

REMBERTO HERBAS ARZE

Engenheiro Agrônomo, Magistri Agriculturae, Master of Science in Plant Pathology,
Professor e Fitopatólogo no Departamento de Botânica Aplicada na Faculdade
de Agronomia da Universidade Maior de "San Simón", Bolivia.

**O MOSAICO DO CAQUI (*Diospyrus kaki*) E ALGUMAS
PROPRIEDADES FÍSICAS DO AGENTE CAUSADOR**

Tese para obtenção do título de Doutor em
Agronomia, apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz", da
Universidade de São Paulo.

PIRACICABA
1968

Í N D I C E

Página

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DA LITERATURA	2
3 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	5
4 - SINTOMATOLOGIA	6
4.1 - Fôlhas	6
4.2 - Flôres	7
4.3 - Frutos	7
4.4 - Brotos	7
5 - MATERIAL E MÉTODOS	9
5.1 - Preparação e fonte de inóculo	9
5.2 - Inoculação	9
5.3 - Plantas utilizadas no estudo do círculo - de hospedeiras	10
5.4 - Estudo das propriedades físicas	11
5.5 - Isolamento do vírus causador do mosaico- do caqui	12
5.6 - Preparação do espécimen para a observação no microscópio eletrônico	13
6 - RESULTADOS	14
6.1 - Círculo de espécies hospedeiras (Sintomas nas hospedeiras susceptíveis)	14
6.2 - Reprodução de sintomas em plantas de ca- qui experimentalmente infectadas	17
6.3 - Retransmissão	17
6.4 - Propriedades físicas	17
6.4.1 - Limite da diluição	17
6.4.2 - Ponto termal de inativação	17
6.4.3 - Envelhecimento	18
6.4.4 - Sintomas obtidos com inoculação - do vírus isolado	18
6.4.5 - Forma das partículas do vírus cau- sador do mosaico do caqui	18
7 - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	19
8 - RESUMO	21
9 - SUMMARY	22
10 - AGRADECIMENTOS	23
11 - BIBLIOGRAFIA CITADA	24

1 - INTRODUÇÃO

A cultura do caqui (Diospyrus kaki) bastante difundida no Brasil tem grande importância econômica devida à grande procura no mercado dos frutos que são consumidos geralmente em forma de fruta fresca.

Apresenta atualmente uma doença cuja causa acreditamos poder atribuir a um vírus. Achemos que esta doença merece, pela sintomatologia muito peculiar e pela possibilidade de repercussão econômica no mercado, um estudo detalhado.

A primeira noção da ocorrência desta doença - que designamos a seguir de "Mosaico do caqui" - obtivemos por meio de uma consulta encaminhada à Seção de Fisiologia Vegetal do Instituto Biológico pelo Sr. Luiz Kobayashi, que possui plantação de caqui no Município de Mogi das Cruzes, Estado de São Paulo.

No esforço de atender a esta consulta realizamos diversas visitas à propriedade do mencionado agricultor onde encontramos várias árvores exibindo sintomas acentuados dessa doença.

Muitos resultados dos estudos que reunimos no presente trabalho foram obtidos com material proveniente - desta plantação. Mais tarde foi verificado que uma doença muito semelhante ocorreu também em outros pomares de Mogi das Cruzes, Itaquera, São Roque.

O "Mosaico do caqui" pode causar prejuízos consideráveis e uma vez a infecção se tornando sistêmica, afeta não apenas as folhas, mas também flores, frutos e a brotação nova.

O presente trabalho, possivelmente o primeiro realizado no Brasil, tem a finalidade de esclarecer o caráter infeccioso desta doença, as condições de transmissão mecânica e algumas propriedades físicas do agente causador.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

Alguns estudos sobre o "Mosaico do caqui" ou em todo caso sobre doenças causadas por vírus foram realizados na Itália. Assim MEZZETTI (1947), publicou uma nota sobre uma doença, então nova, de caqui ocorrendo na Itália que se caracterizava pelo escurecimento das nervuras das folhas, clorose das áreas entre as nervuras e pela queda prematura das folhas, por diversos tipos de necrose do lenho, principalmente na casca de brotos, ramos e hastes.

Pouco tempo depois em 1950 o mesmo autor publicou observações complementares informando que verificou a presença da mesma doença em outras províncias da Itália e atribuiu a causa da doença a um vírus filtrável transmissível por enxertia. O mesmo autor menciona que uma planta, protegida contra o ataque de insetos, enxertada com material doente na primavera de 1948 chegou a apresentar os sintomas característicos da doença no verão do ano seguinte.

Ainda o mesmo autor descreve detalhes da sintomatologia da doença, destacando principalmente a clorose das folhas acompanhada de escurecimento das nervuras. Nas mesmas folhas aparece, às vezes, também uma ligeira epinastia. Observou também que nas plantas severamente atacadas, as folhas costumam se tornar mais curtas e grossas à medida que a clorose dá lugar a um mosqueado e que a queda de folhas parece limitar-se aos brotos da copa das árvores. Com relação aos brotos, ele verificou que às vezes apresentam -- pústulas suberosas, sulcos necróticos longitudinais, pontos necróticos e uma rede preta longitudinal no alburno.

Apesar de todos esses sintomas o autor verificou que a raiz e o tronco de tais plantas apresentavam aspecto são. Com relação a eventuais diferenças de susceptibilidade, o autor acrescenta que D.kaki var. costata é menos susceptível do que o tipo standard. Ainda informa o mesmo autor que nos anos de 1945 até 1950 quase todas as plantas de caqui var. Lycopersicum apresentavam sintomas da doença e

que a reação característica desta variedade à infecção consiste na queda prematura das folhas, sintoma êsse que parece indicar o possível efeito de um vírus presente em estado latente.

Continua explicando que os sintomas se manifestam mais em condições desfavoráveis do ambiente e, em experiências executadas pelo método de enxertia verificou que a infecção latente ia exercendo um efeito protetor contra outras manifestações do mesmo vírus.

Em 1957 ao referir-se à sintomatologia da doença frisa que o sintoma essencial da doença que êle chama "queda de folhas e clorose latente" consiste na necrose das nervuras.

Conclui ainda o autor que em condições ambientais desfavoráveis para o desenvolvimento das plantas, os sintomas da doença se exprimem com maior severidade o que pode conduzir nestes casos a um enfraquecimento da planta acompanhado de intensa clorose e morte prematura, progredindo em sentido basipetal.

O autor menciona ainda que poucas plantas de caqui var. lycopersicum oriundas de sementes exibiam uma clorose transitória e o aparecimento de linhas necróticas nas folhas. A última referência existente a respeito dos estudos efetuados por MEZZETTI sobre a "queda das folhas e clorose latente" do caqui encontra-se na "Ata do primeiro Congresso das Doenças de Árvores Frutíferas e da Videira causadas por Vírus"(1) que foi publicado em 1959 no qual o mesmo se refere ao fato de que ensaios de transmissão do agente causal da doença estão em andamento.

Além disso apenas existe uma referência da literatura, de Java, onde TERRA relatou o fato que 10 variedades de caqui enxertado sobre cavalo de Diospyrus lotus obtidos de Yokohama exibiam uma clorose muito severa provocando a morte das plantas no período de um ano. As plantas enxertadas sobre D.kaki não apresentaram clorose e o desenvolvimento foi normal,

pelo menos no início, porque mais tarde notavam-se um certo atraso no desenvolvimento.

Com exceção destas publicações das quais -- nem sempre conseguimos tomar conhecimentos nas fontes originais, não encontramos referências na literatura disponível ao mosaico de aqui por nós estudado.

3 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Segundo BAILEY (2) o caqui (Diospyrus kaki) vulgarmente conhecido por persimmon pelos americanos e caqui pelos japoneses e sulamericanos é originário do Japão e o tipo americano (D. virginiana) dos Estados Unidos da América do Norte. Encontramos essa cultura no Brasil principalmente no Estado de São Paulo. É cultivada, também em outros países sulamericanos, na Europa no Sul da França, Itália e possivelmente em outros países dos quais não se tem informação.

De todas as espécies de caqui que estão agrupadas em dois tipos distintos que são o grupo americano com D. virginiana e o grupo chino-japonês com D. kaki, os do grupo americano são preferentemente utilizados de cavalo em enxertias nos Estados Unidos da América do Norte e os do grupo chino-japonês são utilizados preferentemente de cavaleiro nos Estados Unidos da América do Norte e outros países. Alguns do último grupo são também utilizados de cavalo por suas qualidades especiais.

O levantamento bibliográfico nos deu uma visão panorâmica da distribuição da cultura de caqui, no globo. Entretanto, a ocorrência do mosaico de caqui, ou alguma outra doença causada por vírus nesta cultura, somente -- foi assinalada em 1947 por MEZZETTI (9), na Itália e por TERRA (10) em Java. Entre nós é a primeira vez que está sendo relatada uma doença virosa que atinge as folhas, flores, frutos e brotos causando a queda prematura das primeiras e a morte em sentido basi-petal dos brotos com inegável prejuízo aos cultores de caqui do país.

4 - SINTOMATOLOGIA

A doença do mosaico do caqui é sistêmica, afetando toda a parte aérea da planta, isto é, as folhas, flores, frutos e brotos.

4.1 - Folhas

Após a brotação das folhas pode-se observar áreas cloróticas, deprimidas de forma aproximadamente circular e de pequeno diâmetro (2-3mm) às vezes isoladas ou agrupadas e estendidas, formando então áreas maiores de forma irregular. - As áreas cloróticas caracterizam-se geralmente por um centro necrótico que se localizam entre as nervuras secundárias e em algumas vezes nas próprias nervuras. Na página inferior da folha e na zona correspondente às áreas afetadas há depressões e xibindo verrugosidade. Em outros casos, as folhas apresentam áreas totalmente necróticas com deformação do limbo foliar -- (Fig. 1, 2, 3).

Os sintomas observados durante a época da maturação dos frutos, e quando as folhas atingem seu tamanho definitivo, consistem de um mosqueado típico em que as manchas cloróticas quase amarelas alternam com áreas de cor verde normal em diversos graus de intensidade. Em outros casos, as áreas cloróticas estendem-se a quase todo o limbo deixando pequenas manchas de tecido verde. Em outros casos, as áreas cloróticas estendem-se a quase todo o limbo deixando pequenas manchas de tecido verde. Em muitos casos é possível observar diferentes graus de deformação devido ao crescimento desproporcionado entre as áreas cloróticas e as áreas normais (Fig. 4, 5). A queda prematura das folhas é mais acentuada durante este período.



Fig. 1 — Fôlha de caqui (*D. kaki*) com sintomas do mosaico observados pouco tempo após a brotação. Notam-se áreas cloróticas mais ou menos circulares ou irregulares.



Fig. 2 — Fôlhas de caqui com sintomas que consistem em áreas necróticas acompanhadas da deformação do limbo.

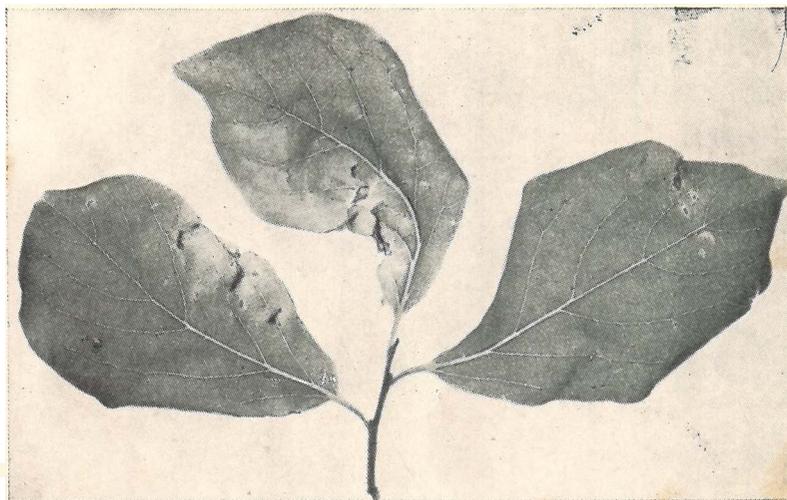


Fig. 3 — Fôlhas de caqui com sintomas que consistem em áreas cloróticas isoladas ou agrupadas e extendidas com um centro necrótico.

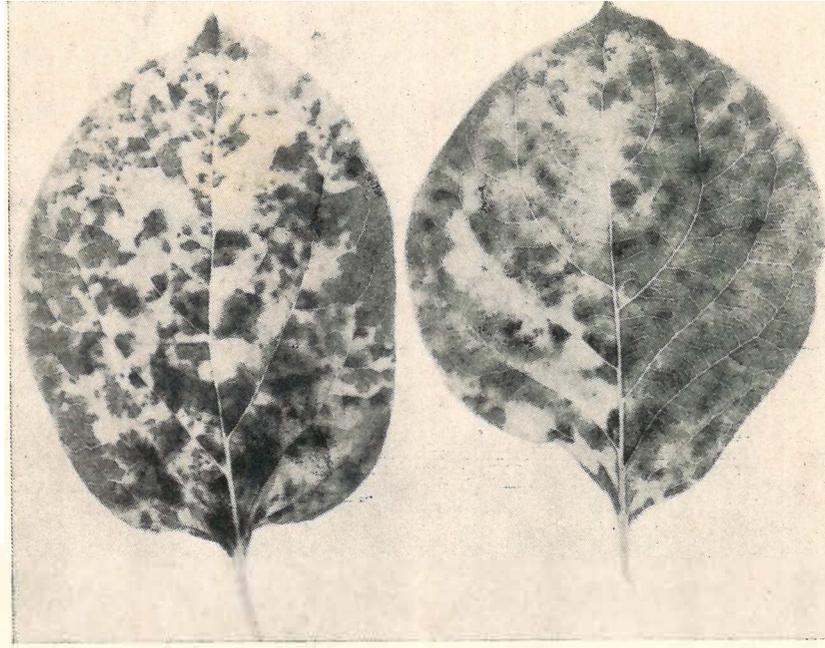


Fig. 4 — Fôlhas de caqui observadas no período de maturação dos frutos, com sintomas que consistem em áreas de côr verde mais clara quase amarela, alternando com áreas verdes normais.

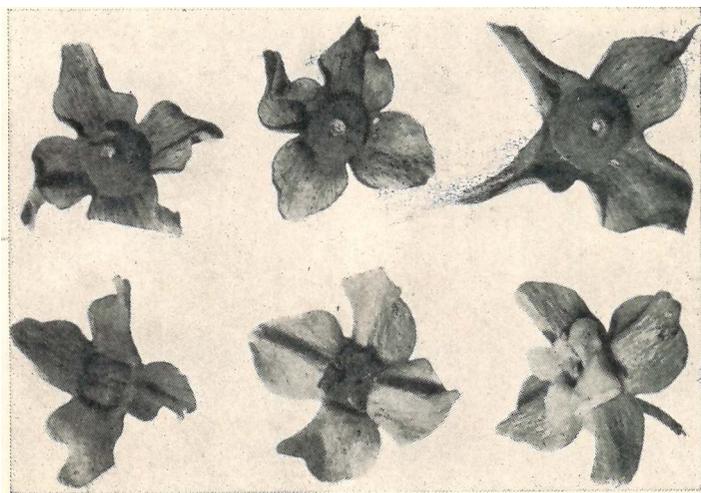


Fig. 5 — Flores de caqui com pedúnculo e sépalas parcialmente necróticas.

4.2 - Flôres

Os sintomas iniciam-se no pedúnculo para logo atingir as sépalas. Consiste em pequenas áreas necróticas em forma de estrias, às vèzes, com uma necrose generalizada - em todo o pedúnculo, cálice e corola ou em tóda a flor. Nestes casos, a queda das flôres é frequente permanecendo somente o pedúnculo com tecidos necróticos que atingem a casca do brôto (Fig. 6, 7, 8).

4.3 - Frutos

Os frutos pequenos imaturos apresentam sintomas que consistem de pequenas áreas necróticas de forma circular ou linear de preferência na parte basal e próximas ao cálice ou na parte apical. Em todos êstes casos, a necrose - pode atingir profundidades variáveis do mesocárpio. Nos frutos próximos à maturação, observa-se pequenos círculos de cor verde claro, que contrasta sôbre o fundo amarelo do pericarpo. Em outros casos, os círculos são completamente necróticos ligeiramente deprimidos e sem comprometer notôriamente o mesocárpio (Fig. 9, 10).

4.4 - Brotos

Apresentam uma necrose na casca que pode atingir maior profundidade nas partes apicais ou parte basal. No primeiro caso, observa-se a queda prematura das fôlhas, flôres e a progressão da doença no sentido basi-petal; por esta razão o brôto do ano seguinte tem lugar na base que não foi atingida pela necrose (Fig. 11).

No segundo caso, observa-se que as áreas necróticas da casca atingem total ou parcialmente a circunferência do brôto, causando então o enfraquecimento e subdesenvolvimento do brôto. Neste caso, o brôto do ano seguinte tem lugar na parte apical (Fig. 12).



Fig. 6 — Ramo de caqui com flor completamente necrótica e pedúnculos que correspondem as flores quedas.



Fig. 7 — Fôlhas de caqui com sintomas menos pronunciados, que consistem em áreas cloróticas e necróticas irregularmente distribuídas sôbre a superfície do limbo.

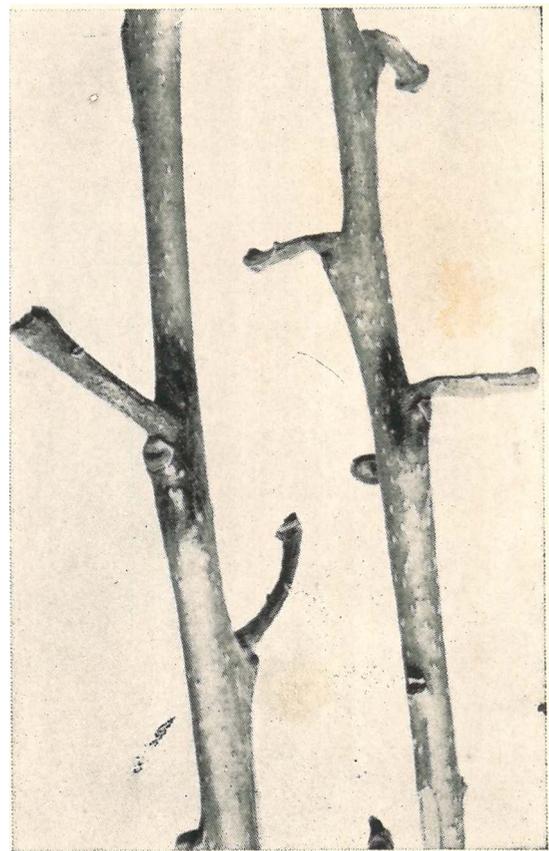


Fig. 8 — Pedúnculos completamente necróticos que correspondem às flores quedas. Nota-se que a necrosis se estende aos tecidos do brôto.

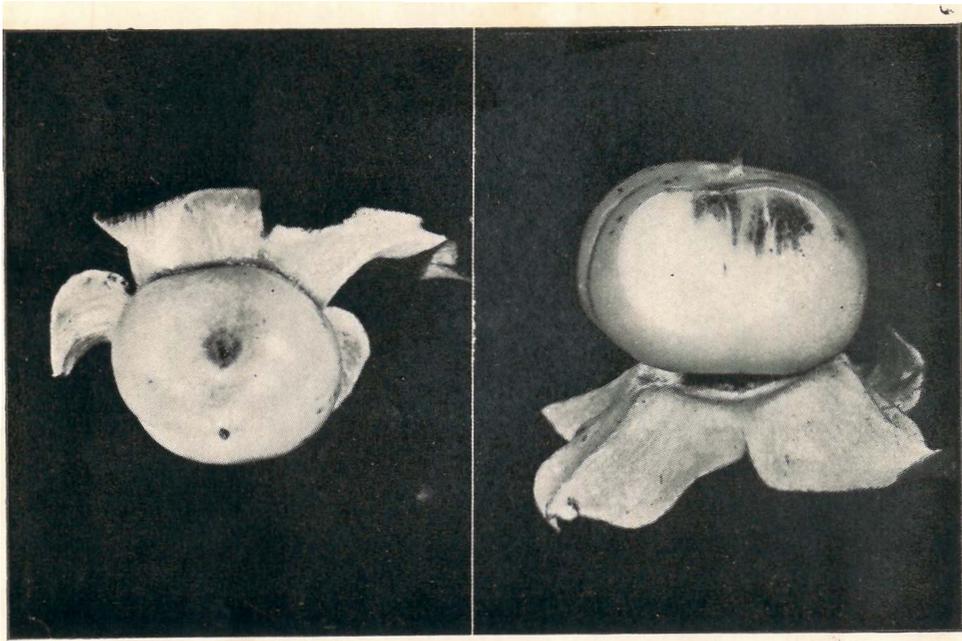


Fig. 9 — Frutos de caqui imaturos com sintomas que consistem em pequenas áreas necróticas. Nota-se a profundidade atingida pela necrosis.

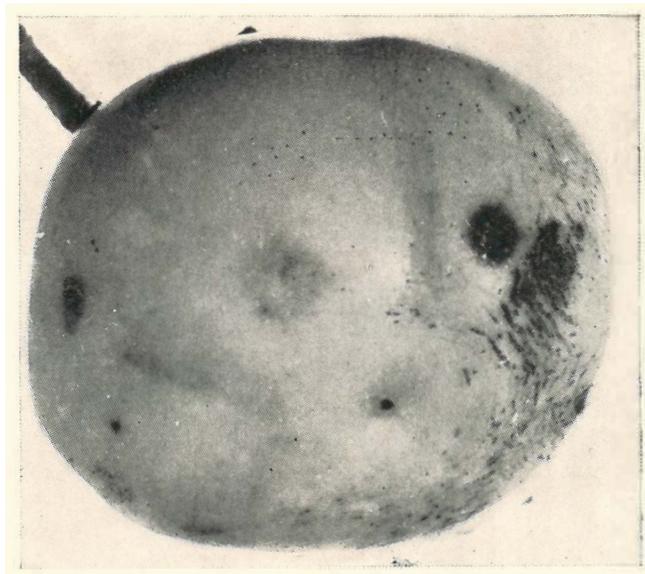


Fig. 10 — Fruto de caqui próximo à maturação com sintomas que consistem em círculos verde claro ou necróticos.

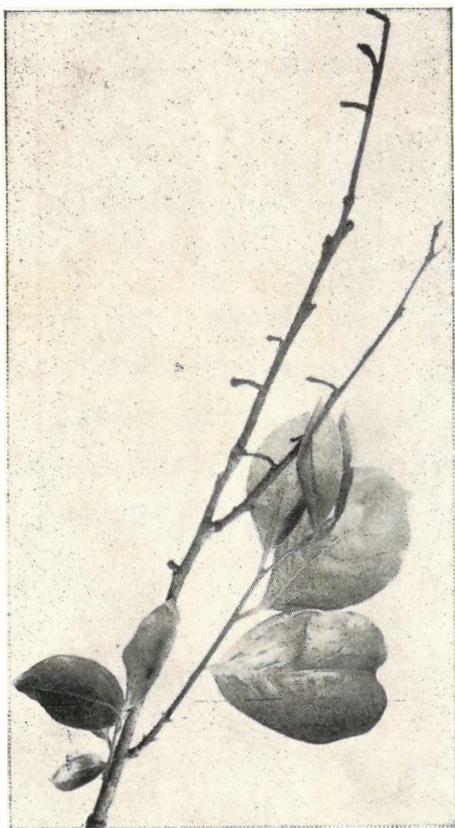


Fig. 11 Ramo de caqui do ano anterior com a parte terminal necrótica; da parte basal não necrótica nasce o brôto do ano.



Fig. 12 — Ramo de caqui do ano anterior com pedúnculos necróticos e a parte apical não completamente necrótica, de onde nasce o brôto do ano com fôlhas exibindo pintas cloróticas e deformação do limbo.

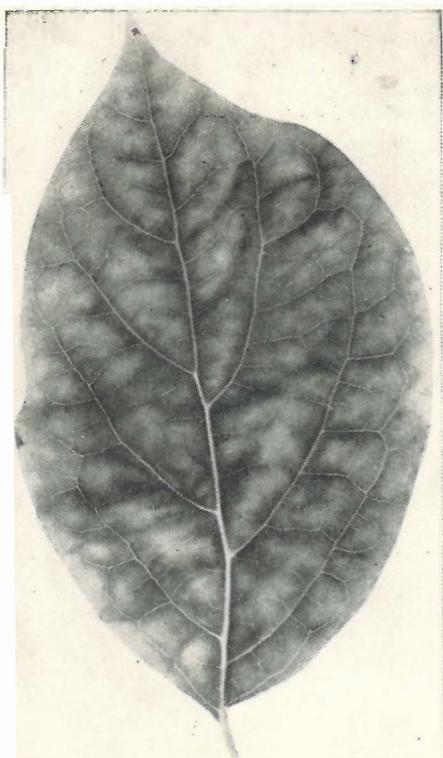


Fig. 13 — Fôlha de *Diospyrus lotus* com sintomas correspondentes às inoculações experimentais. Notam-se as áreas cloróticas de formas circulares ou irregulares.

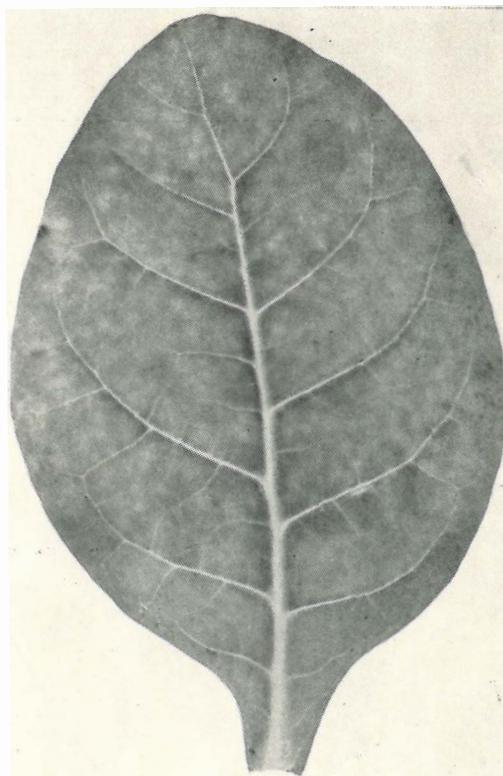


Fig. 14 — Fôlha de *N. tabacum* W. B. que foi inoculada experimentalmente, exibindo sintomas que consistem em círculos e aneis cloróticos.

Em outros casos os sintomas nos brotos, consistem de uma necrose dos tecidos próximos aos pecíolos e pedúnculos que ficaram após a queda das flôres e fêlhas. Em todos êstes casos, a necrose pode atingir extensões e profundidade variáveis que compreende as zonas vizinhas aos pedúnculos ou áreas maiores (Fig. 8).

5 - MATERIAL E MÉTODOS

5.1 - Preparação e fonte de inóculo

A técnica usada foi a do macerado utilizando-se as partes das folhas de caqui com lesões típicas causadas por vírus. O suco passado através de um pedaço de gaze foi dissolvido em uma solução de cianeto de potássio -- (KCN) a 0,02% e uma pequena quantidade de carvão vegetal. Em outras ocasiões a solução de cianeto de potássio a 0,02% e uma pequena quantidade de carvão vegetal ativado foram -- postos em um almofariz e as folhas maceradas dentro desta -- solução. A quantidade empregada em ambos os casos foi na proporção de 0,5g de folhas por lcc da solução.

Além desta substância química que foi a mais usada por causa dos resultados animadores com ela obtidos, foram ainda usadas para a preparação do inóculo as seguintes substâncias químicas: Tampão fosfato de potássio -- ($PO_4HK_2 + PO_4H_2K$), sulfito de potássio (SO_3K_2) a 0,5% com acréscimo de pequena quantidade de carvão ativado, u'a mistura de partes iguais de solução de cianeto de potássio a 0,02% e sulfito de potássio a 0,5% com pequena quantidade de carvão vegetal ativado, uma mistura de partes iguais de uma solução de cianeto de potássio a 0,02% e tampão de fosfato de potássio com adição de pequena quantidade de carvão vegetal ativado.

De forma idêntica foram também preparados inóculos dos tecidos necróticos dos pedúnculos, das sépalas e pericárpio do fruto.

5.2 - Inoculação

As inoculações foram feitas embebendo um pedaço de etamine no suco infectivo e friccionando em seguida as folhas das plantas sadias utilizadas nos testes de infectividade.

As folhas das plantas sadias de caqui as-

sim como aquelas utilizadas para o estudo das hospedeiras foram previamente polvilhadas com carborundum.

Procedendo assim espera-se produzir nas folhas, pequenas feridas através das quais as partículas do vírus podem penetrar dentro das células. Logo após a inoculação, as folhas foram lavadas com água comum porque assim se espera eliminar algumas substâncias presentes no suco que poderia inativar o vírus, interferir com o agente infectivo ou causar fitotoxidade na folha.

Da mesma forma foram feitas inoculações com suco infectivo obtido dos pedúnculos, sépalas e do pericarpo dos frutos que apresentaram sintomas necróticos com a finalidade de verificar se o suco correspondente a cada um destes tecidos era infectivo e se ia produzir os mesmos sintomas como as folhas infectivas costumam induzir.

O número das plantas utilizadas para as inoculações dos diversos ensaios no presente trabalho foi 5 para cada teste e os ensaios foram repetidos, às vezes, mais do que 10 vezes com exceção dos casos em que o contrário está expressamente mencionado no texto.

As plantas testemunhas foram friccionadas com uma solução de 0,02% de cianeto de potássio a que foi acrescentada pequena quantidade de carvão vegetal ativado, após polvilhamento com carborundum.

Nos ensaios em que outras substâncias químicas foram utilizadas na preparação do suco inoculador as testemunhas foram friccionadas com solução correspondente dessas substâncias.

5.3 - Plantas utilizadas no estudo do círculo de hospedeiras

Para o estudo dos ensaios da infectividade e o círculo das hospedeiras foram usadas plantas sadias e

obtidas a partir de semente botânica das seguintes espécies: Diospyrus kaki, Diospyrus lotus, Chenopodium guinea, Ch. amaranticolor, Ch. murale, Gomphrena globosa, Phaseolus vulgaris (Feijão Trepador, F. manteiga, F. carioca), Vigna sinensis, Pisum sativum, Lactuca sativa, Datura stramonium, Nicotiana tabacum W.B., N. glutinosa, N. knightiana, Petunia hybrida, Lycopersicum esculentum, Nicandra sp., Zinnia elegans, Plantago sp.

Uma vez obtido sintoma nas hospedeiras - susceptíveis foram extraídos sucos para ensaios de inoculação em plantas sadias de caqui para verificar a possibilidade da reprodução de sintomas do mosaico.

Tais sucos serviram também para tentar a obtenção de infecções secundárias e a retransmissão a partir de plantas de caqui em que a doença do mosaico foi induzida experimentalmente.

5.4 - Estudo das propriedades físicas

As propriedades físicas do vírus do mosaico do caqui foram estudadas com suco extraído das folhas de Chenopodium guinea, Petunia hybrida e de Nicotiana tabacum W.B. que são hospedeiras que reagiram à inoculação com sintomas sistêmicos.

Nesses casos a inoculação foi feita em folhas de plantas sadias de Chenopodium amaranticolor, uma planta hospedeira que reage à infecção com sintomas locais. Para determinar a diluição máxima o suco extraído foi diluído com água destilada na proporção de 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000, 1:10000000.

Tôdas essas diluições foram testadas em 3 repetições para cada diluição e as plantas testemunhas foram inoculadas com o suco infectivo não diluído.

Para determinar o ponto termal de inati-

vação do vírus, 2 ml do suco preparado foram submetidos durante 10 minutos às seguintes temperaturas: 50°, 55°, 60°, 65°, 70°, 75°, 80°C. Logo após o aquecimento, os sucos foram transferidos para temperatura ambiente e testados em 3 repetições para cada uma das temperaturas. As plantas testemunhas foram tratadas com suco deixado em temperatura normal.

Para o estudo do envelhecimento do vírus *in vitro* 20 ml do suco foram distribuídos em pequenos tubos de ensaios mantidos à temperatura de laboratório que oscilava entre 20 e 25°C. O conteúdo de cada um dos pequenos tubos que serviu para inóculo de duas plantas cada dia durante um período superior a 6 dias. A planta testemunha -- foi friccionada com uma solução de 0,02% de cianeto de potássio. Todos os estudos a respeito das propriedades físicas foram repetidos 5 vezes, e em alguns casos com um suco cru de acordo com a técnica já descrita e em outros casos com o sobrenadante de um suco centrifugado 5.000 rpm durante 15 minutos. Trabalhar com esse sobrenadante oferece a vantagem de não ter que levar em consideração a parte grossa dos tecidos vegetais.

5.5 - Isolamento do vírus causador do mosaico do caqui

O isolamento do vírus do caqui foi feito pelo método da centrifugação diferencial referido por Fraenkel-Conrat (4), que consiste em submeter o suco das folhas da planta doente a pequena velocidade de centrifugação para retirar os detritos grandes e alta velocidade de centrifugação para sedimentar o vírus e remover materiais de pequeno peso molecular. Para este objeto foram empregadas folhas de caqui doente e outras vezes folhas de Ch. guinça e N. tabacum W.B. que são hospedeiras susceptíveis sistêmicas, em experiências separadas. As folhas foram trituradas até se obter uma polpa em almofariz estéril em presença de uma solução tampão fosfato de sódio 0,05M com pH 7,0 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} + \text{NaH}_2\text{PO}_4$), para neutralizar os ácidos vegetais. Então, es

preme-se o suco através de um pedaço de gaze para livrá-lo do material vegetal insolúvel. O suco obtido foi centrifugado a uma velocidade relativamente baixa de 4.500 rpm por 15 minutos em rotor angular tipo SM-24 de centrífuga Sorvall Superspeed RC-B. Nesta primeira centrifugação, muitos dos detritos são depositados no fundo do tubo, que foram excluídos. O fluído sobrenadante foi então centrifugado no mesmo rotor da centrífuga a uma velocidade de 20.000 rpm por 30 minutos. Nesta segunda centrifugação resultou a sedimentação de vírus em forma de pelotilha de aparência opalescente, no fundo do tubo e o sobrenadante foi excluído. O sedimento geralmente referido como "comprimido" foi redisperso em solução de tampão fosfato de sódio com um pouco de agitação cuidadosa para empregar nos ensaios biológicos e em água destilada para a preparação do espécimen.

5.6 - Preparação do espécimen para a observação no microscópio eletrônico

Para este objeto o vírus foi isolado das folhas do caqui e outras vezes das folhas de Ch. quinoa na forma já descrita. O espécimen para observar no microscópio eletrônico foi preparado na seguinte forma: a telinha porta-objeto foi coberta com uma película fina de parlódium, depois se deixou secar. Então o comprimento redisperso em água destilada foi misturado com pequena quantidade do corante ácido tungstico ($P_2O_5 \cdot 2WO_3 \cdot nH_2O$) a 2% neutralizado com hidróxido de potássio (KOH) a 5% com pH 7,2. Esta mistura foi asperjada sobre a película de parlódium com um atomizador especial para este objeto. Esta técnica de coloração negativa foi introduzida por BRENNER e HORNE (3) para uma melhor resolução da partícula do vírus na observação no microscópio eletrônico.

A observação e a fotomicrografia eletrônica do vírus do mosaico do caqui foi obtida em microscópio eletrônico Phillips EM-200 do Instituto Adolfo Lutz.

6 - RESULTADOS

6.1 - Círculo de espécies hospedeiras (Sintomas nas hospedeiras susceptíveis)

As seguintes espécies de plantas provaram ser susceptíveis à infecção com o vírus do mosaico do caqui:

Ebenaceae

Diospyrus lotus. A folha inoculada apresenta áreas cloróticas parcialmente necróticas. As folhas superiores à inoculada exibem áreas cloróticas que compreendem as nervuras secundárias e algumas partes do limbo entre as nervuras. As áreas cloróticas podem ter forma anular, circular, semianular ou irregular. Quando a folha atinge o seu tamanho definitivo as áreas cloróticas se tornam parcialmente necróticas (Fig. 13).

Solanaceae

Nicotiana tabacum W.B. A folha inoculada apresenta círculos e anéis cloróticos que se localizam entre as nervuras secundárias. Nas folhas mais novas nota-se algum tempo mais tarde um clareamento intenso das nervuras e logo círculos e anéis cloróticos próximos às nervuras (Fig. 14).

N.knightiana. A folha inoculada nem sempre apresenta sintomas nítidos embora exiba, às vezes, pequenas áreas cloróticas e uma clorose generalizada. As folhas superiores -- mostram pequenas áreas cloróticas de forma mais ou menos circular e situada junto às nervuras. Os círculos cloróticos possuem um diâmetro de 1 a 3 mm em média. As áreas cloróticas caracterizam-se geralmente por um centro necrótico (Fig. 15).

Petunia hybrida. A folha inoculada apresenta pequenas áreas cloróticas e um leve clareamento das nervuras. Mais tarde nas folhas novas pode-se observar manchas cloróticas de forma aproximadamente circular e de meia lua que se localiza na parte do limbo entre as nervuras (Fig. 16).

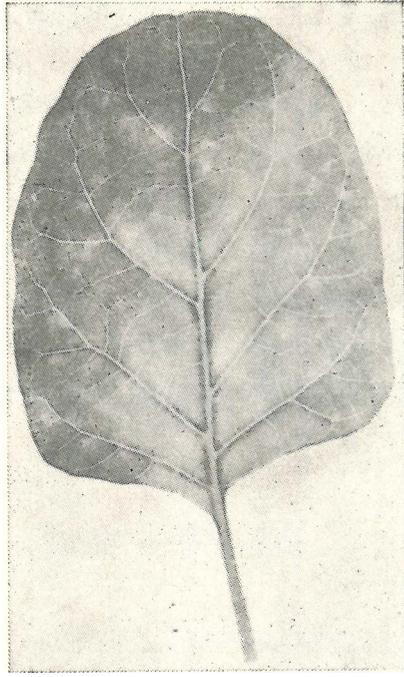


Fig. 15 — Fôlha de *N. knightiana* com sintomas sistêmicos. Notam-se as áreas cloróticas mais ou menos circulares.



Fig. 16 — Fôlha de *Petunia hybrida* com sintomas sistêmicos. Notam-se as áreas cloróticas de forma mais ou menos circular ou de meia lua.

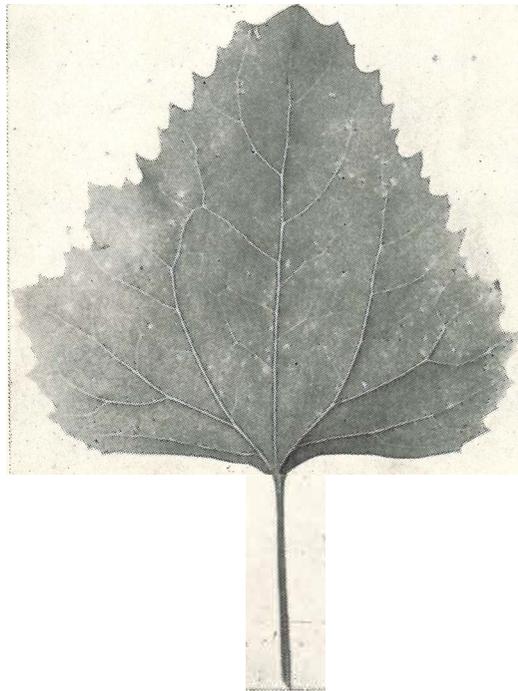


Fig. 17 — Fôlha de *Ch. amaranticolor* com sintomas locais que consistem de pintas cloróticas, parcialmente necróticas.

Lycopersium esculentum. A fôlha inoculada apresenta pequenas áreas necróticas. Mais tarde as fôlhas superiores exibem um mosqueado que consiste em pequenas áreas cloróticas-irregularmente distribuídas sôbre o fundo do limbo que conserva a côr verde normal. Este mosqueado é às vêzes, acompanhado de um ligeiro encarquilhamento; com o correr do tempo estas áreas cloróticas costumam tornar-se necróticas. Em outros casos, as fôlhas superiores exibem nervuras parcialmente escuras e ocorre também, às vêzes, um enegrecimento dos nós do caule.

Chenopodiaceae

Chenopodium amaranticolor. Reage com sintomas locais que consistem em pequenos círculos (de 1 a 2 mm de diâmetro), no início de aspecto clorótico e mais tarde assume caráter necrótico amarelo e que são rodeados com um halo de côr vermelha escuro. Esses círculos são irregularmente distribuídos no limbo da fôlha (Fig. 17).

Ch. quinoa. Os sintomas que se observam na fôlha inoculada consiste de círculos amarelos necróticos de 2 até 3 mm de diâmetro distribuídos irregularmente sôbre o limbo da fôlha. As fôlhas médias e apicais com o tempo exibem círculos cloróticos de tamanho variado (1 a 2 mm de diâmetro) que mais tarde torna-se parcialmente ou totalmente necróticos (Fig. 18).

Ch. mirale. A fôlha inoculada pode apresentar apenas um leve clareamento das nervuras, mas também exibir sintomas muito mais acentuados que consiste numa clorose total e parcial. As fôlhas médias exibem pequenos círculos cloróticos entre as nervuras e com o crescimento da fôlha pode tomar formas irregulares.

Beta vulgaris. Reage com sintomas locais. A fôlha inoculada apresenta pequenas lesões de forma aproximadamente circular de 1 a 3 mm de diâmetro, de côr vermelha escuro. Essas lesões adquirem mais tarde um centro necrótico localizado nas áreas do limbo entre as nervuras (Fig. 19).

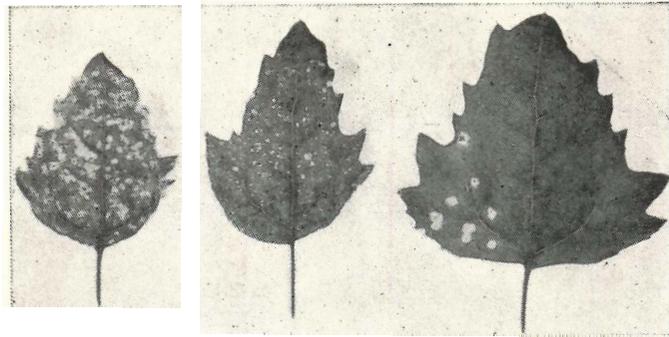


Fig. 18 — Fôlhas de *Ch. quinoa* com sintomas sistêmicos. Notam-se as pintas amarelas necróticas da fôlha inoculada e as subsequentes.



Fig. 19 — Fôlha de *B. vulgaris* com sintomas locais que consistem em lesões vermelhas com o centro necrótico.

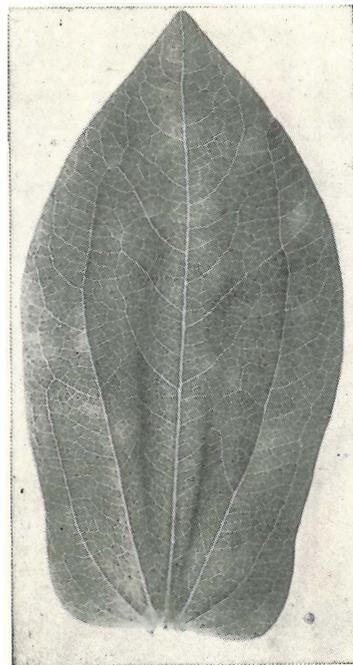


Fig. 20 — Fôlha de *Z. elegans* com sintomas sistêmicos. Notam-se as áreas cloróticas mais ou menos circulares.

Leguminosae

Phaseolus vulgaris (Feijão trepador). A fôlha inoculada apresenta pontos necróticos de côr marron e um encrepamento de grau variado do limbo da fôlha.

Vigna sinensis (Cowpea arauca). Na fôlha inoculada não se nota sintomas nítidos. As fôlhas superiores exibem áreas cloróticas quase amarelas.

Compositae

Zinnis elegans. A fôlha mostra manchas cloróticas e necróticas. Mais tarde as fôlhas mais jovens exibem áreas cloróticas, às vêzes, extensas de forma quase circular. Esses sintomas são acompanhados de um ligeiro embaulamento do limbo - (Fig. 20).

Lactuca sativa. A fôlha inoculada apresenta -- uma clorose bastante acentuada. As fôlhas subsequentes à inoculada, assim como também as fôlhas novas apresenta áreas cloróticas de forma irregular. Tais manchas podem se localizar ao longo das próprias nervuras como também nas áreas entre as nervuras. As fôlhas podem apresentar deformações e bolhosidades acentuadas (Fig. 21).

Plantaginaceae

Plantago sp. A fôlha apresenta áreas circulares cloróticas e parcialmente necróticas. Nas fôlhas superiores nota-se mais tarde manchas cloróticas que podem tomar uma côr avermelhada e virar necrótica.

As inoculações que nós executamos em hospedeiras susceptíveis sempre conduziram ao mesmo resultado independente do órgão da fonte que serviu para o preparo do suco inoculador. Isso quer dizer que não notamos diferenças no tipo do sintoma induzido entre sucos preparados a partir de pedúnculos, sépalas ou frutos.

6.2 - Reprodução de sintomas em plantas de caqui experimentalmente infectadas

Em tôdas as inoculações executadas por meio de sucos provenientes de fôlhas de caqui, Chenopodium quinoa, Lactuca sativa, Petunia hybrida, Nicotiana tabacum W.B., N. knightiana, etc., as plantas inoculadas de caqui apresentaram sempre os mesmos sintomas do mosaico. Neste caso serviram para as inoculações plantas de caqui obtidas de semente. Os sintomas locais que consistem em pequenas manchas cloróticas parcialmente necróticas aparecem após 7 dias e os sintomas sistêmicos nas fôlhas superiores só se tornaram visíveis 60 dias após a inoculação; a nitidez destes últimos sintomas depende da época do ano e do estado de desenvolvimento das plantas (Fig. 22).

6.3 - Retransmissão

As fôlhas de plantas de caqui que experimentalmente foram inoculadas com mosaico serviram de fonte de inoculação para ensaios em que foram incluídas plantas sadias de Chenopodium amaranticolor e de outras hospedeiras susceptíveis. Obtiveram-se nesses ensaios sempre resultados positivos.

6.4 - Propriedades físicas

6.4.1 - Limite da diluição - Verificamos que com sucos diluídos na proporção de 1:10 000 conseguimos ainda induzir lesões nas fôlhas inoculadas de Chenopodium amaranticolor. Ao passo que diluições de 1:100 000 não notamos mais sintomas da doença.

6.4.2 - Ponto termal de inativação. As fôlhas das plantas inoculadas com o suco submetidos durante 10 minutos à temperatura de 75°C ainda apresentaram lesões. Ao passo que com o submetido a 80°C não notamos mais lesões.



Fig. 21 — Fôlhas de *L. sativa* com sintomas sistêmicos. Notam-se as áreas cloróticas acompanhadas de deformações e bolhosidades.

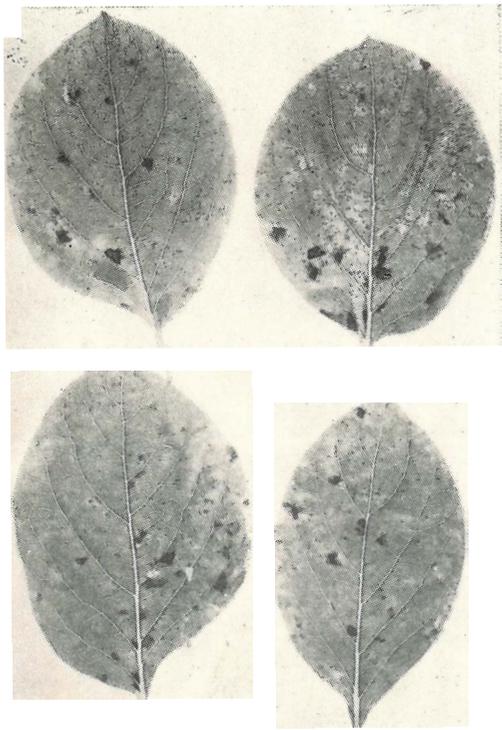


Fig. 22 — Fôlhas de *D. kaki* com sintomas sistêmicos correspondentes às inoculações experimentais.



Fig. 23 — Fotomicrografia eletrônica das partículas do vírus causador do mosaico do caqui. Notam-se partículas isodiamétricas. (84500x)

6.4.3 - Envelhecimento - Sucos mantidos no laboratório por mais de 72 horas não induziram mais lesões nas folhas inoculadas.

6.4.4 - Sintomas obtidos com inoculação do vírus isolado. As plantas susceptíveis inoculadas com o comprimido re disperso em solução de tampão fosfato de sódio apresentaram os mesmos sintomas já descritos para cada hospedeira.

6.4.5 - Forma das partículas do vírus causador do mosaico do caqui. Graças à gentil colaboração do Sr. Biologista Dalton Ramalho Weigl da Seção de Vírus do Instituto Adolfo Lutz obtivemos uma fotomicrografia tirada no microscópio eletrônico. Esta fotomicrografia eletrônica mostra partículas isodimétricas (Fig. 23).

7 - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Alguns dos sintomas descritos neste trabalho, tais como as manchas cloróticas das folhas e a queda prematura de folhas atacadas são semelhantes às aquelas descritos por NEZZETTI (9) na Itália. Alguma semelhança existe também, a respeito da necrose dos brotos novos e a sequência basi-petal da morte de tais brotos.

Por outro lado existem também algumas discrepâncias entre as nossas observações e aquelas feitas anteriormente na Itália. Tais diferenças podem ser talvez, atribuídas às condições específicas do ambiente que poderia exercer uma influência modificadora sobre o tipo de sintoma. Por essa razão, não queremos excluir a possibilidade de que a doença observada anteriormente na Itália e a descrita neste trabalho são causadas por vírus idêntico ou talvez, por variantes distintas do mesmo vírus.

O fato de que conseguimos reproduzir os sintomas em plantas de caqui cultivadas a partir de sementes quando foram inoculadas com suco infectivo de folhas de caqui doente - que apresentavam os sintomas característicos, com sucos infectivos de folhas de plantas hospedeiras susceptíveis e o fato de que conseguimos induzir sintomas em plantas hospedeiras inoculadas com sucos cru ou com vírus isolado, prova que o vírus causador do mosaico do caqui é transmitido mecânicamente.

O estudo da amplitude de hospedeiros indica - que várias espécies de diferentes famílias de plantas são susceptíveis à infecção do vírus que causa o mosaico do caqui.

Dos resultados dos estudos das propriedades físicas podemos tirar as seguintes conclusões: que a diluição - mais elevada e ainda ativa do suco cru infectivo é de 1: 10 000, que o ponto termal de inativação do vírus do mosaico do caqui - seja situado entre 75°C e 80°C, e que se inativa após uma permanência in vitro no ambiente de laboratório por mais que 3 dias.

A fotomicrografia eletrônica tirada do espécimen preparado com o vírus isolado e os resultados positivos obtidos em os ensaios biológicos realizados com o mesmo comprimido, indicam que existe uma relação entre as partículas de vírus observadas e os sintomas induzidos por aquelas. Então, podemos tirar a conclusão de que o agente causador do mosaico de aqui é o vírus de partículas isodiamétricas. Possivelmente se trate de um novo vírus ou algum outro já conhecido cuja infectividade a planta de aqui todavia não foi provada até o presente trabalho.

Consideramos que é necessário a realização de trabalho complementar, particularmente no que se refere à identificação deste vírus agente causador do mosaico de aqui.

8 - RESUMO

Algumas plantações de caqui (D.kaki) do Município de Mogi das Cruzes apresentaram uma doença virosa em folhas novas com sintomas que se caracterizaram por apresentar áreas cloróticas de aspecto deprimido e também por áreas necróticas acompanhadas de deformação do limbo. Durante o período da maturação dos frutos, as folhas que atingiram o seu tamanho definitivo, exibem manchas cloróticas que alternam com áreas verdes normais. A planta atacada sofre queda prematura das folhas.

Os sintomas nas flores consistem de uma necrose parcial ou total das diferentes peças florais ocasionando a queda das mesmas.

Os sintomas nos frutos consistem em pintas, anéis e faixas cloróticas ou necróticas que podem atingir profundidades variáveis do mesocarpo.

Os sintomas nos brotos caracterizam-se por áreas necróticas de diferentes formas, tamanho e profundidade que ocasiona a morte prematura no sentido basi-petal.

O vírus causador do mosaico do caqui é isodimétrico. É transmitido mecânicamente por sucos infectivos ou pelo vírus isolado mediante centrifugação diferencial.

O estudo do círculo de hospedeiros prova que várias espécies de plantas de diferentes famílias são susceptíveis ao vírus causador do mosaico do caqui.

As propriedades físicas in vitro do vírus causador do mosaico do caqui são as seguintes: Ponto máximo de diluição é de 1:10 000. Ponto termal de inativação está entre 75°C e 80°C. A longevidade é de 72 horas.

9 - SUMMARY

The persimmon (D.kaki) orchards in Mogi das Cruzes, and in other São Paulo State areas, too, are affected by a disease which is characterized by a depressed chlorotic or necrotic areas with some deformation of the limb on the first young leaves, by a typical mottling when they get the definite size, by the premature leaf fall, by the necrosis of some parts or the entire flower that later falls, by streak, circular or annular necrotic areas on the fruit and by different kind of necrosis of the wood and above all of the bark of the shoots and twigs that causes the dieback.

This disease that we call "kaki mosaic" proved to be caused by a isodiametric shape virus that is transmitted mechanically by crude sap inoculation as well as by partially purified virus. The virus was partially purified by differential centrifugation.

The host range study shows that several species of plants that belong to different families are susceptible to the persimmon mosaic virus.

The physical properties of persimmon mosaic virus in vitro are as follows: Dilution end point is 1:10.000. Thermal inactivation point is between 75°C and 80°C. The longevity is 72 hours.

10 - AGRADECIMENTOS

Expressamos os nossos sinceros agradecimentos:

Ao Professor Dr. Ferdinando Galli, pela orientação e estímulo na realização do presente trabalho.

Ao Chefe da Secção de Fisiologia Vegetal do Instituto Biológico Dr. Karl M. Silbersehmidt, quem além de colocar à nossa disposição os recursos disponíveis na Secção, estimulou e nesse estágio tornando possível a realização deste trabalho.

Ao Chefe da Secção de Bacteriologia Vegetal do Instituto Biológico Dr. Antonio Lima Gonçalves Pereira pela revisão e sugestões apresentadas.

A todos os colegas e funcionários do Instituto Biológico que direta ou indiretamente colaboraram no presente trabalho.

A Secção Microscopia Eletrônica, do Instituto Adolfo Lutz, na pessoa do Dr. Dalton Ramalho Veighl pela execução da fotomicrografia.

Ao Sr. Vicente de Paula Forster pelas excelentes fotografias conseguidas.

Ao Programa de Becas e Cadeiras da União -- Pan-Americana, O.E.A. pela bolsa de estudo que fez possível nesse estágio no Instituto Biológico.

Ao Conselho Nacional de Pesquisas pelo auxílio econômico proporcionado.

11 - BIBLIOGRAFIA CITADA

- ANÓNIMO, 1959. Atti del primo Convegno sulle malattie da virus die frutiferi e della Vite, Pavia, Giugno 1958 .
Notiz. Malatt.piante, 1959, 47-48(N.S.26-27), pp.1-242.
- BAILEY, L.H., 1939. Persimmon. Em The Standard Cyclopedia of Horticulture. The Macmillan Co., New York, U.S.A., Vol. III. pp. 2556-2560.
- BRENNER, S. & R.W.HORNE, 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses.
Biochim. biophys. Acta 34: 103-110.
- FRAENKEL-CONRAT, H., 1966. Isolamento, purificação e dosagem de virus de vegetais. Em Virus: Estrutura e Função no limiar da vida. Editora Universidade de Brasília, pp. 16-18.
- MEZZETTI, A., 1957. Defogliazione e giallume latente del kaki, con particolare riguardo alla sua epidemiologia. Terzo contributo. Ann.Sper.Agr., N.S., 11,4, pp.958-977. Abs. R.A.M., 37: 175. 1958.
- MEZZETTI, A., 1956. Una nueva anomalia del caqui en Italia. F.A.O. Boletin Fitosanitario, Vol. 4, No 12, pp. 181-183.
- MEZZETTI, A., 1952. Altre osservazioni sulla defogliazione del kaki. Boll.Staz.Pat.Veg.Roma, Ser.3,8(1950), pp. 75-78.
- MEZZETTI, A., 1950. Altre osservazioni sulla defogliazione del kaki. Ann.Sper.Agr., N.S., 4,2, pp. 291-294.
- MEZZETTI, A., 1947. Notizie su di una nuova malattia del kaki diffusa in Italia. Boll.Staz.Pat.Veg.Roma, Anno V, Ser.3, pp. 31-36.
- TERRA, C.J.A., 1947. Citrus rootstock decline problem in Java. Calif.Citrogr., 32,10, pp.444-446. Abs.R.A.M., 27:131. 1948.