plantas de cada espécie ou cultivar de planta-teste disponível.

As plantas foram mantidas em vasos de barro ou alumínio, ficando em telado à temperatura ambiente. No período de execução dos trabalhos a temperatura variou de 22,1 a 27° C e a umidade ficou na faixa de 52 a 80% segundo dados da

Estação de Meteorologia do Departamento de Engenharia Civil, instalada na Estação Experimental de Biologia da UnB.

As plantas foram observadas até 20 - 30 dias após a inoculação, tentando-se, então, a recuperação do vírus das plantas-teste que não mostraram sintomas.

2.3.1. Reação de Capsicum ao vírus.

Variedades e introduções de Capsicum foram avaliadas quanto ao seu grau de suscetibilidade ao vírus.

As plantas foram inoculadas com os isolados UnB 1 e 27, duas vezes, uma aos 34 e outra aos 62 dias após a semeadura quando apresentavam, respectivamente, 3 - 4 e 8 - 10 folhas verdadeiras.

O inóculo foi multiplicado em plantas de fumo 'TNN', sendo utilizado 21 dias após a inoculação. As folhas apresentando sintomas fortes, foram maceradas na presença de tampão fosfato a 0,02 M, pH 7,0 contendo 0,1% de sulfito de sódio na proporção 1:5 (p/v). As plantas foram polvilhadas com pó fino de carborundo, inoculadas com o dedo indicador e em seguida lavadas com água por meio de um piseta.

Testaram-se, em média, 10 plantas de cada variedade ou introdução, por isolado, sendo que os vasos continham 2 plantas. Dez plantas ficaram como controle. Além disso de espaços em espaços colocaram-se plantas de fumo 'TNN', pimentão 'Ruby King' e N. physaloides para verificar a eficiência da inoculação.

Realizaram-se duas leituras uma 28 dias após a primeira inoculação e outra 21 dias depois da segunda inoculação.

As plantas foram avaliadas conforme a seguinte escala:

<u>Escala:</u>	<u>Sintoma apresentado:</u>
(0) Imune	Sem sintomas e recuperação negativa
(1) Resistente	Sem sintomas e recuperação positiva
(2) Moderamente resis <u>t</u> ente	Mosaico fraco
(3) Moderamente susce <u>t</u> ível	Faixa verde das nervuras ou mosaico conspícuo
(4) Suscetível	Mosaico rugoso com deformação foliar e bolhosidade
(5) Muito suscetível	Mosaico necrótico, com queda de folhas, paralização do crescimento ou morte da planta

Testes de recuperação do vírus foram feitos a partir de folhas retiradas das plantas que não mostraram sintomas nos dois testes de inoculação consecutivos.

2.3.2. Reação de Lycopersicon ao vírus.

Neste experimento avaliou-se a suscetibilidade de genótipos de Lycopersicon spp. aos isolados UnB 1, 17, 27 e 32 do vírus.

Testaram-se 5 plantas de cada genótipo em estudo. As plantas foram inoculadas quando apresentavam 3 - 4 folhas, cerca de 21 dias após a sementeira.

A inoculação foi executada de maneira já descrita, exceto que para a inoculação utilizou-se o pistilo, e realizou-se apenas uma inoculação.

As plantas foram observadas até 25 - 30 dias após a inoculação, quando tentou-se a recuperação do vírus das plantas sem sintomas.

Para a avaliação dos sintomas apresentados utilizou-se a seguinte escala:

<u>Escala:</u>	<u>Sintoma apresentado:</u>
(0) Imune	Sem sintomas, recuperação negativa
(1) Resistente	Sem sintomas, recuperação positiva
(2) Moderamente suscetível	Mosaico, leve redução do crescimento
(3) Suscetível	Encarquilhamento ou necrose foliar

2.4. TESTES DE TRANSMISSÃO DO VÍRUS PELA SEMENTE

a) de Pimentão

Neste teste, inocularam-se 113 plantas de pimentão 'Agrônômico 10 G', no estágio de 4 folhas verdadeiras. O isolado testado foi o UnB-1. Dentre as plantas inoculadas 97 apresentaram sintomas fortes de mosaico. As plantas com sintomas foram transplantadas para vasos de barro, colocando-se 2 plantas por vaso. Quando os pimentões começaram formar os frutos, tentou-se a recuperação do vírus para plantas de fumo jovens, através de inoculação mecânica.

Após apresentarem manchas avermelhadas os frutos foram colhidos e guardados em temperatura ambiente até ficarem vermelhos. Então as sementes foram retiradas e deixadas à sombra sobre folha de jornal.

As sementes foram separadas em lotes de 20 e semeadas em 2 linhas, em vasos de barro contendo solo esterilizado em autoclave. Testaram-se 640 sementes.

Observou-se a percentagem de germinação e o aspecto das plântulas quanto a possíveis sintomas até 30 dias após a semeadura. Os testes de inoculação para recuperação de vírus foram feitos a partir de inóculo retirado das plântulas assim obtidas.

b) de Tomate

O isolado UnB-27 do vírus foi testado quanto a transmissão pela semente de tomate 'Santa Cruz Kada Gigante'. As plantas foram inoculadas quando apresentavam 3 - 4 folhas e mostraram mosaico forte e necrose foliar. Assim que os frutos começaram a ser formados, folhas com sintomas foram utilizadas para a recuperação do vírus.

Os frutos foram colhidos quando começaram a apresentar coloração avermelhada e mantidos a sombra até ficarem com cor vermelha; então, as sementes foram extraídas e deixadas para fermentar em copos de plásticos cheios de água, por 48 - 72 horas. Em seguida, as sementes foram lavadas e postas a secar sobre folha de papel jornal à sombra. As sementes assim obtidas foram semeadas em vasos de alumínio contendo terra esterilizada na base de 32 sementes por vaso.

Após a emergência, as plântulas foram observadas periodicamente até 40 dias após a semeadura, quanto à presença de sintomas, efetuando-se testes de recuperação do vírus a partir de amostras de folhas dessas plântulas.

2.5. TRANSMISSÃO DO VÍRUS POR AFÍDIOS

a) Avaliação da transmissão dos quatro isolados do vírus por M. persicae.

O experimento teve como objetivo avaliar a eficiência de M. persicae em transmitir os 4 isolados do vírus em estudo.

O teste foi executado em casa de vegetação tipo telado. O inóculo foi obtido de folhas destacadas de plantas de fumo 'TNN' 25 dias após a inoculação mecânica. Como planta-teste utilizou-se o pimentão 'Ruby King' no estágio de 4 folhas ou cerca

de 12 dias após o transplante. Os pulgões foram transferidos para a fonte de inóculo e daí para pimentões, utilizando-se um pincel de artista umidecido em água.

Utilizou-se um delineamento completamente casualizado com 8 repetições por tratamento, sendo uma planta por vaso. Cada planta recebeu 6 pulgões.

Os pulgões foram submetidos, previamente, a um período de jejum de 60 minutos e em seguida permitido um acesso de aquisição de 20 minutos e um acesso de inoculação de 30 minutos. Alguns pulgões após o jejum foram colocados diretamente em plantas sadias para servirem como controle. Decorrido o acesso de inoculação os pulgões foram mortos com aplicação de inseticida.

2.6. PROPRIEDADES FÍSICAS 'IN VITRO'

Foram determinados as propriedades físicas de todos os isolados, utilizando-se o suco de fumo 'TNN' para todos os testes, cerca de 16 dias após a inoculação mecânica.

O suco foi extraído na presença de tampão fosfato a 0,02 M, pH 7,2 contendo 0,1% de sulfito de sódio e filtrado com gaze.

No teste de infetividade utilizaram-se plantas-teste de fumo 'TNN', que foram inoculadas mecanicamente no estádio de 3 a 4 folhas.

Para a determinação do ponto termal de inativação (p.t.i.) macerou-se uma grama de tecido em 4 ml de tampão (1:5).

Porções de 1,5 ml do suco obtido foram colocadas em tubos sorológicos de 11 x 75 mm, postos em banho-maria às

temperaturas de 45, 50, 55, 60, 65 ou 70°C por 10 minutos e a seguir, resfriados em água fria. Logo após, procedeu-se ao teste de infetividade para determinar o ponto final de diluição (p.f.d.), o suco foi diluído de 10^{-1} a 10^{-6} .

Nos testes de longevidade "in vitro" o suco foi diluído 1 : 5 em tampão, de maneira já mencionada. Colocaram-se 1,5 ml de suco diluído em vidros fechados com tampa e vedados com fita adesiva, sendo os mesmos mantidos à temperatura ambiente por um a sessenta dias. Para o teste de longevidade, empregou-se uma progressão geométrica de razão dois.

2.7. PURIFICAÇÃO DO VÍRUS

O vírus foi multiplicado em plantas de fumo 'TNN' inoculadas mecanicamente de maneira já descrita, 20 dias após o transplante ou após atingirem o estágio de 5 - 6 folhas.

Para purificação foram colhidas as folhas que apresentavam sintomas sistêmicos e que mostraram ter atingido nível elevado de concentração do vírus, cerca de 21 dias após a inoculação, demonstrado em ensaios preliminares de inoculação em folhas de fumo 'TNN'.

Na tentativa de obter-se preparações purificadas, utilizaram-se os métodos de Delgado-Sanchez & Grogan (1966) e Marinho et al. (1984).

Testou-se a extração do vírus com água destilada, pH 5,2 - 5,3; tampão fosfato a 0,05 M, pH 7,2 e tampão fosfato a 0,2 M, pH 8,0. Como antioxidante, utilizaram-se 2-Mercaptoetanol a 0,2% ou 0,3%, ácido ascórbico a 0,3% ou sulfito de sódio a 0,75%. Para evitar a agregação, experimentaram-se Triton X-100 a 1% e "Etileno diamino tetra-acético" (EDTA) a 0,01 ou 0,001 M.

Na clarificação, empregaram-se clorofórmio a 50% (v/v), n-butanol a 8% e centrifugações a baixa rotação.

Para concentrar o vírus, adicionaram-se 4 ou 8% de polietileno glicol (PEG, PM = 6000) mais 0,2 M de cloreto de sódio ao suco clarificado sob agitação constante por 120 minutos ou agitando apenas até dissolver o PEG e NaCl, seguindo-se centrifugação a baixa rotação.

O vírus foi ressuscitado em tampão borato a 0,1 M, pH 8,2; tampão borato a 0,01 M, pH 8,3; tampão fosfato a 0,05 M, pH 7,2 ou tampão fosfato 0,01 M, pH 7,2.

Para separar o vírus de proteínas da planta, testou-se a centrifugação em gradiente de sacarose nas concentrações de 10 a 40% a 24000 rpm por 2,5 horas em rotor SW 25,1 e em gradiente de cloreto de cézio a 45000 rpm por 18 horas em rotor TY 65.

A preparação foi examinada em microscópio eletrônico marca Jeol antes de ser colocada em gradiente de cloreto de cézio.

O gradiente de cloreto de cézio (Vera L. Marinho Lab. Microscopia Eletrônica/UnB, com. pessoal) foi preparado da seguinte maneira: em tubos "ultra-clear TM" de 16 x 76 mm marca Beckman colocaram-se 2,7 ml de solução saturada de CsCl e adicionaram-se 4,8 ml de preparação do vírus parcialmente purificada. Os tubos foram tapados com o dedo e invertidos 2 - 3 vezes. Os tubos foram montados, sendo o seu volume completado com óleo mineral marca Nujol. A seguir foram centrifugados a 45000 rpm por 18 horas em rotor TY 65. Após a centrifugação a banda formada foi retirada através de punctura do fundo tubo com agulha de injeção. A banda coletada foi diluída com tampão fosfato a 0,01 M, pH 7,2 contendo 0,001 M de EDTA e centrifugada em rotor TY 65 a 45000 rpm por 90 minutos. Após ressuspen

do o precipitado a preparação de vírus foi centrifugada a 3000 - 4000 rpm por 20 minutos em rotor SS-34, sendo em seguida levada para leitura em espectrofotômetro Shimadzu double-beam UV-200s da Bausch & Lomb para avaliação de sua concentração e pureza.

2.8. SOROLOGIA

A preparação purificada, após ser avaliada no espectrofotômetro, foi misturada na proporção 1:1 (v/v) com Adjuvante Completo de Freund (Calbiochem-Behring Corp., California, USA).

A preparação foi emulsificada, utilizando-se para tanto de uma seringa de vidro de 5 ml com agulha 30 x 9 acoplada.

As imunizações (Tabela 2) foram feitas através de injeções intramusculares em coelho Nova Zelândia, pesando aproximadamente 2,5 quilos. As sangrias foram feitas através de punção cardíaca (Tabela 2).

A cada sangria, retiraram-se cerca de 20 ml de sangue, excetuando-se a primeira. O sangue foi coletado em tubos de 30 ml, sendo mantido à temperatura ambiente por 1 - 2 horas. Após isto, com um bastão de vidro descolou-se o coágulo da parede do tubo, que foi mantido em repouso à temperatura de 12°C por uma noite. Na manhã seguinte, coletou-se a fase líquida que foi centrifugada a 4000 rpm por 20 minutos em rotor SS-34. O sobrenadante foi coletado, adicionando-se ao mesmo 2 gotas de azida sódica a 2% (p/v). O antissoro assim obtido foi armazenado em congelador.

2.8.1. Testes Sorológicos

O antissoro obtido foi testado por imunodifusão dupla em agar-gel em meio contendo 0,8% de Agar Noble (Difco Lab) e 0,5% de Sódio Dodecil Sulfato (SDS) (Sigma Chemical CO.), e 1,0%

Tabela 2. Injeções e sangrias para obter antissoro para os isolados UnB-1 e 27 do vírus.

Isolado UnB-1			Isolado UnB-27		
Data das injeções	Quant. de vírus injetado (mg)	Data das sangrias	Data das injeções	Quant. de vírus injetado (mg)	Data das sangrias
30/08/85	0,30	11/10/85	17/07/86	1,20	23/09/86
04/09/85	0,42	23/11/85	25/07/86	1,20	14/11/86
06/09/85	0,30	30/11/85	28/08/86	1,23	24/11/86
16/09/85	0,48	07/12/85	11/09/86	1,14	
01/10/85	0,48	20/12/85	24/10/86	1,60	
01/10/85	0,40	15/01/86	29/10/86	1,60	
13/10/85	0,30	03/02/86	31/10/86	1,60	
17/10/85	0,69	17/02/86			
21/10/85	0,43				
25/10/85	0,65				
31/10/85	0,61				
04/11/85	0,86				
25/11/85	1,45				
03/12/85	1,45				
23/01/86	1,73				
Total	10,55			9,57	

de azida sódica dissolvidos em água destilada (p/v), preparado se gundo Purcifull & Batchelor (1977).

O meio foi vertido em placas de 9 mm de diâmetro, previamente tratadas com 0,1% de Formvar em clorofórmio.

Para perfuração do meio, foi utilizado um vazador de rolha e um molde de uma figura de hexágono contendo 6 orifícios externos de 5 mm de diâmetro e distando 4 mm entre si e do orifício central de mesmo diâmetro. Os cilindros cortados foram retirados por aspiração com auxílio de uma bomba de vácuo.

Como antígenos foram usados suco de folha de fumo 'TNN', infetado com o vírus e preparações purificadas do vírus. Como controle utilizou-se suco de folha sadia de fumo.

Primeiramente, verificou-se a reação do antissoro contra suco infetado e suco sadio. Depois, avaliou-se o título do antissoro obtido, que foi diluído em solução de NaCl a 0,85% (p/v) ou em soro normal nas proporções de 1:1, 1:2, 1:4 etc. O antígeno foi colocado no orifício central e as diluições do antissoro nos orifícios periféricos. As placas foram incubadas em câmara úmida e após 48 horas foram feitas as leituras.

Testaram-se algumas alterações nos testes sorológicos, objetivando obter reações mais nítidas, tais como:

- a) variação do intervalo entre colocação do antígeno e do antissoro;
- b) variação no tamanho, número e distância dos orifícios centrais e periféricos;
- c) adição ao antígeno de SDS a 3% na proporção de 1:1 (p/v).

Essas modificações foram comparadas com os procedimentos padrões já descritos atrás.

2.9. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

2.9.1. "Leaf-dip"

Para confirmar a infecção pelo vírus em plantas vindas do campo ou inoculadas em condições de casa-de-vegetação, foram feitos, sempre que necessário, exames ao microscópio eletrônico de pedaços de tecido, pelo método de "leaf-dip" (Kitajima, 1965).

2.9.2. Exame de preparações semi-purificadas ou purificadas

Para o exame de preparações semi-purificadas ou purificadas ao microscópio eletrônico utilizou-se método semelhante ao "leaf-dip". As telinhas de cobre, previamente tratadas com Formvar a 1%, foram emergidas em gotas de preparação purificada ou semi-purificada. Após um minuto, retirou-se o excesso de líquido com papel filtro e colocou-se a tela em uma gota de água, secando-se a mesma a seguir, em papel de filtro. Esse procedimento foi repetido por três vezes e, então, imergiu-se a telinha em Silicotungstato de Sódio a 1%, esperando-se cerca de 60 segundos. Por fim, retirou-se o excesso de líquido com papel filtro, estando as telinhas prontas para serem examinadas ao microscópio eletrônico (Kitajima, comunicação pessoal).

2.9.3. Exame de secções ultrafinas

Para verificar as alterações celulares induzidas pelo vírus utilizaram-se folhas de plantas de pimentão 'Gigante Quadrado' cerca de 15 dias após a inoculação com os isolados.

Os tecidos foram cortados em pedaços de 1 a 2 mm, e colocados em paraformaldeído a 2% + glutaraldeído a 2%, em tampão cacodilato a 0,05 M, pH 7,2 por 2 - 3 horas sob vácuo, à temperatura ambiente. Os tecidos foram, então lavados por três

vezes durante 15 minutos em tampão cacodilato de sódio, sendo pós fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato a 0,05 M, à temperatura ambiente, por 1 - 2 horas. Então, o tecido foi lavado com tampão cacodilato e transferido para solução aquosa de acetato de uranila a 0,5%, durante uma noite. O tecido foi desidratado em série crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) por aproximadamente 15 minutos. Na solução pura, efetuaram-se três trocas. O tecido foi passado para uma fase intermediária (acetona 1:1 Spurr e Spurr puro), na qual permaneceu por três a quatro horas. Após isso o tecido foi infiltrado com resina pura por uma noite. Na manhã seguinte colocou-se o tecido no molde, trocando-se a resina, na qual se polimerizou, a 70°C por uma noite. Os cortes foram executados em ultramicrótomo LKB 8000 Ultratome III-Bromme, equipado com navalha de diamante, sendo coletados em telinhas e contrastados com acetato de uranila a 2% (Karnowsky modificado).

2.10. LEVANTAMENTO DA INCIDÊNCIA DO VÍRUS ESTUDADO NO DISTRITO FEDERAL

Avaliou-se a incidência de mosaico em lavouras de pimentão e tomate no DF no ano de 1986.

Para o levantamento as amostras foram coletadas, adotando-se o seguinte procedimento: antes de sair para a coleta propriamente dita os escritórios locais da EMATER/DF foram contatados para verificação das áreas que apresentavam problemas de viroses.

Após selecionadas as áreas realizaram-se as inspeções de campo. Ao chegar à lavoura a mesma era percorrida e amostras de folhas de plantas com sintomas de mosaico eram coletadas

Ao chegar no laboratório as amostras eram inoculadas em grupos de plantas hospedeiras composto por D. stramonium,

N. tabacum 'TNN' ou 'Turkish', pimentão 'Ruby King', 'Magda', 'Jóia', 'Agrônômico 10G', 'Margareth', 'Itaipu', N. physaloides e tomate 'Santa Cruz'.

Pela sintomatologia apresentada pelas hospedeiras, selecionavam-se amostras suspeitas de conterem o vírus estudado, que eram testadas por sorologia e examinadas ao microscópio eletrônico.

III. RESULTADOS

3.1. ISOLAMENTO, MANUTENÇÃO E PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS DO VÍRUS

Os quatro isolados do vírus foram obtidos através da passagem sucessiva do vírus em plantas-testes de fumo 'TNN', por transmissão com o inseto vetor M. persicae e por inoculação mecânica. A reação obtida nessa planta-teste foi uniforme para cada um dos isolados, no decorrer dos experimentos.

Os quatro isolados testados foram mantidos em plantas de fumo 'TNN', ao abrigo de contaminação em casa - de-vegetação do tipo telado. Esse método se revelou bastante prático, não se observando perda da patogenicidade dos isolados para plantas de pimentão ou tomate. Mostrou-se eficiente o método de preservação do vírus em folhas desidratadas, sendo possível a recuperação dos 4 isolados até o último teste feito, cerca de 210 dias após o tratamento do tecido, mantido a 4°C em vidros de 5 ml em recipiente com sílica gel.

3.2. CÍRCULO DE HOSPEDEIRAS

Os quatro isolados só infetaram 12 espécies botânicas, onze da família Solanaceae e uma Chenopodiaceae. Por outro lado 25 outras espécies pertencentes as famílias Aizoaceae, Apiaceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, Cichoraceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Malvaceae, Portulaccaceae e Solanaceae não foram infetados por nenhum dos isolados testados (Tabela 3).

As reações apresentadas pelas espécies que se infetaram são descritas a seguir.

Tabela 3. Espécies testadas que não se infetaram com o potyvirus*.

Hospedeira

Aizoaceae

Tetragonia expansa Thunb.

Apiaceae

Daucus carota L. 'Nantes'

Petroselinum crispum Hoff. 'Lisa Comum'

Brassicaceae

Brassica napus 'Topo Roseo'

B. oleracea var. acephala DC. - 'Couve-manteiga'
'Gongarsol'

B. oleracea var. botrytis L.

B. oleracea var. capitata 'Chato de Quintal'

B. oleracea var. gongylodes 'Branca Gigante'

B. oleracea var. italica 'Ramoso Santana'

Eruca sativa Mill.

Raphanus sativus L. 'Redondo'

Chenopodiaceae

C. murale L.

C. quinoa Willd.

Cichoriaceae

Cichorium endivia L. 'Pão de Açúcar'

Lactuca sativa L. 'Babá', 'Boston Branca'

Cucurbitaceae

Cucumis sativus L. 'Melão Amarelo'

C. anguria 'Maxixe'

Cucurbita pepo (L.) Alef. 'Seca CAC Melhor'.
'Caserta'

Fabaceae

Pisum sativum L. 'Torta Flor Roxa'

Vigna unguiculata (L.) Walp. 'Seridó'

Malvaceae

Sida spp.

Cont...

Tabela 3. Cont... Fl. 02.

Hospedeira

Portulaccaceae

Portulacca spp. L.

Solanaceae

Datura stramonium L.

Solanum gilo Reddi 'Verde Claro', 'Verde Escuro',

S. melongena L. 'Embu', 'Comprida', 'Roxa Preco -
ce' e 'Italiana Comprida'

S. tuberosum L. 'Achat'

* Os testes de recuperação, feitos a partir de folhas inoculadas e não inoculadas, foram todos negativos.

C. amaranticolor Costa & Reyn mostrou lesões locais cloróticas que se tornaram necróticas. Quando aparecerem essas lesões foram erráticas e em pequeno número (2 - 4 por folha).

D. metel L. reagiu na forma de necrose sistêmica das folhas novas e morte do ponto de crescimento, de maneira também errática.

N. bigelovi apresentou redução do crescimento e amarelecimento, 21 dias após a inoculação.

N. debney Domin mostrou redução do crescimento, clareamento das nervuras (8 - 9 dias), encarquilhamento foliar (16 dias), manchas cloróticas (16 dias) (Figura 1).

N. glutinosa L. reagiu na forma de clareamento das nervuras e manchas cloróticas (Figura 1).

N. physaloides Gaertn apresentou mosaico das nervuras, 9 a 14 dias após a inoculação (Figura 1).

N. rustica L. mostrou clareamento das nervuras (9 - 12 dias) e mosaico (14 dias) (Figura 2).

N. tabacum L. 'TNN' apresentou, inicialmente, clareamento das nervuras (5 - 7 dias), seguido de riscas necróticas e mancha de pérola ou murcha das folhas inferiores e redução do crescimento (Figura 2).

N. tabacum L. 'Turkish' mostrou murcha e mancha de pérola 10 - 15 dias após a inoculação (Figura 2).

N. tabacum L. 'Xanthi NC', 'Xanthi NM', 'Judy's Pride' 'Sansun' apresentaram sintomas de mancha de pérola e redução do crescimento 10 - 15 dias depois da inoculação.

P. floridana Rydb mostrou murcha, necrose sistêmica e morte das plantas 6 - 13 dias após a inoculação (Figura 2).

S. gilo Reddi não se constataram sintomas visíveis nas cultivares testadas, mas o vírus foi recuperado de uma das cultivares ('Redondo Verde Escuro').



Figura 1. Reação de hospedeiras aos quatro isolados do vírus. N. glutinosa. A) sadia, B) com clareamento das nervuras e C) com mosqueado suave e manchas cloróticas; N. debney D) sadia e E) com encarquilhamento e manchas cloróticas; N. physaloides; F) sadia e G) com mosaico das nervuras.

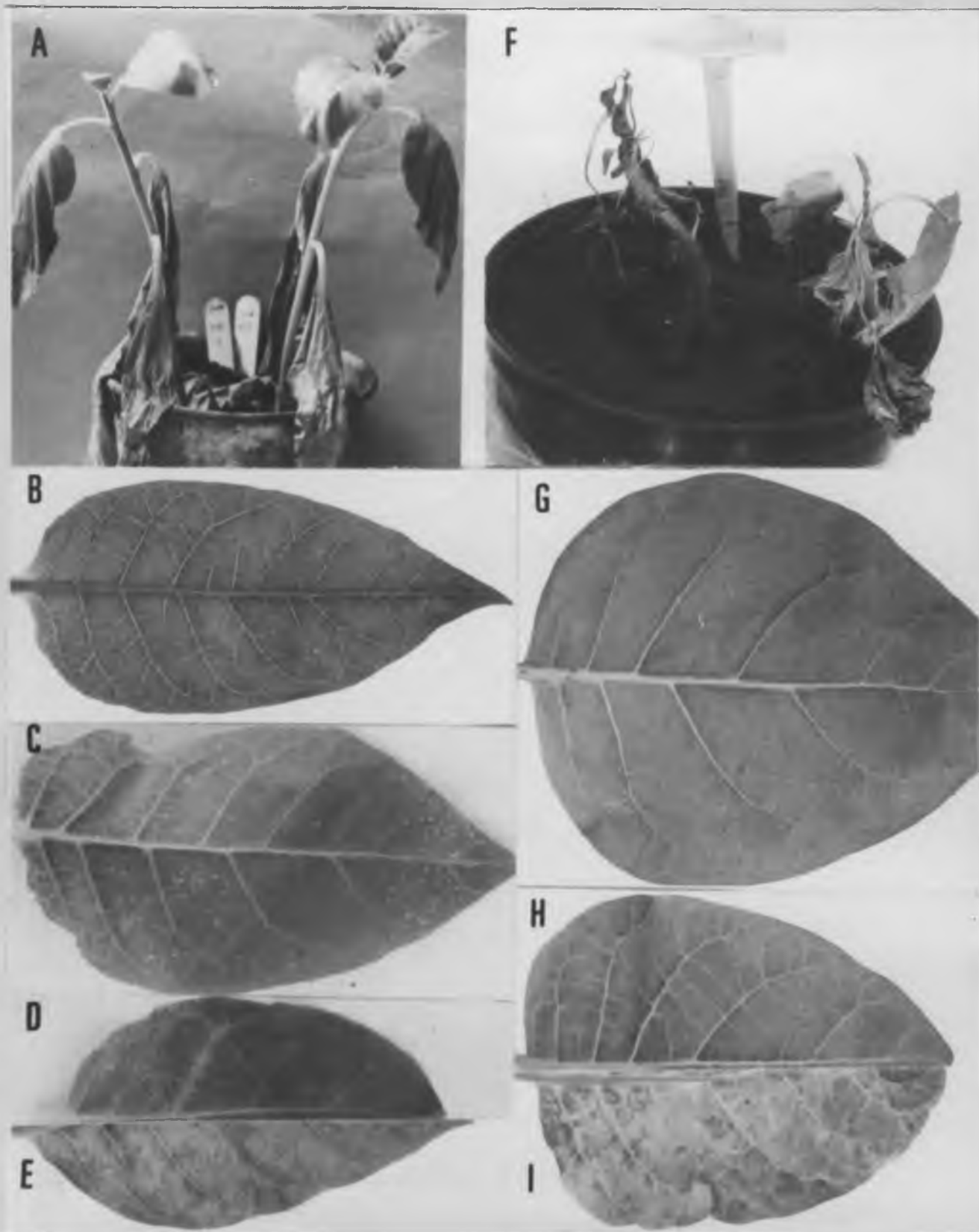


Figura 2. Reação de algumas hospedeiras aos isolados do vírus N. tabacum 'Turkish' A) com murcha das folhas baixas; N. tabacum 'TNN' B) sadio, C) com clareamento das nervuras, D) meia folha com risca necrótica e E) meio folha com mosqueado suave; P. floridana F) com murcha e necrose sistêmica; N. rustica G) sadia, H) meia folha com clareamento das nervuras e I) meia folha com mosaico.

3.3. REAÇÃO DE Capsicum AO VÍRUS

As 79 cultivares e introduções de Capsicum testadas apresentaram reações variando desde imunidade e infecção latente até sintomas de mosaico, redução do crescimento, mosaico necrótico ou morte das plântulas (Figuras 3 e 4).

EXPERIMENTO 1

Neste experimento, avaliou-se a reação de alguns genótipos de Capsicum aos quatro isolados do vírus em estudo. As plantas foram inoculadas mecanicamente, sendo o inóculo extraído de fumo 'TNN'. Como controle utilizaram-se plantas de fumo 'TNN'.

'Agrônômico 11', C. frutescens, 'Itaipu', 'Jóia', 'Magda', 'Margareth', 'Quadrado Verde' não se infetaram com nenhum dos isolados do vírus. 'Casca Dura-Ikeda', 'Pimentão Gigante Quadrado', 'Ruby King', 'Vermelho Gigante', 'Yolo Y', 'Yolo Wonder' e PI 264281 mostraram sintomas de mosaico. 'Avelar' apresentou necrose de haste e foi possível recuperar o vírus.

EXPERIMENTO 2

Testaram-se 72 variedades e introduções de Capsicum sendo que 13 mostraram-se imunes, 7 resistentes, 24 moderadamente resistentes, 9 moderadamente suscetíveis, 15 suscetíveis e 4 muito suscetíveis aos isolados UnB-1 e UnB-27 (Tabela 4).

'Itaipu', 'Jóia', 'Magda', 'Margareth', 'Quadrado Verde', CNPH 49 L. 41, L. 45, L. 46, L. 48, L. 49 e L. 50, CNPH 148 e CP 83 mostraram-se imunes aos 2 isolados.

CNPH 49, L. 42, L. 43, L. 44 e L. 47; CNPH 187 e 192 foram resistentes aos 2 isolados.

'Agrônômico 10G', 'Casca Dura Guapiara', 'Pimentão Doce Comprido para Conserva', 'Ruby King', CNPH 144, CNPH 162, CNPH 180, CNPH 184, CNPH 185, CNPH 189 (M), CNPH 196; CP 5, CP 6, CP 7, CP 8, CP 9, CP 11, CP 12, CP 14, CP 16, CP 32, CP 54 e CP 81 comportaram-se como moderadamente resistentes.

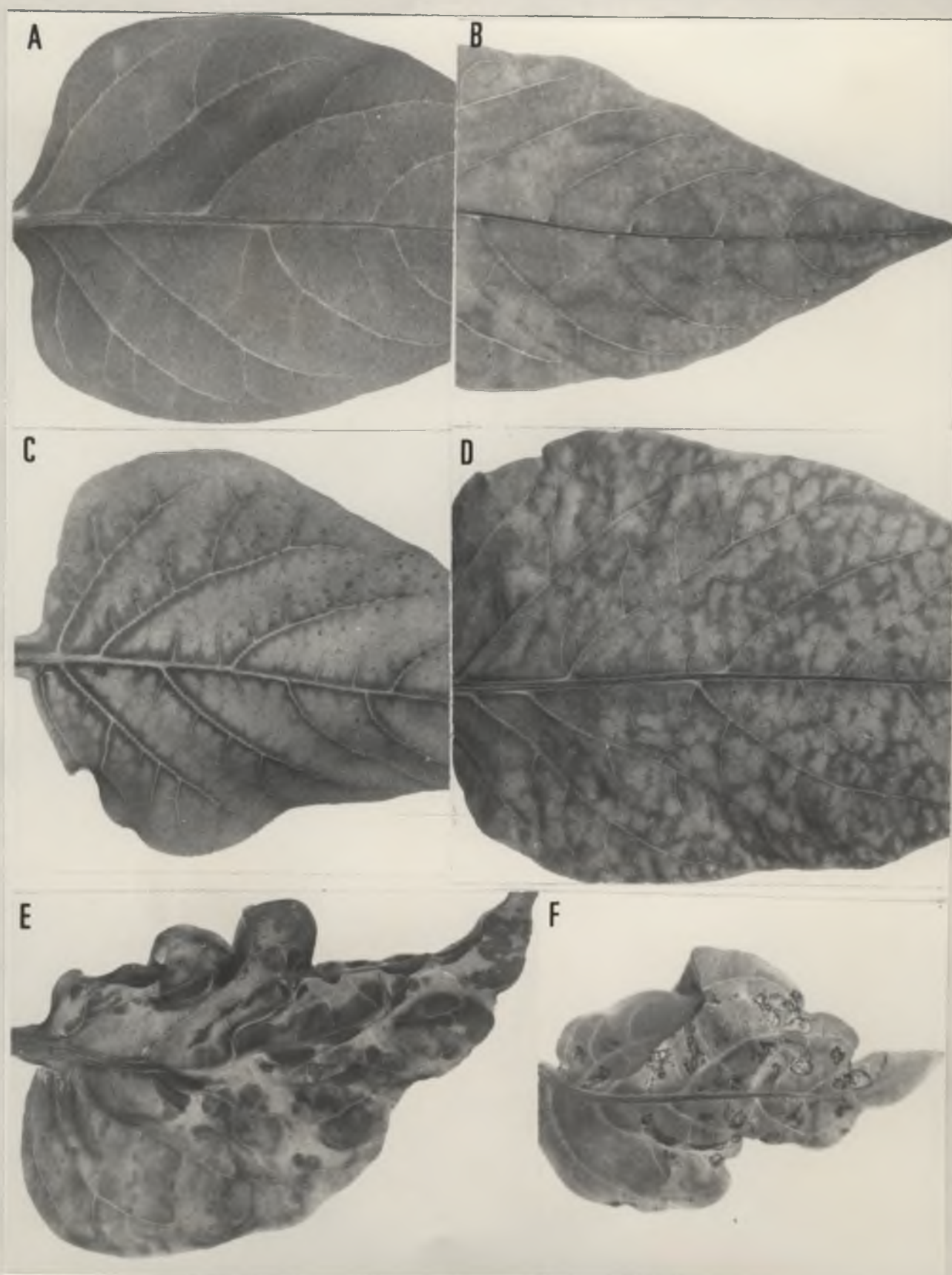


Figura 3. Reação de cultivares e introduções de Capsicum ao vírus. A) 'Margareth' sem sintomas aparentes (imune ou resistente); B) 'Agrônômico 10G' com mosaico fraco (moderadamente resistente); C) 'CNPH 50 L. 29' com faixa das nervuras ou D) 'Casca Dura-Ikeda' com mosaico conspícuo infetado com isolado UnB-27 (medianamente suscetíveis); E) 'Casca Dura-Ikeda' com mosaico rugoso, embolhamento e deformação foliar, infetado com isolado UnB 1 (suscetível); F) 'CNPH 150' com mosaico necrótico (muito suscetível).

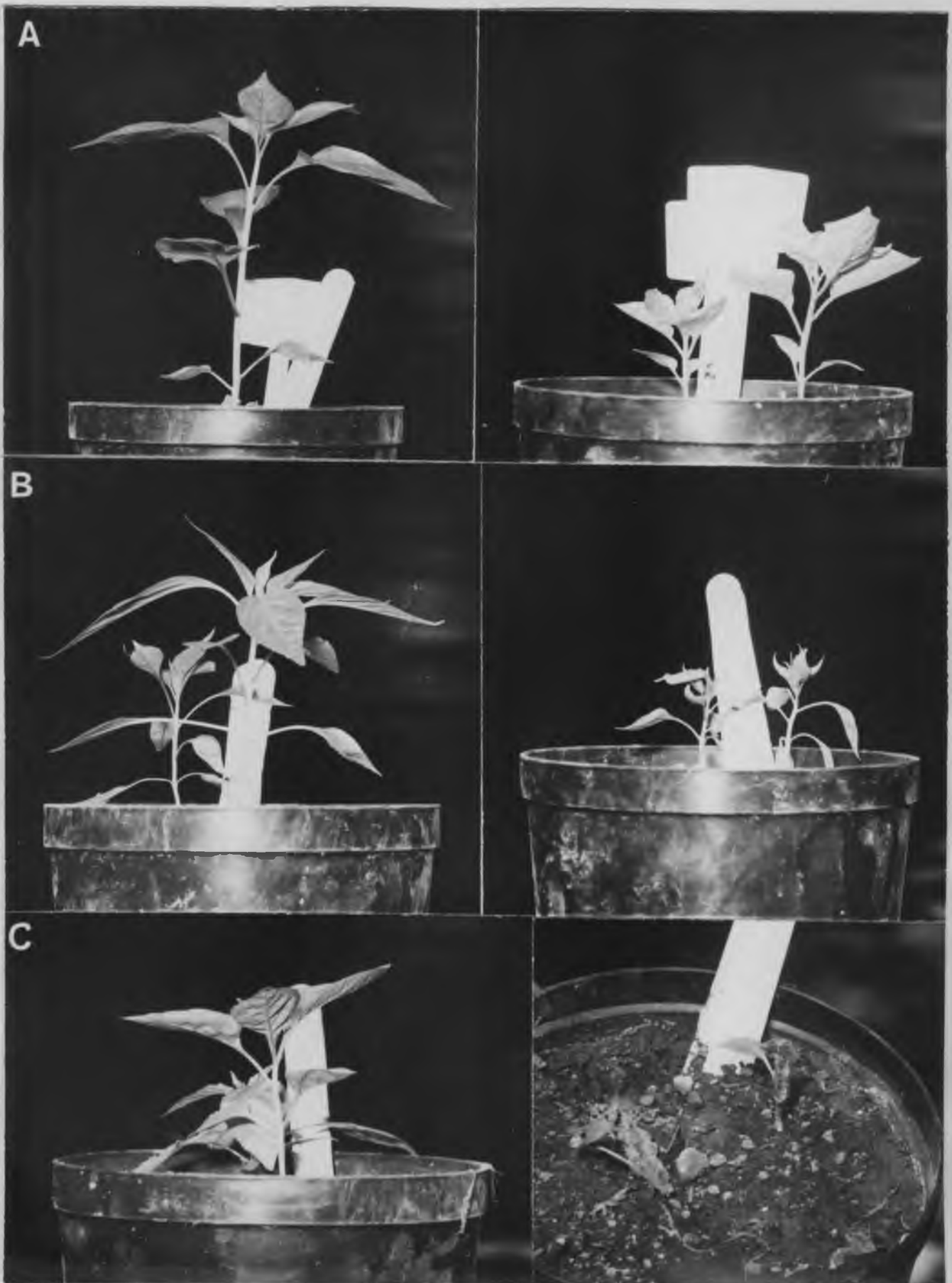


Figura 4. Redução no crescimento causado pelo vírus em Capsicum, observada 30 dias após a inoculação. Plantas à esquerda sadias; à direita infetadas. A) 'CNPH 50 L. 24' com isolado UnB-1, B) 'CP 10' com isolado UnB-27 e C) 'CP 65' com isolado UnB-27.

Tabela 4. Reação de Capsicum spp. aos isolados UnB-1 e 27 do vírus.

Genótipo	Média das notas dadas por linhagem ou cultivar para cada isolado testado	
	UnB-1	UnB-27
<u>Capsicum annuum</u>		
'Agrônômico 10G' (Agroceres lote 211398)	2,0*	2,0
'Agrônômico 10G' (Agroceres lote 221398)	3,0	2,0
'Agrônômico 10G' (Horticeres)	2,2	2,0
'Casca Dura Guapiara'	0,9	1,6
'Casca Dura - Ikeda'	4,0	3,6
'Doce Comprido para Conserva'	2,0	2,0
'Gigante Quadrado'	4,0	4,0
'Itaipu'	0,0	0,0
'Jóia'	0,0	0,0
'Magda'	0,0	0,0
'Margareth'	0,0	0,0
'Quadrado Verde'	0,0	0,0
'Ruby King'	2,4	1,2
<u>C. baccatum</u> var. <u>pendulum</u>		
CNPH** 49 - L. 41	0,0	0,0
L. 42	0,3	1,0
L. 43	1,0	1,0
L. 44	1,0	0,6
L. 45	0,0	0,0
L. 46	0,0	0,0
L. 47	1,0	1,0
L. 48	0,1	0,0
L. 49	0,0	0,0
L. 50	0,0	0,0
CNPH 50 - L. 22	4,0	4,0
L. 23	4,0	4,0
L. 24	4,0	3,6
L. 25	4,0	4,0
L. 26	4,0	4,0
L. 27	4,0	4,0
L. 29	4,0	4,0
L. 30	4,0	4,0

cont...

Tabela 4 - Cont.. Fl. 02

Genótipo	Média das notas dadas por linhagem ou cultivar para cada isolado testado	
	UnB-1	UnB-27
<u>C. frutescens</u>	0,0	0,0
<u>Capsicum spp.</u>		
'Ardida de Cayenne'	4,0	4,0
'Chapéu de Bispo'	3,0	2,0
CNPH 144	1,6	1,8
CNPH 146	3,2	2,5
CNPH 147	3,0	3,0
CNPH 148	0,0	0,0
CNPH 150	4,5	5,0
CNPH 151	4,0	4,0
CNPH 162	2,8	2,0
CNPH 166	4,0	3,5
CNPH 180	2,4	2,1
CNPH 184	2,1	2,5
CNPH 185	2,2	2,0
CNPH 187	1,2	1,3
CNPH 189 (M)	1,6	0,8
CNPH 190	3,7	3,0
CNPH 191	4,0	3,4
CNPH 192	0,2	0,5
CNPH 196	2,0	2,0
CNPH 594	2,0	3,5
CP 5**	2,0	2,0
CP 6	2,0	2,0
CP 7	2,0	2,0
CP 8	2,0	2,0
CP 9	2,0	2,0
CP 10	3,0	3,0
CP 11	2,0	2,0
CP 12	2,0	2,0
CP 14	2,0	2,0
CP 16	3,0	3,0
CP 32	2,0	2,0
CP 54	1,9	1,6
CP 63	2,8	2,4

cont...

Tabela 4 - Fl. 03.

Genótipo	Médias das notas dadas por linhagem ou cultivar para cada isolado testado	
	UnB-1	UnB-27
<u>Capsicum spp (cont...)</u>		
CP 65	5,0	5,0
CP 67	5,0	5,0
CP 68	5,0	4,9
CP 72	4,0	4,0
CP 81	2,0	2,0
CP 83	0,0	0,0

* 0 = imune, 1 = resistente, 2 = moderadamente resistente, 3 = moderadamente suscetível, 4 = suscetível, 5 = muito suscetível.

** CNPH = Sementes obtidas no Centro Nacional de Pesquisas de Hortaliças; CP = sementes multiplicadas em campo na Estação Experimental de Biologia (UnB).

As demais variedades e introduções mostraram-se suscetíveis e muito suscetíveis aos isolados testados.

Não se constataram diferenças marcantes nas reações das variedades e introduções aos dois isolados. Geralmente o isolado UnB-1 apresentou sintomas mais fortes em Capsicum do que o isolado UnB-27.

3.4. REAÇÃO DE Lycopersicon spp.

A maioria dos genótipos de Lycopersicon apresentou sintomas de clareamento das nervuras, mosaico, redução do crescimento e encarquilhamento foliar 12 - 15 dias após a inoculação. Porém alguns mostraram necrose das folhas 15 dias após a inoculação e outros protuberâncias nas folhas. Outros Lycopersicon não mostraram nenhum sintoma quando inoculados com o vírus (Figura 5).

Testaram-se 70 genótipos de Lycopersicon (Tabela 5), sendo que apenas P.I. 126410 e P.I. 306811 não mostraram sintomas quando inoculados com os isolados do vírus em estudo. Os quatro isolados foram recuperados de P.I. 126410. A P.I. 306811 permitiu a recuperação dos isolados UnB-1 e 17 e mostrou-se imune aos isolados UnB-27 e 32.

Plantas da introdução LA 444-1 apresentaram protuberâncias nas folhas sendo o vírus recuperado apenas de plantas inoculadas como os isolados UnB-27 e 32.

A maioria das plantas de 'Sweetie' testadas não mostraram sintomas, porém permitiram a recuperação do vírus, algumas plantas mostraram mosaico fraco.

Os demais genótipos mostraram-se moderadamente suscetíveis ou suscetíveis havendo diferenças na intensidade dos sintomas apresentados, que variaram de mosaico e leve redução do

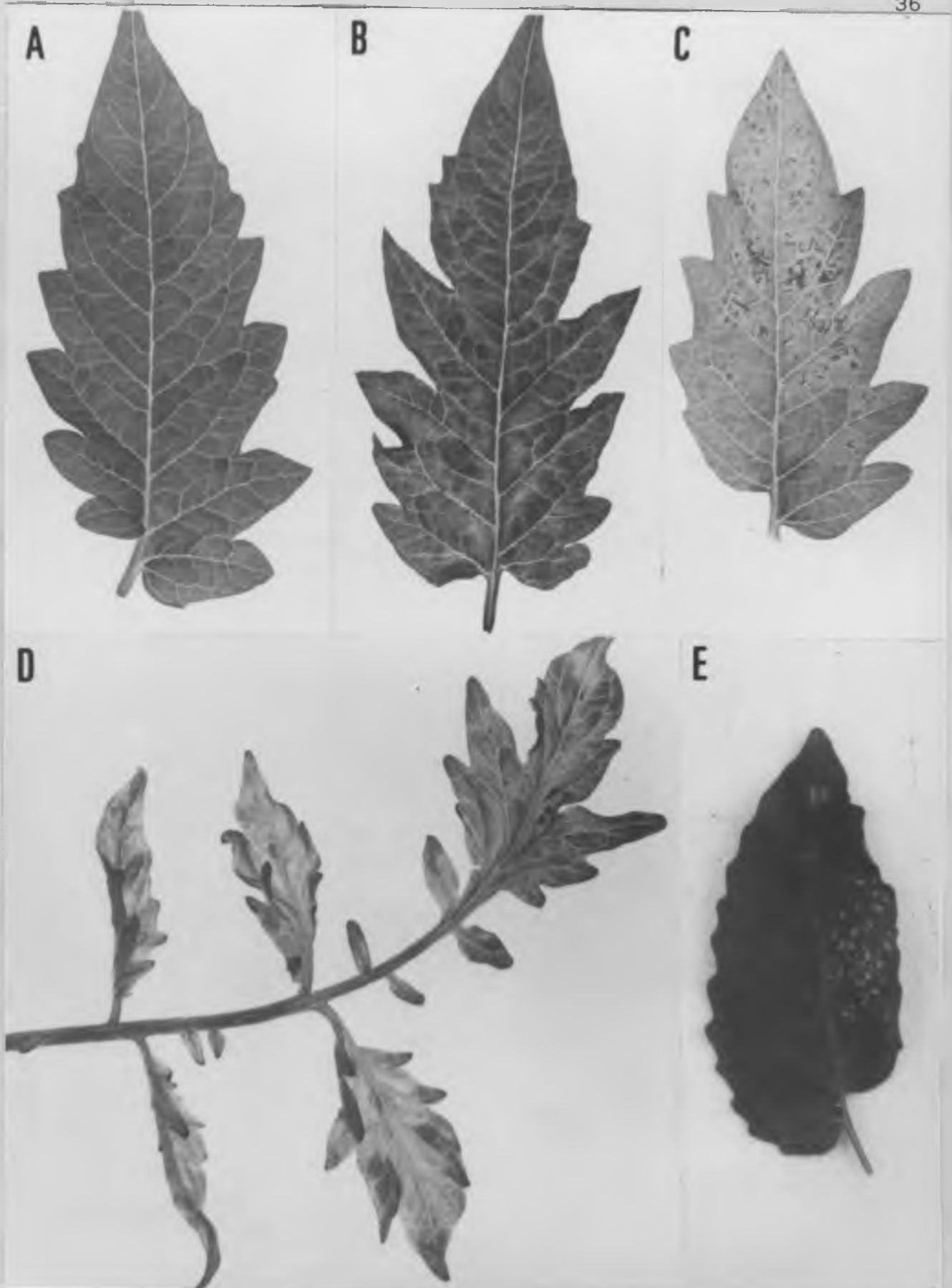


Figura 5. Reação de Lycopersicon ao vírus. A) folíolo sadio, B) folíolo com mosaico, C) folíolo com necrose, D) folha com mosaico e encarquilhamento e E) folíolo com protuberâncias.

Tabela 5. Reação de Lycopersicon spp. aos 4 isolados do vírus.

Genótipo	Média das notas obtidas na avaliação da reação de 5 plantas inoculadas por linhagem para cada um dos isolados testados			
	UnB-1	UnB-17	UnB-27	UnB-32
Acess	3*	3	2	3
Americana	3	3	2	3
Ângela Gig. I 5100	2	2	3	2
Beefsteak	3	2	2	3
Better Boy	3	3	3	3
Campbell 34	3	2	2	3
Caraíba	3	2	2	3
Cherry	2	2	2	3
Colorado Ag-05	3	2	3	3
Earliana	3	3	2	3
Fireball	3	3	3	3
Flora-dade	3	3	3	3
Floramérica	3	3	3	3
Fuji	2	3	3	3
Gaúcho Comum	3	3	2	2
Gigante Orita	3	3	3	3
Heinz 1439	3	3	3	3
Hiper	3	2	2	3
Imperador	3	2	2	3
Improved Porter	3	2	3	-
IPA 1	3	2	3	3
IPA 2	2		2	2
IPA 3	3	2	2	3
IPA 4	3	2	2	2
Jubille	3	3	2	3
Kazue	3	2	2	3
Marglobe	3	2	3	3
Marglobe Extra	3	3	2	3
Miguel Pereira	3	2	3	2
Neide	3	2	3	3
Olho Roxo IPA	3	3	3	3
1168	3	3	3	3
Patio	2	2	3	2
Petomech	3	3	3	3
PI 126410	1	1	1	1
PI 126408-6	3	2	2	3
PI 128659/80	2	1	3	1

Cont...

Tabela 5. Cont... Fl. 02.

Genótipo	Média das notas obtidas na avaliação da reação de 5 plantas inoculadas por linhagem para cada um dos isolados testados			
	UnB-1	UnB-17	UnB-27	UnB-32
PI LA 444-1	0	0	1	1
PI 306811	1	1	0	0
PI 732293 2V	2	3	2	3
Red Cherry Small	3	2	2	2
Roma	3	2	3	3
Rutgers	3	2	3	3
Salada Floradel	3	2	3	2
Salada Tropic	3	2	2	2
San Marzano	3	2	3	2
Sandra	3	3	3	3
Sta. Cruz (EUA)	2	2	2	2
Sta. Cruz-Iguaçu	3	2	2	2
Sta. Cruz Kada Gig.	3	3	2	3
Santa Rita	3	2	2	3
Sto. Antônio	3	3	3	3
Sto. Camesim	2	2	2	2
São Sebastião	3	3	3	3
Sheyenne	2	2	3	3
Super Sioux	3	2	3	3
Sweetie	1	1	1	1
Tomate Comum	3	3	2	3
Tomate Maravilha do mercado	3	2	2	2
Tomate p/mercado XP 5200	3	3	3	3
Top Seed Especial para salada	3	3	3	2
VF-270	3	3	3	3
Walter	3	3	2	3
Willanete	3	3	3	3
Yokota	3	3	2	3

* 0 = imune; 1 = resistente; 2 = moderadamente resistente;
3 = suscetível.

crescimento e encarquilhamento ou necrose foliar.

3.5. TRANSMISSÃO DO VÍRUS

3.5.1. Transmissão pela semente.

a) Pimentão

O vírus (isolado UnB-1) não foi transmitido pela semente de plantas infetadas de pimentão 'Agrônômico 10G', tendo sido negativos os testes feitos com 640 sementes de plântulas originadas dessas sementes, não foi recuperado o vírus por inoculação mecânica.

b) Tomate

Não houve transmissão do vírus para nenhuma das plântulas testadas, originárias de 420 sementes colhidas de plantas infetadas de 'Santa Cruz Kada Gigante', tendo sido negativos os testes de recuperação do vírus.

3.5.2. Transmissão por afídio.

a) Avaliação da transmissão dos quatro isolados do vírus pelo afídio M. persicae

Houve diferença na eficiência de transmissão dos quatro isolados. Os isolados UnB-1 e 32 foram transmitidos mais eficientemente que UnB-17 e 27 (Tabela 6), quando se utilizou 'Ruby King' como planta-teste.

3.6. PROPRIEDADES FÍSICAS 'IN VITRO'

Os isolados apresentaram diferenças nas propriedades físicas 'in vitro'.

Tabela 6. Transmissão dos quatro isolados do vírus por M. persicae*.

Percentagem de plantas de pimentão 'Ruby King' infetadas de um total de 8 testadas					
Isolado nº	UnB-1	UnB-17	UnB-27	UnB-32	CK
	62,5	25,0	25,0	62,5	00,0

*Acesso de aquisição = 20 min
 Acesso de inoculação = 30 min
 6 pulgões/planta-teste.

Os isolados UnB-1, 17 e 32 apresentam uma longevidade entre 4 e 8 dias, enquanto o isolado 27 manteve-se ativo entre 1 e 2 dias.

Os isolados UnB-1 e 32 toleraram uma diluição de 10^{-4} a 10^{-5} , o isolado UnB-17 de 10^{-5} a 10^{-6} e o 27 superior a 10^{-6} .

Quanto ao ponto termal de inativação os isolados UnB-1, 17 e 32 resistiram a temperaturas entre 55°C - 60°C , enquanto o isolado UnB-27 resistiu até a faixa de 50 - 55°C (Tabela 7).

3.7. PURIFICAÇÃO DO VÍRUS

Foram infrutíferas as inúmeras tentativas de purificar o vírus utilizando o método de Delgado-Sanchez & Grogan (1966b). Passou-se, então, a utilizar o método empregado por Marinho et al. (1984) para a purificação de outro potyvirus. Antes da colocação no gradiente de sacarose, a preparação parcialmente purificada foi observada ao microscópio eletrônico. A mesma mostrou um número razoável de partículas, porém após o gradiente não se obteve banda infetiva.

Utilizou-se com bons resultados, um método baseado naquele empregado por Ávila et al. (1986) para purificação de PVY proveniente de batata. As plantas de fumo passaram a ser inoculadas mais jovens, 15 - 20 dias após o transplante, apresentando 5 - 6 folhas, sendo colhidas para a purificação 21 dias após a inoculação. Aumentou-se o número de plantas inoculadas e passou-se a utilizar em torno de 100 vasos com 2 plantas, obtendo-se em média 500 gramas de folhas.

As folhas foram homogeneizadas em liquidificador na presença de tampão fosfato a 0,2 M, pH 8,0 contendo 0,01 M de

Tabela 7. Propriedades físicas "in vitro" dos 4 isolados do vírus.

Isolado nº	UnB-1	UnB-17	UnB-27	UnB-32
Propriedades físicas				
Longevidade (dias)	4 a 8 (2/4)*	4 a 8 (2/4)	1 a 2 (3/4)	4 a 8 (1/4)
Ponto final de diluição	10^{-4} a 10^{-5} (3/4)	10^{-5} a 10^{-6} (2/4)	$>10^{-6}$ (1/4)	10^{-4} a 10^{-5} (1/4)
Ponto termal de inativação (°C)	55 a 60 (4/4)	55 a 60 (4/4)	50 a 55 (4/4)	55 a 60 (4/4)

* Plantas infetadas/plantas inoculadas.

EDTA e 0,2% de mercaptoetanol na proporção 1:2 (p/v). As folhas foram trituradas por 2 minutos no liquidificador, sendo o homogeneizado filtrado através de uma camada de gaze (Figura 6).

Para a clarificação o homogeneizado foi centrifugado a 6000 rpm por 25 minutos em rotor GSA na centrífuga Sorvall modelo RC-5 à temperatura na faixa de 10-15°C. O precipitado foi descartado e ao sobrenadante, adicionou-se 1% de Triton X-100 e deixou-se o mesmo sob agitação constante por duas horas a 10-15°C.

Em seguida, o material foi centrifugado a 6000 rpm por 15 minutos em rotor GSA. O precipitado foi descartado e ao sobrenadante adicionou-se 0,2 M de cloreto de sódio. Após ser esse dissolvido, adicionou-se 4% de polietilenoglicol (PEG, PM 6000) e a preparação foi agitada até à dissolução completa do PEG. Então, o homogeneizado foi mantido em repouso a temperatura ambiente por duas horas.

A preparação foi centrifugada a 6000 rpm por 30 minutos em rotor GSA. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido por uma noite a 10 - 15°C em tampão fosfato a 0,05 M, pH 7,2 contendo 1% de Triton X-100 (1:10 do volume original). Esta solução foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos em rotor SS-34. O sobrenadante foi recolhido, sendo centrifugado à 28.000 rpm por 120 minutos em rotor 30 na ultracentrífuga Beckmann modelo L5-50. O precipitado foi ressuspendido em tampão fosfato a 0,05 M, pH 7,2 contendo 0,001 M de EDTA.

A preparação foi clarificada a 10.000 rpm por 30 minutos em rotor SS-34. Quando a preparação não apresentava coloração branca opalescente era, então, passada em colchão de sacarose a 40.000 rpm, por 180 minutos. Os precipitados obtidos foram ressuspendidos em tampão fosfato a 0,01 M, pH 7,2 contendo 0,001 M de EDTA. A preparação foi centrifugada a 10.000 rpm por 30 minu

Figura 6. Esquema de purificação do vírus, adaptado de Ávila et al. (1986).

Extração: folhas infetadas + tampão fosfato a 0,2 M, pH 8,0 + EDTA a 0,01 M + mercaptoetanol a 0,2% (1:2, p/v)

Triturar por 2 minutos em liquidificador

Filtrar através de gaze

6000 rpm/25 minutos

SN + 1% de Triton X-100 e agitar/2 horas a 10-15 °C

6000 rpm/15 minutos

Ao Sobrenadante adicionar 0,2 M de NaCl e dissolvê-lo, adicionar 4% de PEG e dissolvê-lo. Deixar em repouso à temperatura ambiente por 2 horas.

6000 rpm/30 minutos

Ressuspender o precipitado em tampão fosfato a 0,05 M, pH 7,2 + 1% de Triton X-100 (1/10 do volume original) por uma noite a 10-15 °C.

5000 rpm/10 minutos

Sobrenadante centrifugado a 28000 rpm/120' em rotor 30

Ressuspender o precipitado em tampão fosfato a 0,05 M, pH 7,2 + 0,001 M de EDTA

(cont...)

Figura 6 - Cont... Fl. 02

10.000 rpm/30 minutos

*Colchão de sacarose (20%) a 40.000 rpm/180 minutos em tampão fosfato a 0,01 M, pH 7,2 + 0,001 M de EDTA

Precipitado,
~~ressuspenido~~ e centrifugado a 10.000 rpm/30 minutos

Gradiente de CsCl a 45.000 rpm/18 horas

45.000 rpm/90 minutos

3000 rpm/20 minutos

*A preparação só foi passada no colchão de sacarose, quando não apresentou coloração branca opalescente.

tos em rotor SS-34 e examinada em microscópio eletrônico, marca Jeol para verificação da concentração de partículas.

As preparações apresentando boa concentração de partículas foram colocadas em gradiente de cloreto de céσιο. Sendo centrifugadas a 45.000 rpm por 18 horas em rotor TY 65. Após a centrifugação, a banda formada foi retirada através de punctura do fundo do tubo com uma agulha de injeção. A banda coletada foi diluída com tampão fosfato a 0,01 M, pH 7,2 contendo 0,001 M de EDTA e centrifugada em rotor TY 65 a 45.000 rpm por 90 minutos. Após ressuspendido o precipitado, a preparação foi centrifugada a 3.000 rpm por 20 minutos em rotor SS-34, sendo em seguida levada para leitura em espectrofotômetro Shimadzu double-beam UV-200s da Bausch & Lomb aonde teve sua concentração e pureza avaliadas. O espectro de absorção obtido apresentou-se característico de nucleoproteínas (Figura 7), obtendo-se os picos máximos e mínimos a 260 e 245 - 246 nm, respectivamente. As preparações obtidas para o isolado UnB-1 apresentaram de 1,71 a 5,88 mg de vírus por quilo de folha processada, 6,55% de ARN; $A_{260/280} = 1,24$, $A_{\text{máx}/\text{mín}} = 1,11$ e para o isolado UnB-27 obteve-se de 2,47 a 9,74 mg/Kg, 5,69% de ARN, $A_{260/280} = 1,20$ e $A_{\text{máx}/\text{mín}} = 1,30$.

3.8. SOROLOGIA

Aparentemente, não houve vantagem em utilizar placas com orifício central com 8 mm de diâmetro e 8 furos periféricos com 6 mm de diâmetro. Placas com orifício central de diâmetro igual ao dos periféricos deram os mesmos resultados, quanto à nitidez das linhas de precipitação e velocidade de reação. Passou-se a utilizar rotineiramente o conjunto de 6 furos de 6 mm, sendo o buraco central de igual diâmetro. A colocação do suco da planta

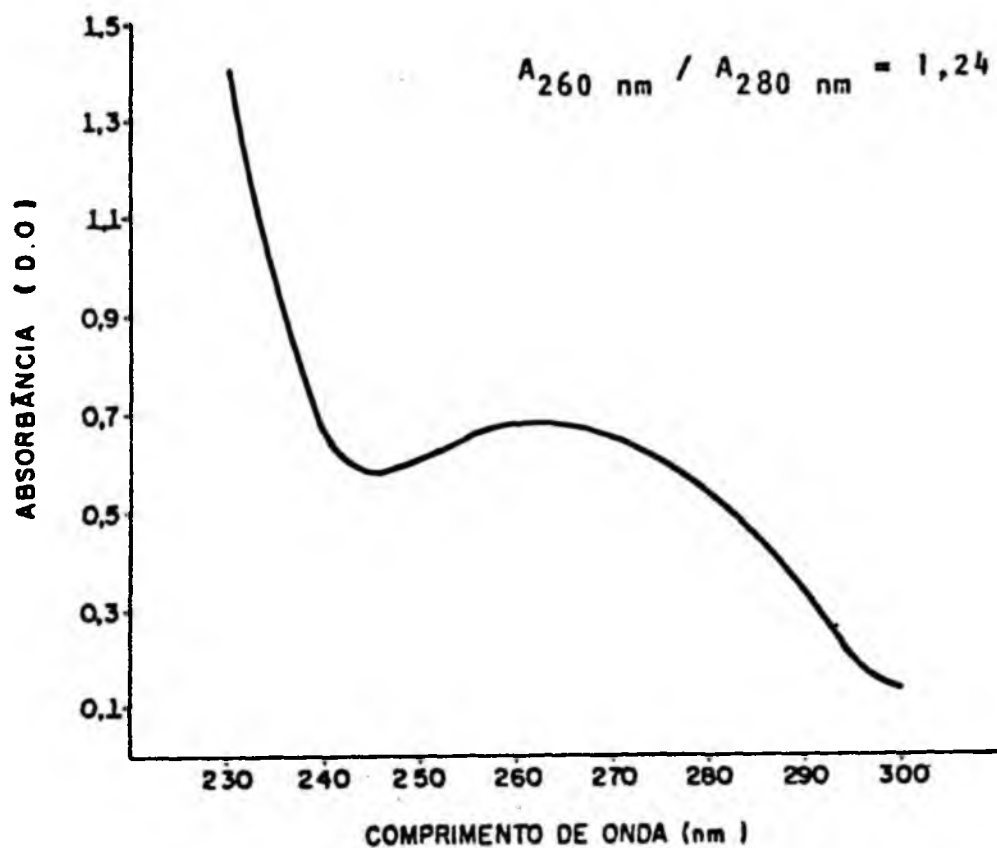


Figura 7. Espectro de absorção de luz ultravioleta para o isolado UnB-1 do vírus purificado a partir de fumo 'TNN'.

antes do antissoro não mostrou vantagem quando comparada com a colocação dos dois na mesma hora. Ao ensaiar antígenos provenientes de suco bruto de fumo, tomate e pimentão tratados com SDS a 3% ocorreu forte reação inespecífica. Sendo assim, rotineiramente utilizou-se nos testes sorológicos a imunodifusão dupla em agar-gel contendo SDS a 0,5% e o antígeno não sendo tratado com SDS a 3%.

O antissoro para o isolado UnB-1 proveniente da primeira sangria, feita 120 dias após o início da sensibilização do coelho ou após a 11ª injeção, apresentou título de 1:2, enquanto o coelho imunizado com o isolado UnB-27 foi sangrado pela primeira vez 90 dias após o início da imunização ou depois da 4ª injeção. O antissoro para este isolado apresentou título de 1:4. Após a injeção de mais vírus o título final dos 2 antissoros subiu para 1:8.

O antissoro para o isolado UnB-1 apresentou uma linha de precipitação fraca em todo o contorno do orifício central, não interferindo, porém, nas leituras dos resultados dos testes sorológicos (Figura 8). O antissoro não reagiu com o suco sadio de 'TNN' e apresentou linhas de precipitação fortes para os antígenos dos isolados UnB-1, 17, 27, 32 e estirpe do PVY^N da batata (Figura 8-A). Ao se intercalar o antígeno para o isolado UnB-1 com os antígenos dos outros isolados (UnB-17, 27 e 32), não houve a formação de esporão (Figura 8-B), demonstrando-se que o relacionamento do isolado UnB-1 como os demais é muito próximo.

Foram positivos os resultados para detecção sorológico do vírus utilizando amostras de pimentão (Figura 8-C) e negativos em amostras de tomate (Figura 8-D). No caso do pimentão ocorreu a formação de linha de precipitina mais próxima do orifício central para o isolado UnB-1 que provavelmente corresponde a reação do antissoro contra a proteína normal da planta. No caso do to

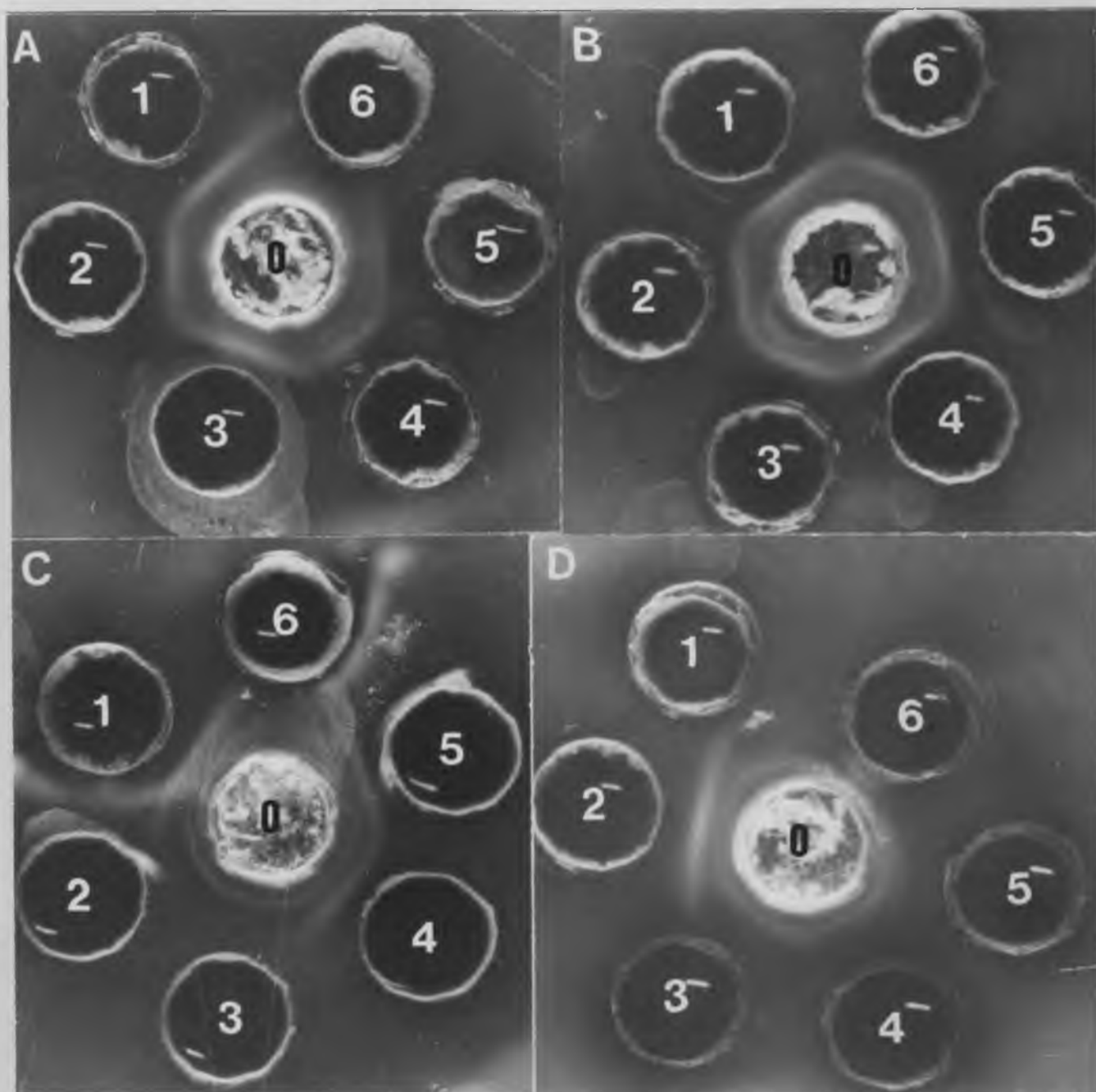


Figura 8. Testes sorológicos com antissoro para o isolado UnB-1. 0 = antissoro para isolado UnB-1 A) 1 = 'TNN' infetado com isolado UnB-1, 2 = 'TNN' com isolado UnB-17, 3 = 'TNN' com isolado UnB-27, 4 = 'TNN' com isolado UnB-32, 5 = 'TNN' com isolado PVY^N obtido em batata (CNPH), 6 = 'TNN' sadio; B) 1, 3 e 5 = 'TNN' com isolado UnB-1, 2 = 'TNN' com isolado 17, 4 = 'TNN' com isolado UnB-27 e 6 = 'TNN' com isolado UnB-32; C) 1 = 'TNN' com isolado UnB-1, 2 = 'Agrônômico 10G' sadio, 3 = 'Vermelho Gigante' sadio, 4 e 5 = 'Vermelho Gigante' infetado com isolado UnB-1, 6 = 'TNN' sadio; D) 1 = 'TNN' sadio, 2 = 'TNN' com isolado UnB-1, 3 e 4 = tomate 'IPA-1' sadio, 5 e 6 = 'IPA-1' infetado com isolado UnB-1.

mate essa linha de reação inespecífica situou-se praticamente na mesma distância do orifício central.

O antissoro para o isolado UnB-27 mostrou-se específico e também não foram constatadas diferenças sorológicas entre os isolados (Figura 9A e B).

Em testes com antissoros para o PVY^O provenientes do CNPH e do Centro Internacional da Batata (CIP) e com antissoro para o PVY^N proveniente do CIP, constatou-se que eles só reagem com os seus respectivos antígenos homólogos. Nenhum dos antissoros testados para os isolados Y^O e Y^N da batata reagiram com os antígenos para os isolados UnB-1, 17, 27 e 32 obtidos de 'TNN' em testes realizados em imunodifusão dupla em agar-gel contendo SDS (Figura 9 C e D). Os 4 isolados do vírus também não reagiram com antissoro para o TEV proveniente da Carolina do Sul (EUA).

3.9. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

3.9.1. "Leaf-dip"

Através desta técnica foi possível visualizar partículas filamentosas, flexuosas, do tipo potyvirus em extratos de folhas infetadas. O número de partículas encontradas sempre foi pequeno o que evidencia a ocorrência do vírus em baixa concentração nas células da hospedeira utilizada para purificação (fumo 'TNN').

3.9.2. Preparações parcialmente purificadas ou purificadas

Ao examinar preparações parcialmente purificadas ou purificadas ao microscópio eletrônico verificou-se elevada concentração de partículas (Figura 10 A e B).

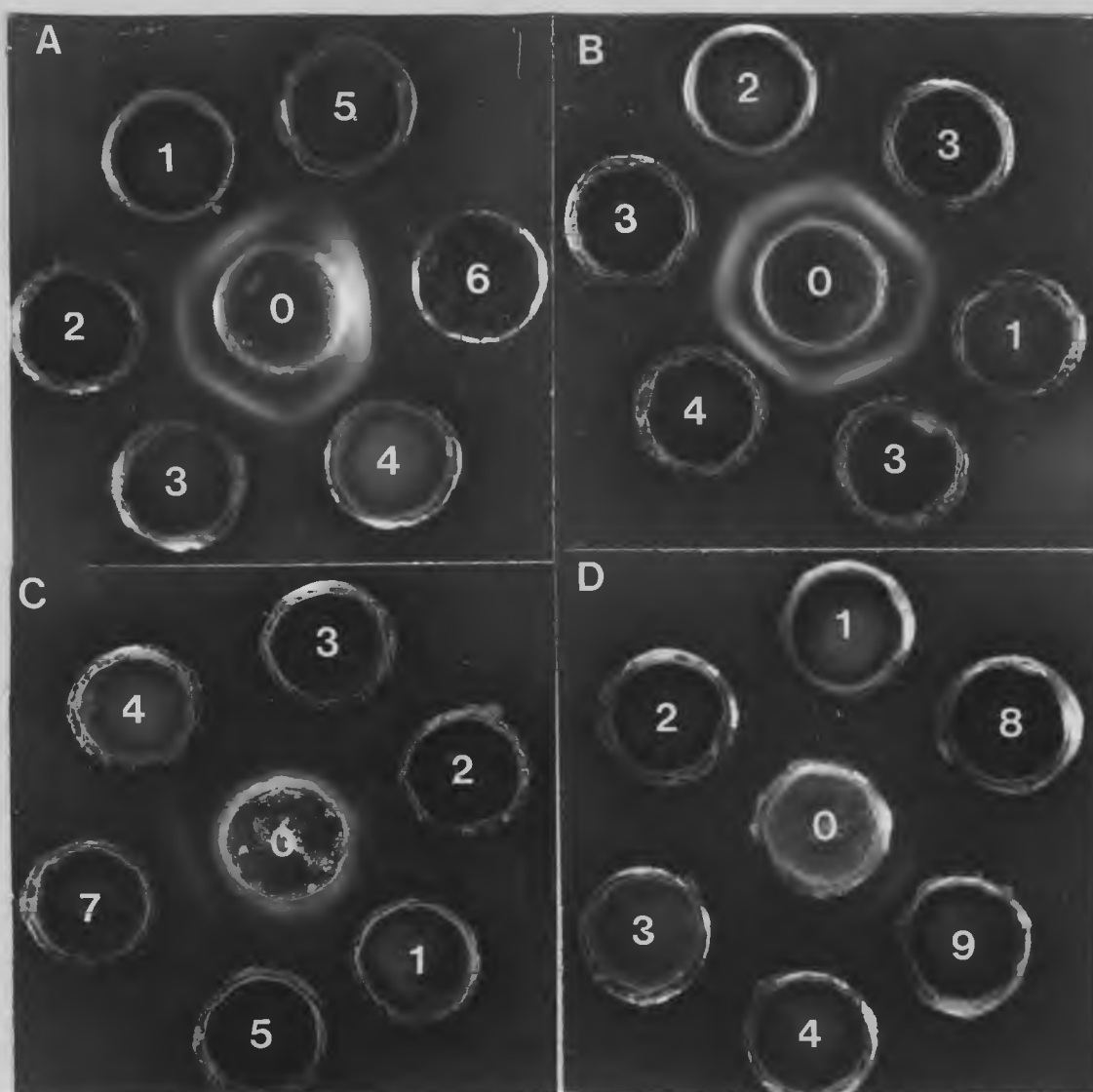


Figura 9. Testes sorológicos com antissoros (As) para os isolados UnB-1 e 27 e estirpes PVY^O e PVY^N da batata. A) e B) 0 = As isolado UnB-27; C) 0 = As PVY^O (CIP e CNPH); D) 0 = As PVY^N (CIP). 1 = 'TNN' com isolado UnB-1, 2 = 'TNN' com isolado UnB-17, 3 = 'TNN' com isolado UnB-27, 4 = 'TNN' com isolado UnB-32, 5 = 'TNN' sadio, 6 = preparação purificada isolado UnB-27 (1/10), 7 = 'TNN' com PVY^O, 8 = N. rustica sadio, 9 = N. rustica com PVY^N.

3.9.3. Cortes ultrafinos

Nos cortes ultrafinos de folhas de pimentão 'Gigante Quadrado' infetado com o potyvirus é mostrada a presença de inclusões lamelares do tipo catavento e "scrolls" no citoplasma das células infetadas (Figura 10 C e D). Essas inclusões não foram observadas em cortes de tecido sadio dessa hospedeira.

3.10. INCIDÊNCIA DO VÍRUS NO DISTRITO FEDERAL EM 1986

Inspeções de campo foram realizadas em 6 plantações de pimentão e 7 de tomate em 3 núcleos rurais (Tabatinga, Rio Preto e Brazlândia) no Distrito Federal em duas épocas (fevereiro e julho).

O vírus só foi encontrado em tomates de 2 núcleos rurais (Brazlândia e Rio Preto). O vírus apresentou distribuição restrita, sendo coletado em apenas 4 dentre 13 propriedades inspecionadas. A incidência da virose variou de 3,9 a 34,1%, não constatando-se diferenças acentuadas nas duas épocas em que se realizou o levantamento.

O potyvirus foi recuperado de amostras de tomate 'Santa Cruz', 'Iguaçu' e 'Santa Clara' apresentando sintomas de clorose, mosaico e redução do crescimento. Foram testadas 76 amostras sendo que, o vírus foi recuperado de 11 delas.

As variedades encontradas nas áreas inspecionadas foram os tomateiros 'Santa Cruz Kada Gigante', 'Santa Cruz', 'Iguaçu' e 'Santa Clara' e os pimentões das cultivares 'Casca Dura-Ikeda' e 'Cubatão'.

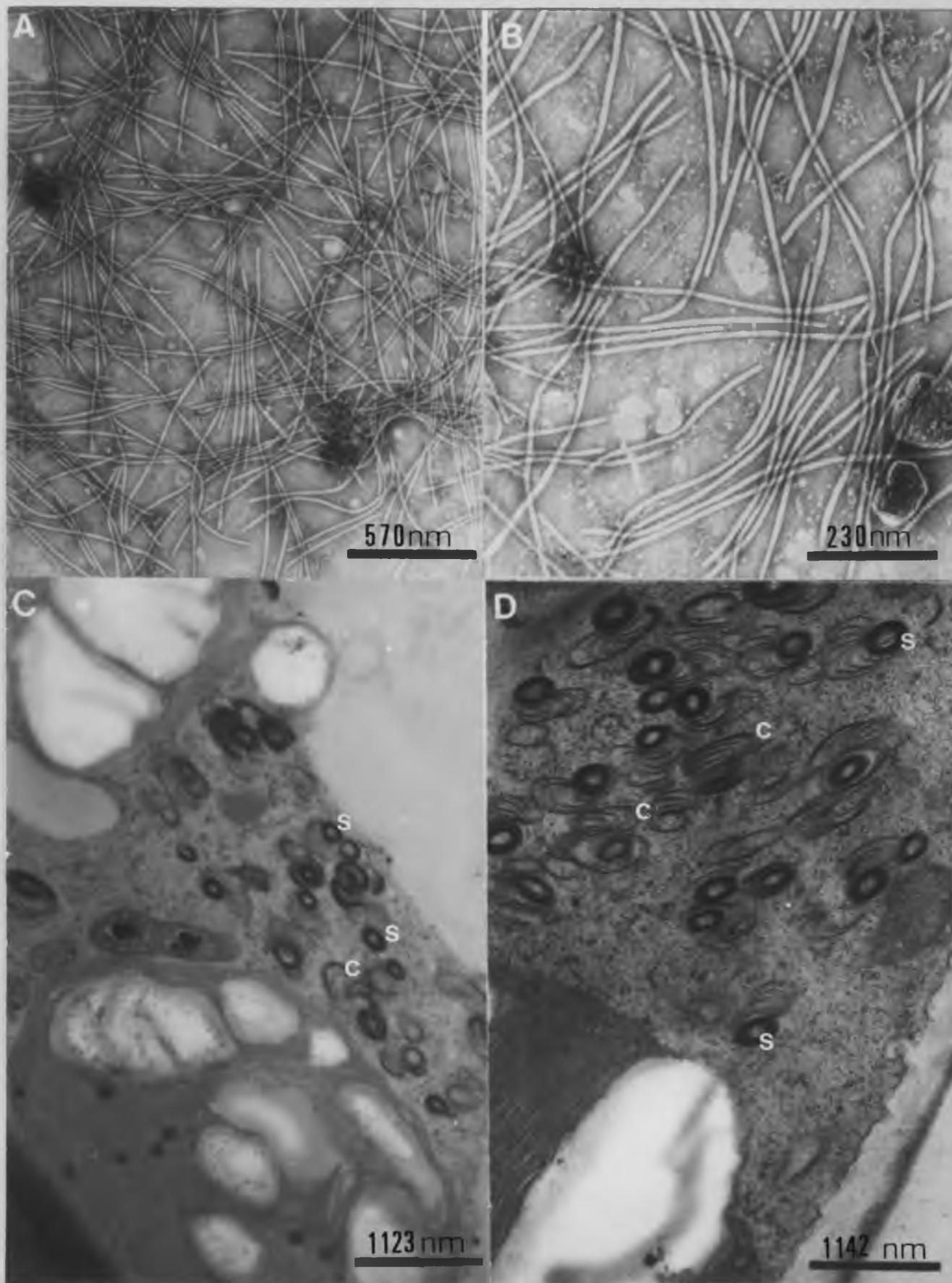


Figura 10. A) e B) preparação parcialmente purificada do vírus isolado UnB-1 antes da colocação no gradiente de cloreto de céσιο; C e D) cortes ultrafinos de tecido foliar infetado de pimentão 'Gigante Quadrado' apresentando "scrolls" (s) e cataventos (c).

IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Com base nos resultados do círculo de hospedeiras restrito principalmente a solanáceas, da morfologia das partículas, da presença de inclusões lamelares do tipo catavento e "scrolls" no citoplasma das células infetadas, da transmissão estiletar por afídios, propriedades físicas "in vitro", bem como pelos valores obtidos nas leituras das preparações purificadas no espectrofotômetro de luz ultravioleta, os 4 isolados do vírus apresentaram características comuns a membros do grupo Y da batata, relatados anteriormente em São Paulo e Distrito Federal afetando tomate (Silberschmidt, 1956; Costa et al., 1960; Nagai & Araújo, 1974) e pimentão (Nagai, 1968; Nagai, 1971a e b; Nagai & Araújo, 1974; Ferreira et al., 1982).

Esses isolados, aqui estudados diferem das 3 estirpes de PVY descritas em batata (Nóbrega & Silberschmidt, 1944; Salazar, 1971; Bokx & Huttinga, 1981) por não causarem doença em batata, nem necrose das nervuras em fumo. Por provocarem murcha das folhas baixeras de fumo, os 4 isolados podem ser classificados como sendo do grupo Y^W ($W = \text{"wilt"}$, ou murcha), referido anteriormente por Nagai (1968, 1971b). Todavia, dentre as estirpes do grupo Y^W descritas por esse autor, o potyvirus estudado está mais próximo da estirpe Y^{ft} , por infetar a pimenteira P11. Todavia, não é idêntico por infetar o tomateiro 'Santa Cruz', considerado resistente a esta estirpe (Nagai, 1971a). Os 4 isolados não apresentaram diferenças entre si, com relação a círculo de hospedeiras, exceto que o isolado UnB-1 mostrou-se mais virulento que o UnB-27.

Os 4 isolados infetaram o pimentão 'Agrônômico 10G'

e a pimenteira P11 considerados resistentes à maioria das estirpes do grupo Y relatadas em pimentão e tomate (Nagai, 1979b). Nos testes de resistência comprovou-se que as cultivares 'Quadrado Verde', 'Margareth', 'Magda', 'Itaipu' e 'Jóia' e as introduções CP 83, CNPH 49 L. 41, L. 42, L. 43, L. 44, L. 45, L. 46, L. 47, L. 48, L. 49, L. 50, CNPH 148, CNPH 192, C. frutescens são resistentes aos isolados do vírus aqui testados.

Nos testes com cultivares de tomate, o tomateiro 'Ângela' considerado resistente ao vírus Y por Nagai (1979a), mostrou-se suscetível juntamente com outras cultivares e introduções testadas de Lycopersicon. O tomateiro 'Sweetie' e as introduções de Lycopersicon P.I. 126410, P.I. LA 444-1 e P.I. 306811 mostraram-se resistentes ao vírus.

No trabalho são sugeridas escalas para a avaliação de graus de resistência ao vírus em pimentão e tomate, tendo em vista que as escalas propostas por Nagai (1968) e Ferreira et al. (1982) para avaliação de resistência em pimentão são muito subjetivas, de difícil reprodução, além de não possuírem um conjunto de fotos que reproduza bem as notas citadas.

As 4 estirpes estudadas do vírus (UnB-1, 17, 27 e 32) mostraram diferenças entre si quanto às propriedades físicas "in vitro", as quais podem ser atribuídas as variações de concentração do vírus nos tecidos da hospedeira.

A maior eficiência na transmissão por M. persicae dos isolados UnB-1 e 32 em comparação com os isolados UnB-17 e 27 pode ser atribuída à maior suscetibilidade aos primeiros isolados apresentada pelo pimentão 'Ruby King', utilizado como planta-teste. Este dado está de acordo com os resultados da inoculação mecânica na qual os isolados UnB-17 e 27 foram menos virulentos ao pimentão 'Ruby King' do que os outros isolados.

Os isolados UnB-1 e 27 não foram transmitidos pelas sementes de 'Agrônômico 10G' e 'Santa Cruz Kada Gigante', respectivamente. Diversos membros do grupo potyvirus são transmitidos pela semente (Hollings & Brunt, 1981), embora isso ocorra em apenas algumas hospedeiras.

Com o método utilizado para a purificação foi possível obter rendimentos de 1,71 a 5,88 mg/Kg de folha processada para o isolado UnB-1 e rendimentos de 2,47 a 9,74 mg/Kg para o isolado UnB-27. Os rendimentos obtidos na purificação de potyvirus são muito variáveis, tendo sido obtidos desde 9 até 40 mg/Kg (Makkouk & Gumpf, 1976; Moghal & Francki, 1976; Bokx & Huttinga, 1981). Essas diferenças podem ser explicadas pelos métodos de purificação utilizados, hospedeira usada para multiplicação do vírus, influência do ambiente sobre a planta infetada e pela variação encontrada entre estirpes estudadas.

As preparações purificadas do isolado UnB-1 apresentaram no espectrofotômetro as seguintes características $A_{260/280} = 1,24$, $A_{260/245} = 1,106$ e 6,55% de ARN, enquanto para o isolado UnB-27 obteve-se $A_{260/280} = 1,20$, $A_{260/245} = 1,302$ e 5,69% de ARN. Os valores obtidos foram semelhantes aos de Bokx & Huttinga (1981), Makkouk & Gumpf (1976), Leiser & Richter (1978) e Stace & Tremaine (1970), no estudo de diferentes estirpes de PVY.

Os antissoros foram ensaiados em imunodifusão dupla em agar-gel contendo SDS. O título obtido foi de 1/8 para os dois isolados, tendo o antissoros sido diluído com soro normal, embora outros autores (Purcifull & Gooding, 1970; Makkouk & Gumpf, 1976) tenham obtido títulos mais elevados (1/16 e 1/128) para estirpes de PVY, isoladas de batata.

Os 4 isolados do vírus não mostraram diferenças so

rológicas entre si. Os antissoros para PVY^O e PVY^N, quando testados contra seus antígenos e contra os 4 isolados presentemente estudados, apresentaram reação apenas para seus antígenos homólogos. Isto pode ser devido provavelmente a um baixo título destes antissoros ou alta diluição dos mesmos. Outra possibilidade é uma baixa concentração dos isolados UnB-1, 17, 27 e 32 nos tecidos da hospedeira. Há a necessidade de mais estudos sorológicos para poder chegar-se a uma conclusão definitiva.

Utilizando o antissoros para o isolado UnB-1 foi possível detectar o vírus em amostras provenientes de pimentão e fumo infetados, porém não foi possível detectar o vírus em plantas de tomate infetadas. Os resultados concordam com os de Purcifull & Gooding (1970) que conseguiram detectar o vírus Y da batata em fumo e pimentão, não conseguindo detectá-lo em tomateiros infetados. Eles consideraram que a concentração do antígeno em tomateiro era muito baixa. Em alguns testes ocorreu forte reação inespecífica com suco sadio de pimentão. A formação de linha de precipitina com suco sadio de pimentão não invalida a utilização do antissoros preparado contra o isolado UnB-1, tendo em vista que ela fica muito próxima do orifício central e pode ser facilmente distinguida daquela linha formada contra o vírus. Uma possibilidade para evitar esse inconveniente é proceder a absorção do antissoros com a proteína normal da planta de pimentão.

Nos levantamentos de incidência do potyvirus estudado em plantações de tomate e pimentão do Distrito Federal, constatou-se a presença do vírus somente em tomates. A ausência de lavouras de pimentão infetadas pelo potyvirus pode ser atribuída a localização destas, longe de tomateiros infetados ou de outras fontes de vírus.

RESUMO

Isolados de um potyvirus, que infeta naturalmente pimentão e tomate no Distrito Federal (DF), foram caracterizados, quanto a círculo de hospedeiras, modos de transmissão, morfologia das partículas, inclusões presentes no tecido da hospedeira, propriedades físicas "in vitro", purificação e sorologia. Com base nas reações de algumas hospedeiras, o vírus pertence ao grupo Y^W, causador de murcha em fumo, relatado primeiramente em São Paulo. Esse potyvirus só infetou solanáceas e Chenopodium amaranticolor. Pimentão (Capsicum annuum L.) 'Agrônômico 10G', pimenteira (Capsicum spp.) P.I. 264281 e tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) 'Ângela I 5100' mostraram-se suscetíveis ao vírus.

As cultivares de pimentão Itaipu, Jóia, Magda, Margaret, Quadrado Verde e o tomateiro Sweetie mostraram-se imunes ou resistentes ao vírus, o mesmo ocorrendo com algumas introduções de Capsicum CNPH 49, L. 41, L. 42, L. 43, L. 44, L. 45, L. 46, L. 47, L. 48, L. 49, L. 50, CNPH 148, CNPH 187, CNPH 192, CP 83 e as introduções de Lycopersicon P.I. 126410, P.I. 306811 e P.I. LA 444-1.

Alguns isolados do vírus diferiram, entre si, quanto à virulência em pimentão e tomate, propriedades físicas e à eficiência na transmissão por Myzus persicae. Nenhum deles foi transmitido pelas sementes de pimentão 'Agrônômico 10G' ou tomateiro 'Santa Cruz Kada Gigante'.

Os isolados UnB-1 e 27 foram purificados a partir de fumo 'TNN', obtendo-se rendimentos de 1,71 a 9,74 mg/Kg. Os antissoros apresentaram título de 1/8 em teste de imunodifusão

dupla em agar-gel contendo SDS. Nos testes feitos com esses 2 antissoros não se observou diferenças sorológicas entre os 4 isolados estudados. Por outro lado, os 4 isolados presentemente estudados não reagiram contra antissoros específicos para PVY^O e PVY^N (da batata), mas apenas contra seus antissoros homólogos.

O antissoro para o isolado UnB-1 mostrou-se eficiente para detectar o potyvirus estudado em suco infetado de fumo e de pimentão, todavia não se observou a formação de linha de precipitina ao se utilizar suco de tomate infetado.

Em cortes ultrafinos de pimentão 'Vermelho Gigante' observou-se a presença de inclusões lamelares do tipo catavento e "scrolls", no citoplasma de células infetadas.

Nos levantamentos de campo efetuados em plantações de pimentão e de tomate no Distrito Federal, constatou-se a ocorrência do vírus apenas em tomates, numa incidência variando de 3,9 a 34,1%, entre lavouras.

SUMMARY

Isolates of a potyvirus, which naturally infect pepper and tomato in the Federal District area, were characterized as to host range, methods of transmission, particle morphology, inclusions, in vitro physical properties, purification and serology. Based on their reactions in some hosts, the virus belongs to the Y^W group, causing wilt in tobacco, which was first reported in São Paulo State. This potyvirus infected only Solanaceae and Chenopodium amaranticolor. Pepper (Capsicum annuum L.) 'Agrônômico 10G', pepper (Capsicum spp.) P.I. 264281 and tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) 'Ângela I 5100' showed susceptibility to the virus.

The cultivars of pepper Itaipu, Jóia, Magda, Margareth, Quadrado Verde and the tomato Sweetie proved to be immune or resistant to the virus, the same occurring with some introductions of Capsicum CNPH 49, L. 41, L. 42, L. 43, L. 44, L. 45, L. 46, L. 47, L. 48, L. 49 and L. 50, CNPH 148, CNPH 187, CNPH 192, CP 83 and the introductions of Lycopersicon P.I. 126410, P.I. 306811 e P.I. LA 444-1.

Some isolates of the virus differed in virulence in pepper and tomato, physical properties and transmission by Myzus persicae. None of them was transmitted by pepper or tomato seeds.

The isolates UnB-1 and 27 were purified from tobacco 'TNN'. Yields of 1,71 to 9,74 mg/Kg were obtained. Both antisera showed titers of 1/8 in double immunodiffusion tests in agar-gel with SDS. No serological difference among isolates was observed in tests made with these antisera. No reaction was

noticed against PVY^O and PVY^N (from potato) antisera, when the four isolates of the virus were tested, but clear precipitin lines were seen against their homologous antisera.

Antiserum against isolate UnB-1 proved to be efficient to detect the virus in infected leaves of tobacco and pepper, but it did not present any precipitin line when tomato leaves were used.

The examination of thin sections of pepper 'Vermelho Gigante', showed cytoplasmic cylindrical inclusions of the types pinwheels and scrolls.

In surveys made in pepper and tomato crops in the Federal District area, the virus was only present in tomato crops. Its incidence ranged from .3,9 to 34,1% among the crops surveyed.

VII. BIBLIOGRAFIA CITADA

- ALBA, A.P.C. & OLIVEIRA, A.R. Serological studies on viruses of the potato virus Y group occurring in São Paulo State. *Summa Phytopathol.* 2:178-186. 1976.
- ARAÚJO, M.T., MATTOS, J.K.A. & CRUZ, J.L. da. Cultivares de pimentão (Capsicum annuum L.) e o vírus Y da batatinha. *Revista de Olericultura* XIV:141-142. 1974.
- ÁVILA, A.C., GAMA, M.I.C.S., NAKASHIMA, J. & BEEK, M.A. Produção de anti-soro em ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), para detecção de vírus Y da batata em batata (Solanum tuberosum L.). *Fitopatol. bras.* 11(2):297. 1986.
- BORGES, M.L.V. O vírus da necrose das nervuras do tabaco (estirpe do vírus Y da batateira) seu aparecimento em Portugal. *Agronomia Lusit.* 32:271-281. 1971.
- BOKX, J.A. de & HUTTINGA, H. Potato virus Y. CMI/AAB. Descriptions of plant viruses nº 242. 1981.
- COOK, A.A. Genetics of response in pepper to three strains of potato virus Y. *Phytopathology* 53:720-722. 1963.
- COOK, A.A. Isolation and maintenance of potato virus Y strains virulent on selected pepper varieties. *Phytopathology* 57:385-388. 1967.
- COSTA, A.S. Moléstias do Fumo, Batata e Tomateiro. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura. Boletim S.I.A. nº 687, 82 pp. 1948.

- COSTA, A.S., CARVALHO, A.M.B. & KITAJIMA, E.W. Risca do tomateiro em São Paulo, causada por estirpe do vírus Y. *Bragantia* 19: 1111-1128. 1960.
- COSTA, A.S., CARVALHO, A.M.B., COSTA, C.L. & NAGAI, H. Moléstias de vírus de tomateiro. *Boletim de Campo* 183:8-26. 1964.
- COSTA, A.S., NAGAI, H. & KITAJIMA, E.W. Estirpe do vírus Y de valor experimental. *Bragantia* 28(6):65-70. 1969.
- DELGADO-SANCHEZ, S. & GROGAN, R.G. Chenopodium quinoa a local lesion assay host for potato virus Y. *Phytopathology* 56:1394-1396. 1966a.
- DELGADO-SANCHEZ, S. & GROGAN, R.G. Purification and properties of potato virus Y. *Phytopathology* 56:1397-1404. 1966b.
- DELHEY, R. Virus Y its dynamics in the main potato growing area of Argentina. *Fitopatologia (Lima)* 17(1):30-39. 1982.
- DOSSA, M.I. & MUNGUR, R. The status of virus diseases of Capsicum annum L. in Mauritius. *FAO Plant Protection Bulletin* 30(3/4): 151-156. 1982.
- EDWARDSON, J.R. Some properties of the potato virus Y-group. *Fla. Agric. Exp. Stn. Monogr.* n° 4. 398 p. 1974.
- EDWARDSON, J.R. & CHRISTIE, R.G. Light microscopy of inclusions induced by viruses infecting peppers. *Fitopatol. bras.* 4:341-373. 1979.

- EDWARDSON, J.R. & CHRISTIE, R.G. Serological Relationships of Some viruses in the Potato Y-group. Compiled from: 'Some properties of the potato virus Y group' by J.R. Edwardson. Agricultural Station Monograph nº 4, with additional data from the recent literature. n.p., s.d.
- EDWARDSON, J.R., CHRISTIE, R.G. & KO, N.J. Potyvirus cylindrical inclusions - Subdivision IV. *Phytopathology* 74:1111-1114. 1984.
- ESKAROUS, J.K., HABIB, H.M., KISHTAH, A.A. & ISMAIL, M.H. A strain of potato virus Y isolated from Solanum nigrum var. judaicum in Egypt. *Phytopath. Medit.* 22:53-58. 1983.
- ESQUINAS-ALCAZAR, J.T. Genetic resources of tomatoes and wild relatives. International Board for Plant Genetic Resources. 65 p. Rome. 1981.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. FAO Production Yearbook 34, 296 p. 1980.
- FERNANDEZ-NORTHCOTE, E.N. & FULTON, R.W. Detection and characterization of Peru tomato virus strains infecting pepper and tomato in Peru. *Phytopathology* 70:315-320. 1980.
- FERREIRA, P.V., SEGOVIA, V.F.S. & COSTA, C.P. da. Avaliação da resistência de cultivares de pimentão (Capsicum annum) ao vírus Y. *Summa Phytopatol.* 8:141-152. 1982.
- FILGUEIRA, F.A.R. Manual de Olericultura. Cultura e Comercialização de Hortaliças. 2ª Ed. Rev. e Ampl. São Paulo, Ed. Ceres, V. 2. 1982.

- GOODING Jr., G.V. Serological identification of tobacco viruses. Tobacco Science 177(23):46-49. 1975.
- GOODING Jr., G.V. & BING, W.W. Serological identification of potato Y virus and tobacco etch virus using immunodiffusion plates containing sodium dodecyl sulfate. Phytopathology 60: 1293. 1970.
- GRACIA, O., FELDEMAN, J.M., PONTIS, R.E. & BONINSEGNA, J. Virus identificados en cultivos de tomate y pimiento de la provincia de Mendoza (Argentina). Revista de Investigaciones Agropecuarias, Série 5, Patologia Vegetal VI(1):1-17. 1969.
- HOLLINGS, M. & BRUNT, A.A. Potyviruses. In: Kurstak, E. (Ed.). Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis. Amsterdam, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981. 943 p.
- KAHN, R.P. & MONROE, R.L. Detection of the tobacco vein necrosis strain of potato virus Y in Solanum cardenasii and S. andigenum introduced into the United States. Phytopathology 55:1356-1359. 1963.
- KITAJIMA, E.W. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. Journal of Electronic Microscopy (Japan) 14:119-121. 1965.
- KLINKOWSKI, M. & SCHMELZER, K. A necrotic type of potato virus Y. American Potato Journal 37(7):221-228. 1960.
- LEISER, R.M. & RICHTER, J.A. Contribution to the differentiation of potato virus Y. Arch. Phytopathol. U. Pflanzenschutz 15(5): 289-298. 1979.

- LIN, M.T., KITAJIMA, E.W., CUPERTINO, F.P. & COSTA, C.L.
Properties of a possible carlavirus isolated from a cerrado native plant, Cassia sylvestris. Plant Dis. Reprtr. 63:501-505. 1979.
- MAKKOUK, K.M. & GUMPF, D.J. Further identification of naturally occurring virus diseases of pepper in California. Plant Dis. Reprtr. 58:1002-1006. 1974.
- MAKKOUK, K.M. & GUMPF, D.J. Characterization of potato virus Y strains isolated from pepper. Phytopathology 66:576-581. 1976.
- MARANCA, G. Tomate: variedades, cultivares, pragas, doenças e comercialização. São Paulo. Nobel 158 p. 1981.
- MARINHO, V.L.A., LIN, M.T., CRESTANI, O.A. & KITAJIMA, E.W. Purificação do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro e produção de antissoro específico. Fitop. brasil. 9:414. 1984.
- MOGHAL, S.M. & FRANCKI, R.I.B. Towards a system for the identification and classification of potyviruses. I. Serology and aminoacid composition of six distinct viruses. Virology 73:350-362. 1976.
- MOGHAL, S.M. & FRANCKI, R.I.B. Towards a system for the identification and classification of potyviruses. II - Virus particle length, symptomatology and cytopathology of six distinct viruses. Virology 112:210-216. 1981.
- MONTENEGRO, M.J., KITAJIMA, E.W., CAMARGO, I.J.B. & COSTA, A.S.
Comparação electrono-microscópica dos tecidos de plantas infec-

- tados por diferentes estirpes do vírus Y da batata que ocorrem no Estado de São Paulo. *Bragantia* 27(2):15-23. 1968.
- NAGAI, H. Obtenção de variedades de pimentão resistentes ao mosaico. *Bragantia* 27(8):311-354. 1968.
- NAGAI, H. Uma variante do vírus Y infectiva à pimenteira P11 (P.I. 264281) e seus derivados. IV Reunião da Soc. Brasileira de Fitopatologia. Piracicaba, SP. 1971a.
- NAGAI, H. Novas variedades de pimentão resistentes ao mosaico causado por vírus Y. *Bragantia* 30(9):91-100. 1971b.
- NAGAI, H. Registro de cultivar: Tomate Ângela. *Revista de Olericultura* 17:20-22. 1979a.
- NAGAI, H. Registro de cultivar: Agrônômico 10. *Revista de Olericultura* 17:25-26. 1979b.
- NAGAI, H. Melhoramento de pimentão (*Capsicum annuum*) visando resistência ao vírus Y. *Horticultura Brasileira* 1:3-9. 1983.
- NAGAI, H. & ARAÚJO, M.T. Observações sobre a incidência de viroses nas culturas olerícolas do Distrito Federal. *Fitopatologia (Lima)* 9(2):63-64. 1974.
- NAGAI, H. & COSTA, A.S. Four new pepper varieties resistant to virus Y in Brazil. *Annali della Facoltà di Scienze Agrarie della Università degli Studi di Torino*. VII:282-287. 1971-1972.

- NAGAI, H., COSTA, A.S., MATUO, T., OI, A. & KISHIMOTO, A. Resistência do pimentão Agrônômico 8 rompida por estirpe do vírus Y de Atibaia. Revista da Soc. Brasileira de Fitopatologia. Ano III:52-53. 1969.
- NAGAI, H. & SMITH, P.G. Reaction of pepper varieties to naturally occurring viruses in California. Plant Dis. Repr. 52(12):928-930. 1968.
- NOBREGA, N.R. & SILBERSCHMIDT, K. Sobre uma provável variante do vírus 'Y' da batatinha (Solanum virus 2, Orton) que tem a peculiaridade de provocar necroses em plantas de fumo. Arquivos do Instituto Biológico. 15:307-331. 1944.
- PURCIFULL, D.E. & BATCHELOR, D.L. Immunodiffusion tests with sodium dodecyl sulfate (SDS) - treated plant viruses and plant viral inclusions. Agric. Exp. Sta. Bulletin nº 788. Univ. of Florida 39 pp. 1977.
- PURCIFULL, D.E. & GOODING, Jr. G.V. Immunodiffusion tests for potato virus Y and tobacco etch viruses. Phytopathology 60:1036-1039. 1970.
- SALAZAR, L.F. Una raza del virus "Y" de la Papa en el Perú. Fitopatologia (Lima) 4(1-2):26-33. 1971.
- SILBERSCHMIDT, K. Uma doença do tomateiro em Piedade, causada pelo vírus Y da batatinha. Arquivos do Instituto Biológico 23:125-150. 1956.
- STACE-SMITH, R. & TREMAINE, J.H. Purification and composition of potato virus Y. Phytopathology 60:1785-1789. 1970.

- VALIELA, M.V.F. Introduccion a la Fitopatologia. I.S.A.G. v. 1.
Buenos Aires, INTA. 1011 pp. 1969.
- ZITTER, T.A. Pepper virus strain identification in southern
Florida. *Phytopathology* 62:800. 1972.
- WALKEY, D.G.A. & WEEBB, M.J. The use of a simple electron
microscope serology procedure to observe relationships of seven
potyviruses. *Phytopath. Z.* 110:319-327. 1984.