

AVELINO RODRIGUES DE OLIVEIRA
Engenheiro-Agrônomo

Seção de Virologia
Instituto Agrônomo de Campinas

SEROLOGIA APLICADA AO ESTUDO DO VÍRUS DO ANEL DO PIMENTÃO

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

CAMPINAS - ESTADO DE SÃO PAULO

1967

1907

A meus pais, espôsa e filho,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Desejamos expressar os nossos sinceros agradecimentos:

Ao Dr. Álvaro Santos Costa, pelo incentivo, esclarecimentos e críticas apresentadas durante a execução deste trabalho e na revisão do manuscrito.

Ao Prof.Dr. Ferdinando Galli, orientador desta tese, pelo apoio e sugestões apresentadas.

Ao Prof.Dr. Darcy M. Silva, pelas críticas e sugestões apresentadas durante o desenvolvimento das pesquisas e na revisão dos originais.

Aos colegas da Seção de Virologia, pelas colaborações prestadas, particularmente ao Eng.Agr. Elliot W. Kitajima, pelo trabalho de microscopia electrónica.

Ao sr. Admir Bedin, pela valiosa colaboração prestada durante a realização dos experimentos.

Ao Dr. José Elias de Paiva Netto, Diretor Geral do Instituto Agronômico de Campinas e Dr. Luiz Aristeo Nucci, Diretor da Divisão de Biologia, pelas facilidades proporcionadas à realização desta tese.

Aos srs. Alfredo A. Carlström Filho, Renato Ramalho Jr., Miguel O. Torre, Benedito Ferreira, Wilson Presence, Luiz Afonso e Antonio Carlos Micoli, pela valiosa colaboração prestada para a apresentação deste trabalho.

A tôdas as pessoas que, de um modo ou de outro, contribuíram para a execução desta tese.

ARV

Í N D I C E

1. <u>INTRODUÇÃO</u>	1
2. <u>REVISÃO DA LITERATURA</u>	2
2.1. Breve histórico sôbre a serologia de vírus de plantas	2
2.2. Considerações sôbre alguns estudos feitos com o TRV e o VAP	5
3. <u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	9
3.1. Fonte de vírus	9
3.2. Primeira fase da purificação do VAP	9
Segunda fase da purificação do VAP; separação dos dois tipos de partículas pela técnica de gradiente de densidade	10
3.4. Preparo dos antissoros para as frações C,P e G ...	11
3.5. Sangria, preparo e conservação dos antissoros	12
3.6. Antissoros para alguns isolados do grupo do TRV utilizados nos testes serológicos com o VAP	12
3.7. Testes usados para observar as reações serológicas	13
3.8. Testes de absorção	14
3.9. Tratamento térmico das frações C,P e G	14
3.10. Testes de infetividade das frações C,P e G	15
3.11. Observações das frações C,P e G e dos precipitados serológicos ao microscópio electrónico	15
3.12. Diagnóstico serológico da presença do VAP em plantas de fumo, pimentão e tomate	16
4. <u>RESULTADOS</u>	17
4.1. Purificação e separação das partículas do VAP	17
4.2. Infetividade das frações C,P e G	17

akm

4.3.	Título dos antissoros preparados para as frações C,P e G	18
4.4.	Título dos antissoros nos testes serológicos cruzados entre as frações C,P e G e após o processo de absorção com as frações C,P e G	18
4.5.	Testes serológicos entre o VAP e alguns isolados do grupo do TRV	19
4.6.	Título dos antissoros obtidos nas reações de dupla difusão em ágar	19
4.7.	Testes serológicos, infetividade e observações ao microscópio electrónico das frações C,P e G submetidas a tratamentos térmicos	19
4.8.	Teste serológico de dupla difusão em ágar para estudar o comportamento antigênico do VAP e do TMV após um tratamento térmico a 90°C por vários períodos	20
4.9.	Observações dos precipitados serológicos ao microscópio electrónico	21
4.10.	Diagnóstico serológico da presença do VAP em plantas de fumo, pimentão e tomate	21
5.	<u>DISCUSSÃO</u>	23
6.	<u>RESUMO E CONCLUSÕES</u>	30
7.	<u>SUMMARY</u>	32
8.	<u>LITERATURA CITADA</u>	34

1. INTRODUÇÃO

O vírus causador da moléstia denominada anel do pimentão e conhecido pelas suas iniciais VAP, apresenta u ma série de propriedades que permitem enquadrá-lo no grupo do "tobacco rattle virus" (TRV).

Quando preparações purificadas ou preparações rápidas ("dipping") de partes de vegetal infetado com o VAP são observadas ao microscópio electrónico, evidenciam como característica principal a presença de dois tipos de partículas. Estas possuem morfologia semelhante e comprimentos normais distintos, isto é, 55 μ o comprimento das partículas pequenas e 200 μ o comprimento das partículas grandes. O aparecimento de dois ou mais tipos de partículas é uma ocorrência constante nos vírus pertencentes ao grupo do TRV já descritos.

A aplicação de técnicas serológicas para estudar as possíveis diferenças antigênicas entre os dois tipos de partículas do VAP; o estudo das relações serológicas de parentesco entre o VAP e alguns vírus do grupo do TRV; a influência do tratamento térmico no comportamento antigênico das partículas; o diagnóstico serológico para evidenciar a presença do VAP em plantas hospedeiras representam, basicamente, o escopo da presente tese.

oooo000oooo

skm

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Breve histórico sôbre a serologia de vírus de plantas

Por volta de 1888 e 1905 verificou-se que o sangue do homem ou de animais de laboratório que se recuperavam de uma doença infecciosa continha substâncias específicas, capazes de neutralizar os agentes infecciosos. Estas substâncias foram denominadas anticorpos. Constatou-se, também, que os anticorpos permaneciam por longo período no sangue dos animais tornando-os resistentes a uma segunda invasão do mesmo patógeno. Assim, à cada reinfeção, os anticorpos neutralizavam os microorganismos ou toxinas por eles produzidas. A reação era específica, isto é, anticorpos formados contra um patógeno A, neutralizariam somente o patógeno A; aquêles formados contra um patógeno B, neutralizariam apenas o patógeno B, e assim por diante. Aos agentes infecciosos ou às substâncias estranhas ao organismo animal, capazes de induzir a formação de anticorpos, deu-se o nome de antígenos. Posteriormente, constatou-se que várias substâncias possuíam propriedades antigênicas, principalmente as proteínas e os polissacarídeos de elevado peso molecular.

Com o desenvolvimento das técnicas para estudar as reações antígeno- anticorpo surgiu a Serologia, isto é, a parte da Imunologia que estuda as reações antígeno-anticorpo "in vitro". Sendo a reação antígeno-anticorpo altamente específica, as técnicas serológicas passaram a ter grande aplicação na identificação de microorganismos (bactérias e fungos), na bioquímica, na determinação dos grupos sanguíneos, na classificação sistemática das plantas superiores, na virologia, etc...

A descoberta de que o suco de plantas infetadas com vírus, quando injetado em animais, induzia a formação de anticorpos, deu formidável impulso aos estudos de identificação e caracterização dos vírus de plantas.

Ao que tudo indica, Purdy (1928) foi quem primeiro demonstrou que os vírus de plantas continham antígenos específicos. Purdy Beale (1931), em seu trabalho com o vírus do mosaico comum do fumo (TMV), era de opinião que no suco de plantas infetadas com o TMV a substância antigênica era o próprio vírus e não as proteínas formadas ou alteradas após a infecção. Matsumoto e Somazawa (1932,1933) comprovaram os trabalhos de Purdy Beale.

Silberschmidt (1932) demonstrou que a adição de antissoro específico ao suco de plantas infetadas com o TMV tornava o vírus inativo e que o mesmo não acontecia quando utilizava o soro normal.

Gratia (1933 a e b) parece ter sido o primeiro autor a mencionar que plantas contendo vírus diferentes dariam reações serológicas distintas. Trabalhando com o TMV e com o vírus X da batata (PVX), verificou que os mesmos não reagiam serologicamente em testes cruzados. Birkeland (1934) obteve resultados semelhantes aos de Gratia e procurou mostrar o valor da serologia para a classificação dos vírus de plantas. Purdy Beale (1934) também relatou a importância dos métodos serológicos aplicados ao diagnóstico e classificação dos vírus de plantas. Chester (1935), valendo-se das técnicas serológicas, procurou agrupar alguns vírus de plantas.

Nos primórdios da serologia de vírus de plantas, o preparo de antissoros era feito pela simples injeção, em

coelhos, do suco de plantas infetadas com vírus. É óbvio que os antissoros assim preparados apresentavam sérios inconvenientes, principalmente com relação à formação de anticorpos para substâncias antigênicas normais à planta hospedeira do vírus. O desenvolvimento das técnicas de purificação dos vírus de plantas possibilitou o preparo de melhores antissoros, permitindo assim o desenvolvimento de testes serológicos altamente específicos. O aperfeiçoamento das técnicas de purificação parcial dos vírus de plantas, os estudos da morfologia das partículas de vírus com auxílio da microscopia eletrônica e o preparo de antissoros altamente específicos, permitiram a Brandes e Wetter (1959) classificar alguns vírus de forma alongada.

Os testes serológicos, como técnica auxiliar para o diagnóstico de vírus de plantas multiplicadas vegetativamente, são largamente empregados. Nos países produtores de batata semente certificada, tais como Holanda, Alemanha e Suécia, os testes serológicos, para diagnosticar a presença dos vírus X, S, M e Y que infetam a batata, são empregados em escala comercial. O desenvolvimento do teste de microprecipitina em caixas de Petri, idealizado por van Slogteren (1955), tem possibilitado ao Serviço Holandês de Certificação de Batata Semente testar serologicamente todo material de batata destinado à seleção e exportação. Além disso, o controle da sanidade das plantas de bulbo (tulipas, jacintos, gladiolos, etc.) no que se refere às moléstias de vírus, é feito, na Holanda, com auxílio dos testes serológicos de microprecipitina.

Na identificação das moléstias de vírus de plantas a serologia apresenta uma série de vantagens sobre as demais técnicas usadas em virologia: a) é altamente específica; b) permite diagnosticar a presença do pa-

tógeno independentemente da sintomatologia e da planta hospedeira; c) permite trabalhar com um grande número de amostras e obter resultados num curto período; d) permite o estudo comparativo de estirpes ou de vírus diferentes, que ocorrem em várias partes do globo, pela simples troca de antissoros, sem que haja o perigo de introdução dos patógenos onde eles ainda não ocorrem.

Evidentemente, as técnicas serológicas não apresentam soluções para todos os problemas. Existem muitos fatores que dificultam ou mesmo inibem as reações serológicas. Quando porém as dificuldades são contornadas, a aplicação das técnicas serológicas é de grande importância na pesquisa básica dos vírus e de grande utilidade no diagnóstico rápido das moléstias de vírus que afetam as plantas de importância econômica.

2.2. Considerações sobre alguns estudos feitos com o TRV e o VAP

A sintomatologia das moléstias causadas por vírus do grupo do TRV é conhecida desde o século passado. Behrens (1899), na Alemanha, parece ter sido o primeiro a descrever uma moléstia causada por vírus desse grupo, dando a denominação de Tabakmauche-Virus. Böning (1931), na Alemanha, Quanjier (1943), na Holanda e Hansen (1946), na Dinamarca, fizeram os primeiros trabalhos de patologia de vírus do grupo do TRV.

Rozendaal (1947), na Holanda, descreveu uma moléstia em batata, "stengelbont", mencionando que o provável patógeno seria um vírus do grupo do TRV, talvez o mesmo descrito por Quanjier (1943) atacando plantas de fumo. De fato, Rozendaal e van der Want (1948), na Holanda, demons-

traram que as moléstias "stengelbont" da batata e "Tabakmauche" do fumo eram causadas pelo mesmo vírus, baseando-se na morfologia das partículas. Observações ao microscópio electrónico revelaram que o vírus possuía uma forma de bastonete rígido, apresentando como característica principal a presença de dois tipos de partículas de comprimentos distintos, sendo de 150 mu o comprimento das partículas pequenas e 300 mu o comprimento das partículas grandes. Paul e Bode (1955), na Alemanha, repetiram e ampliaram os estudos da morfologia das partículas do TRV e concluíram que, de fato, o vírus apresentava dois tipos de partículas. Demonstraram, porém, que as dimensões eram de 70 mu para as partículas pequenas e 180 mu para as partículas grandes e não aquelas mencionadas por van der Want e Rozendaal (1948). A existência de dois tipos de partículas morfológicamente semelhantes e apresentando comprimentos normais distintos passou a ser uma das características dos vírus do grupo do TRV.

Com relação aos trabalhos de patologia e círculo de hospedeiras dos vírus do grupo do TRV, é interessante ressaltar os trabalhos de van der Want (1952), Uschdraweit e Valentin (1956), Schmelzer (1957) e Walkinshaw e Larson (1959).

A aplicação de técnicas serológicas ao estudo do TRV foi iniciada com o trabalho de van Slogteren (1958). O autor demonstrou que diferentes moléstias das plantas produtoras de bulbos, que já haviam sido descritas por van Slogteren e Ouboter (1941) e cujo patógeno não era conhecido na época, eram causadas por vírus do grupo do TRV. Cadman (1959) e Cadman e Harrison (1959) utilizaram técnicas serológicas para identificar estirpes do TRV que ocorrem na Escócia.

Harrison e Nixon (1959) foram os primeiros a purificar o TRV, fazendo também a separação das partículas grandes e das partículas pequenas pela técnica de gradiente de densidade.

Costa et al. (1960) isolaram um vírus de uma planta de pimentão (Capsicum annuum L.) proveniente de São Carlos, SP. O vírus, quando inoculado mecânicamente em pimentão, causava sintomas em forma de anel, daí o nome, vírus do anel do pimentão (VAP). Verificaram também que o círculo de hospedeiras do vírus era bastante amplo e que muitas das propriedades do VAP (envelhecimento "in vitro", ponto final de diluição, resistência ao calor, etc...) eram bastante semelhantes às do grupo do TRV. Observações feitas ao microscópio electrónico por Kitajima (1963) revelaram que o VAP possuía partículas de dois tamanhos e que eram morfológicamente semelhantes às do TRV. Mensurações comparativas indicaram que o VAP apresentava partículas pequenas com 55 mu e partículas grandes com 200 mu de comprimento. Oliveira e Wetter (1963) prepararam um antissoro específico para o VAP. Silva (1965) purificou o VAP e fez uma série de estudos bioquímicos.

Bos e van der Want (1962) descreveram uma moléstia da ervilha causada por um vírus do grupo do TRV, que recebeu a denominação de "pea early browning virus" (PEBV). Maat (1963) demonstrou que o PEBV e o TRV, embora apresentassem um quadro sintomatológico diferente e possuissem partículas de comprimentos distintos (PEBV= 105 mu e 210 mu ; TRV= 70 mu e 180 mu), eram serológicamente relacionados.

Harrison e Woods (1966) fizeram um estudo serológico comparativo entre dez isolados de vírus pertencentes ao grupo do TRV: cinco isolados do TRV da Inglaterra, três iso

107

lados do TRV dos Estados Unidos, um isolado do TRV da Holanda e o VAP do Brasil. Concluíram que havia relações de parentesco serológico muito próximo entre os isolados da Inglaterra e o da Holanda. A esse grupo denominaram de Serotipo I. Nenhuma relação serológica foi observada entre os isolados norte americanos e o Serotipo I. Os isolados norte americanos foram classificados como Serotipo II. Finalmente o VAP apresentou apenas relação serológica distante com relação a dois isolados norte americanos e nenhuma relação com os isolados do Serotipo I. O VAP, segundo Harrison e Woods, pertenceria ao Serotipo III.

oooo000oooo

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Fonte de vírus

Plantas de fumo (Nicotiana tabacum L. var. Turkish) com o fator NN que localiza o vírus do mosaico comum do fumo (TMV), apresentando 4 a 5 fôlhas, foram inoculadas mecânica-mente com um isolado do VAP, mantido na coleção da Seção de Virologia do Instituto Agrônômico, em Campinas. Oito a dez dias após a inoculação colheram-se 500g de fôlhas com infecção sistêmica. Posteriormente molharam-se as fôlhas numa solução contendo tampão de fosfato 0,10 M pH 7,0 ; $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ 0,28 M e EDTA 0,01 M. Esta solução doravante passará a ser denominada de solução A (sol.A). Em seguida as fôlhas foram trituradas num liquidificador durante 4 minutos em presença da solução A. O suco assim preparado foi colocado em frascos de vidro e conservado no congelador (-20°C).

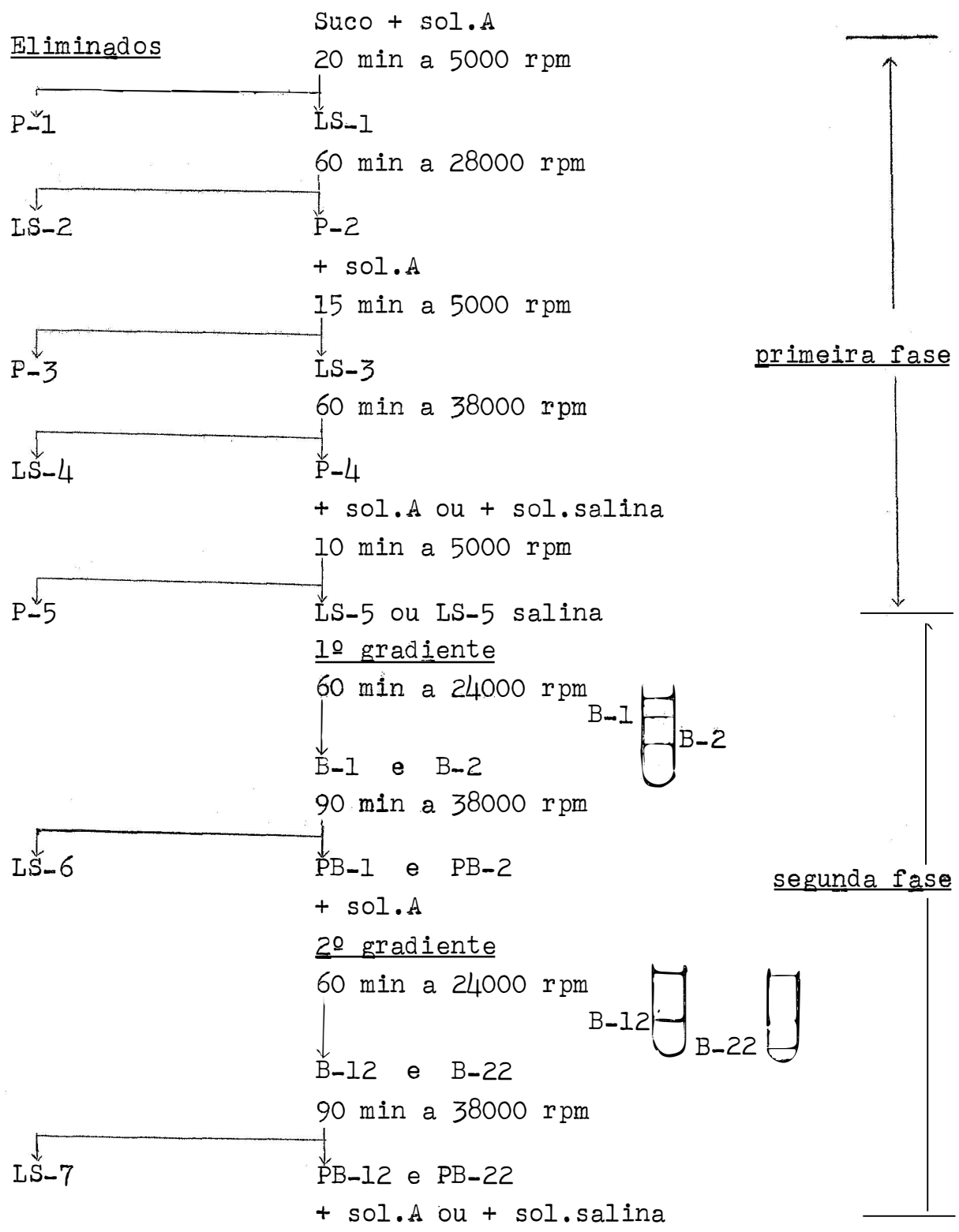
3.2. Primeira fase da purificação do VAP

O suco congelado (450 ml) foi deixado em temperatura ambiente para descongelar, sendo posteriormente submetido a centrifugações diferenciais. Tôdas as centrifugações a 5000 e 6000 rpm foram efetuadas na centrífuga Christ-Universal Junior II. Para as ultracentrifugações utilizou-se a centrífuga Spinco Modelo L, sendo que o rotor 30 foi utilizado a 28000 rpm, o rotor 40 a 38000 rpm e o rotor SW-25 (especial para gradiente de densidade) a 24000 rpm.

Inicialmente submeteu-se o suco a uma centrifugação durante 20 minutos a 5000 rpm (Esquema 1). Eliminou-se o sedimento (P-1) e o líquido sobrenadante (LS-1) obtido (geralmente de coloração parda) foi submetido a uma ultracentrifugação durante 60 minutos a 28000 rpm. Descartou-se o líquido

11.07

Esquema 1. Fases da purificação do VAP



sobrenadante (LS-2), dissolveu-se o "pellet" (P-2) em 30 ml de solução A e centrifugou-se durante 15 minutos a 5000 rpm. Rejeitou-se o sedimento (P-3) e o líquido sobrenadante (LS-3) foi ultracentrifugado durante 60 minutos a 38000 rpm. Eliminou-se o líquido sobrenadante (LS-4) e o "pellet" (P-4) foi dissolvido em solução salina (0,85% de NaCl em água destilada), quando foi utilizado no processo de imunização (LS-5 salina) ou então em 8 ml de solução A, quando foi utilizado na 2ª fase de purificação (LS-5). Aliquotas de fração LS-5 foram retiradas para observações ao microscópio eletrônico e para testes de infetividade.

3.3. Segunda fase da purificação do VAP; separação dos dois tipos de partículas pela técnica de gradiente de densidade

Os gradientes de densidade foram preparados com soluções de sacarose (Brakke, 1951, 1960) nas concentrações de 10, 20, 30 e 40% em solução A. Colocaram-se as soluções de sacarose em tubos de plástico (75x25mm) obedecendo-se as seguintes proporções: 4,6,6,6 e 3 ml de soluções 40%, 30%, 20%, 10% e solução A, respectivamente. Os tubos assim preparados foram colocados na geladeira (4°C) durante 24 horas. Posteriormente, colocou-se 2 ml da fração LS-5 em cada tubo de gradiente, previamente preparado, e o material foi ultracentrifugado durante 60 minutos a 24000 rpm. Em seguida, os tubos foram levados a uma câmara escura, colocados numa estante e iluminados sob a luz de uma lâmpada de um ampliador de chapas fotográficas. Dessa forma pôde-se, perfeitamente, constatar a presença de duas camadas opalescentes (B-1 e B-2). Com auxílio de seringas providas de agulhas longas e com ponta recurvada (tipo cabo de guarda-chuva), retiraram-se 2 a 3 ml de cada uma das camadas. B-1 e B-2 foram ultracentrifugadas durante 90 minutos a 38000 rpm, eliminou-

-se o líquido sobrenadante (LS-6) e adicionou-se aos "pellets" (PB-1 e PB-2) 2 ml de solução A, respectivamente. Aliquotas de cada uma das frações foram retiradas para observações ao microscópio electrónico e para testes de infectividade. Posteriormente, as suspensões de PB-1 e PB-2 foram submetidas a novo gradiente, por 60 minutos a 24000rpm, com a finalidade de obter uma melhor separação das frações. Após o gradiente, os tubos contendo a suspensão de PB-1 apresentavam uma só camada (B-12), o mesmo acontecendo com os tubos contendo a suspensão de PB-2 (B-22). B-12 e B-22 foram retiradas dos tubos de gradiente e ultracentrifugadas durante 90 minutos a 38000 rpm. Descartou-se o líquido sobrenadante (LS-7) e dissolveram-se os "pellets" (PB-12 e PB-22) em solução A. Aliquotas das frações PB-12 e PB-22 foram observadas ao microscópio electrónico e utilizadas em testes de infectividade. As frações PB-12 e PB-22 quando utilizadas no processo de imunização foram dissolvidas em solução salina (PB-12 salina e PB-22 salina).

Para facilitar a explanação serão adotadas, de agora em diante, as seguintes abreviações: a) a fração LS-5, representante da purificação do VAP completo, isto é, contendo partículas pequenas (55 mu) e partículas grandes (200 mu) será denominada fração C ou simplesmente C; b) a fração PB-12, correspondente às partículas pequenas (55 mu), após o segundo gradiente, será denominada fração P ou simplesmente P; c) a fração PB-22, correspondente às partículas grandes (200 mu) após o segundo gradiente, receberá a denominação de fração G ou simplesmente G.

3.4. Preparo dos antissoros para as frações C, P e G

Coelhos, pesando em média 2500 g, foram imunizados com as frações C, P e G para a obtenção de antissoros

AKO

específicos. Diversas técnicas foram utilizadas no processo de imunização, tendo os animais recebido injeções de antígeno via intravenosa, via intramuscular ou ambas. Nas imunizações via intramuscular injetou-se o antígeno emulsionado em partes iguais (V/V) com adjuvante Freund (Difco Laboratories) completo ou incompleto, conforme o caso.

3.5. Sangria, preparo e conservação dos antissoros

Antes da primeira injeção do antígeno fêz-se uma sangria e o sôro, sôro normal, foi guardado no congelador para posteriormente ser utilizado como contrôle nas reações serológicas. Dez a doze dias após a última injeção do antígeno fêz-se uma sangria e preparou-se o sôro, antissoros (AS). Com auxílio de uma lâmina fêz-se um pequeno corte longitudinal na veia lateral da orelha do coelho. Recolheu-se o sangue (20 a 30 ml) num pequeno frasco de vidro de boca larga. O sangue foi deixado em temperatura ambiente (2 a 3 horas) e, posteriormente, foi colocado no refrigerador durante 24 horas. Em seguida, separou-se o sôro, centrifugando-o durante 20 minutos a 6000 rpm. Desta forma obteve-se um sôro bem claro. Distribuiu-se o material em empôlas de vidro (2 a 3 ml por empôla), adicionou-se Cialit, numa concentração final de 1:10000, para evitar contaminações. Posteriormente, foram feitas sangrias semanais e os antissoros, após a determinação dos títulos, foram guardados no congelador.

3.6. Antissoros para alguns isolados do grupo do TRV utilizados nos testes serológicos com o VAP

Antissoros preparados com isolados do TRV originários da Escócia (AS-TRV-E), da Holanda (AS-TRV-H) e dos Estados Unidos (AS-TRV-S) foram gentilmente enviados pelo Dr. C. H. Cadman (Scottish Horticultural Research Institute - Dun-

dee - Escócia).

Antissoros preparados para a estirpe típica do TRV da Holanda (AS-TRV-HT), para um isolado do TRV a partir de Gladiolos sp. (AS-TRV-G) e para o "pea early browning virus" (AS-PEBV), foram gentilmente enviados por D.Z. Maat (Instituut Voor Plantenziektenkundig Onderzoek - Wageningen - Holanda).

3.7. Testes usados para observar as reações serológicas

Testes de microprecipitina em caixas de Petri (van Slogteren, 1955), precipitina em tubos e dupla difusão em ágar (Ouchterlony, 1949, 1958, 1962; Ball, 1961) foram utilizados para observar as reações serológicas entre as frações C, P e G do VAP e entre o VAP e alguns isolados do grupo do TRV.

Os testes de dupla difusão em ágar foram feitos da seguinte forma: 3 ml de ágar a 1% em tampão de fosfato 0,01 M pH 7,0 contendo 0,85% de NaCl (TFS) foram colocados sobre uma lâmina de vidro (75x25 mm) e deixados em temperatura ambiente para solidificar. Posteriormente, com auxílio de um canudinho de plástico de 3 mm de diâmetro (para cortar o ágar) e de uma agulha de injeção (Incisa 30.8) provida de um tubo de borracha ligado a uma trompa de vácuo (para sugar o ágar), fizeram-se os orifícios para a colocação dos reagentes (antígenos e antissoros). A disposição dos orifícios e as distâncias entre os mesmos obedeceu a um esquema previamente estabelecido. As lâminas preparadas para a reação foram colocadas em caixas de Petri (providas de um pedaço de algodão embebido em água para manter a umidade) e mantidas em temperatura ambiente até o aparecimento das linhas de precipitação. Finalmente as lâminas foram submetidas a um pro-

cesso de lavagem em solução salina, secagem (com auxílio de papel de filtro) e, posteriormente, coloridas pelo negro de amido (Tavares, 1963).

Em todos os testes serológicos foram sempre incluídos contrôles apropriados para melhor interpretação dos resultados. Os testes foram repetidos uma série de vezes, sendo que as reações foram feitas utilizando-se sempre os antígenos e antissoros em diferentes diluições em TFS, obedecendo a uma progressão geométrica de razão 2.

3.8. Testes de absorção

A absorção dos antissoros foi feita da seguinte forma: adicionou-se ao antissoro o antígeno, 1:1 (V/V), em diferentes diluições em TFS, em tubos de vidro (65x6mm) deixando-se os tubos em banho-maria (37°C) durante 60 minutos. Posteriormente os tubos foram colocados no refrigerador durante 24 horas. Em seguida submeteu-se o material a uma centrifugação a 5000 rpm por 20 minutos. Ao líquido sobrenadante adicionou-se novamente o antígeno em diferentes diluições para verificar se, de fato, a absorção havia sido completa. Submeteu-se o material ao mesmo tratamento descrito anteriormente. O líquido sobrenadante, obtido após a centrifugação, foi então considerado como antissoro absorvido para um determinado antígeno.

3.9. Tratamento térmico das frações C,P e G

Para observar o efeito da temperatura no comportamento antigênico das partículas do VAP, as frações C,P e G foram submetidas a tratamentos em diferentes temperaturas e por diversos períodos. Para o tratamento térmico, colocou-se 0,2 ml do material em empôlas de vidro de paredes finas.

As empôlas, devidamente seladas, foram mergulhadas num recipiente contendo água aquecida na temperatura desejada para o teste. Decorrido o tempo previsto para o aquecimento, as empôlas foram retiradas e imediatamente colocadas num recipiente contendo água gelada (4°C). Após o resfriamento, o material foi centrifugado durante 20 minutos a 6000 rpm e o líquido sobrenadante foi utilizado para os testes serológicos, observações ao microscópio electrónico e testes de infetividade.

3.10. Testes de infetividade das frações C,P e G

Os testes de infetividade das frações C,P e G foram feitos em plantas de Chenopodium amaranticolor Coste & Reyn e Chenopodium quinoa Wild. As frações foram inoculadas mecânicamente, usando-se carborundum como abrasivo. Inocularam-se 5 fôlhas de cada planta e fêz-se uma contagem do número de lesões locais nas 3 fôlhas que apresentavam o maior número de lesões.

3.11. Observações das frações C,P, G e dos precipitados serológicos ao microscópio electrónico

As frações C,P e G foram examinadas no microscópio electrónico Siemens Elmiskop I, usando-se a técnica de contrastação negativa (Brenner & Horne, 1959).

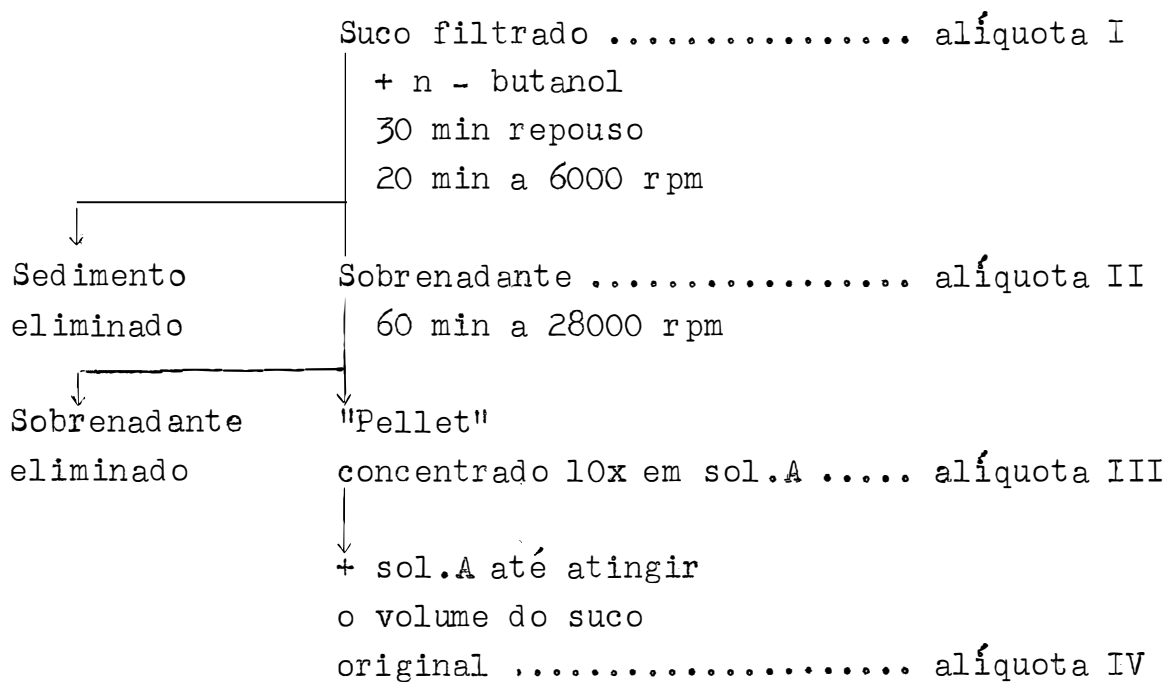
Os precipitados serológicos obtidos nos testes de precipitina em tubos foram centrifugados a 6000 rpm durante 20 minutos e resuspendidos em água destilada. A operação foi repetida de duas a três vezes. Posteriormente a suspensão do precipitado foi observada ao microscópio electrónico pela técnica de contrastação negativa.

3.12. Diagnóstico serológico da presença do VAP em plantas de fumo, pimentão e tomate

As alíquotas I, II, III e IV (Esquema 2) foram utilizadas, como antígeno, nos testes de microprecipitina em caixas de Petri e dupla difusão em ágar para diagnosticar a presença do VAP em plantas de fumo (Nicotiana tabacum L., var. Turkish), pimentão (Capsicum annum L.) e tomate (Lycopersicon esculentum Mill.).

Fôlhas de plantas de fumo, pimentão e tomate foram inoculadas mecanicamente com um isolado do VAP, mantido na Seção de Virologia do Instituto Agronômico, em Campinas. Oito a dez dias após as inoculações colheram-se, de cada lote de 10 plantas, 60 g de fôlhas que apresentavam sintomas de infecção sistêmica. Cada lote de fôlhas foi macerado, individualmente, num almofariz e o suco (alíquota I) obtido foi filtrado através de um pano de algodão. O filtrado foi tratado com n-butanol (a 8% do volume do suco original), deixado em temperatura ambiente por 30 minutos e posteriormente centrifugado a 6000 rpm durante 20 minutos. Eliminou-se o sedimento e o líquido sobrenadante (alíquota II) foi submetido a uma ultracentrifugação a 28000 rpm durante 60 minutos. Descartou-se o líquido sobrenadante e dissolveu-se o "pellet" em solução A, num volume dez vezes menor que o do suco original (alíquota III). Finalmente, adicionou-se à alíquota III um volume de solução A tal que permitiu reproduzir o volume do suco original (alíquota IV).

Esquema 2. Clarificação e concentração do suco de fôlhas de plantas de fumo, pimentão e tomate infetadas com o VAP



4. RESULTADOS

4.1. Purificação e separação das partículas do VAP

A técnica de congelamento do suco de plantas de fumo infetadas com o VAP, seguida de ultracentrifugações diferenciais e de dois gradientes de densidade, permitiu obter partículas de vírus satisfatoriamente purificadas. Na primeira fase da purificação obtiveram-se sempre os dois tipos de partículas características do VAP. As observações ao microscópio electrónico mostraram que as partículas pequenas (55 μ) e as partículas grandes (200 μ) contidas na fração C estavam praticamente livres de quaisquer impurezas (Fig. 1). A fração C, quando submetida ao primeiro gradiente de densidade, desdobrava-se em duas camadas (B-1 e B-2) cujas distâncias médias a partir do menisco foram de 25 mm e 35 mm, respectivamente. Observações feitas ao microscópio electrónico revelaram que a camada B-1 continha, além das partículas pequenas, uma quantidade razoável de partículas grandes. Da mesma forma, a camada B-2, constituída em sua maioria de partículas grandes, continha um certo número de partículas pequenas. A realização de um segundo gradiente permitiu obter as camadas B-12 e B-22 (distando em média 25 mm e 35 mm a partir do menisco, respectivamente) perfeitamente homogêneas com relação às partículas pequenas e partículas grandes (Figs. 2,3 e 4).

4.2. Infetividade das frações C, P e G

Observaram-se diferenças com relação à infetividade das diversas frações testadas (Quadro I). Notou-se que a fração P, após o primeiro gradiente, apresentou ainda uma quantidade razoável de partículas grandes, fato que explica perfeitamente o aparecimento de lesões locais nas plantas

skor



Figura 1. Fração C contendo partículas pequenas (55 μ) e partículas grandes (200 μ). (40000 x).



Figura 2. Tubos de gradiente de densidade. B-1 e B-2 (após o 1º gradiente); B-12 e B-22 (após o 2º gradiente).



Figura 3. Fração P - partículas pequenas (55 μ). (40000 x).

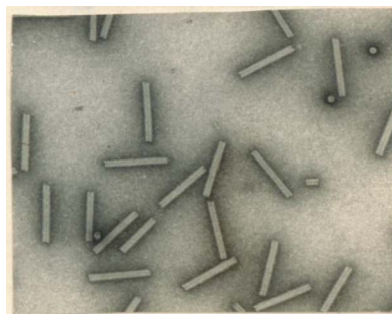


Figura 4. Fração G - partículas grandes (200 μ). (40000 x).

Quadro 1. Resultados dos testes de infetividade das frações C, P e G.

Experimento	Fração C		Fração P				Fração G			
	C. quinoa	C. amar.	1º gradiente	2º gradiente	1º gradiente	2º gradiente	1º gradiente	2º gradiente	3º gradiente	
Nº	C. quinoa	C. amar.	C. quinoa	C. amar.	C. quinoa	C. amar.	C. quinoa	C. amar.	C. quinoa	C. amar.
1	300*	200	42	200	1	1	300	220	350	600
2	600	1200	35	24	0	0	600	1200	450	900
3	410	1000	40	60	0	0	600	500	190	450

* Número total de lesões nas três folhas que apresentavam o maior número de lesões.

AR.7

teste. Verificou-se também, que a realização de um segundo gradiente permitiu separar perfeitamente as partículas pequenas das partículas grandes e demonstrar que somente as partículas grandes foram infetivas.

4.3. Título dos antissoros preparados para as frações C,P e G

As determinações dos títulos foram feitas em testes de precipitina em tubos a uma temperatura de 37°C (banho-maria). As leituras finais das reações (evidenciadas pelo aparecimento de um precipitado) foram efetuadas após 60 minutos. Um total de onze antissoros diferentes foram utilizados nos testes serológicos. Notou-se que, independentemente do processo de imunização usado, os títulos dos antissoros foram praticamente os mesmos (Quadro 2).

4.4. Título dos antissoros nos testes serológicos cruzados entre as frações C,P e G e após o processo de absorção com as frações C,P e G.

As reações foram feitas em testes de precipitina em tubos, a uma temperatura de 37°C (banho-maria), fazendo-se a leitura final após 60 minutos. Os títulos obtidos nas reações cruzadas foram praticamente os mesmos, indicando existir identidade serológica entre as frações C,P e G (Quadro 3).

Os resultados dos testes de absorção vieram reforçar as provas em favor da identidade serológica entre as três frações (Quadro 4). Os títulos obtidos nas reações cruzadas entre os antígenos e antissoros homólogos e heterólogos, não absorvidos, foram praticamente os mesmos. A absorção dos antissoros homólogos e heterólogos com qualquer

Quadro 2. Número de injeções e título dos antissoros para as frações C,P e G.

Fração	Coelho Nº	Nº de injeções			Título	Código
		i.v.	i.m.a.i.	i.m.a.c.		
C	65	8	3	-	^x 1024	AS-VAP-C-65
	73	-	1	-	512	AS-VAP-C-73
	74	6	-	-	512	AS-VAP-C-74
	81	2	-	-	512	AS-VAP-C-81
P	34	1	-	-	512	AS-VAP-P-34
	77	3	-	2	512	AS-VAP-P-77
	78	-	-	1	512	AS-VAP-P-78
G	35	1	-	-	512	AS-VAP-G-35
	79	1	-	-	512	AS-VAP-G-79
	80	-	-	1	512	AS-VAP-G-80
	86	3	-	1	256	AS-VAP-G-86

^x - Os títulos estão representados pelo inverso da diluição e referem-se às reações homólogas.

i.v.= intravenosa.

i.m.a.i.= intramuscular com adjuvante incompleto.

i.m.a.c.= intramuscular com adjuvante completo.

1051

Quadro 3. Título dos antissoros obtidos nos testes serológicos cruzados entre as frações C, P e G.

Antissoro	Antígeno		
	fração C	fração P	fração G
AS-VAP-C-65	^x 1024	512	512
AS-VAP-C-73	512	512	256
AS-VAP-C-74	512	512	512
AS-VAP-C-81	512	512	512
AS-VAP-P-34	256	512	512
AS-VAP-P-77	512	512	512
AS-VAP-P-78	512	512	512
AS-VAP-G-35	512	128	512
AS-VAP-G-79	256	512	512
AS-VAP-G-80	256	512	512
AS-VAP-G-86	256	256	256
Sôro Normal	0	0	0
AS-TMV-87	0	0	0
AS-PVX-31	0	0	0
AS-PVS-61	0	0	0

^x - Os títulos estão representados pelo inverso da diluição.

AS-TMV-87 = antissoro para o TMV

AS-PVX-31 = antissoro para o vírus X da batata (PVX).

AS-PVS-61 = antissoro para o vírus S da batata (PVS).

Quadro 4. Título dos antissoros após a absorção cruzada com as frações C,P e G.

Antissoro	Absorvido com a fração	Antígeno		
		fração C	fração P	fração G
AS-VAP-C-65	-	x512	512	512
	C	0	0	0
	P	0	0	0
AS-VAP-C-73	G	0	0	0
	-	256	256	512
	C	0	0	0
AS-VAP-C-74	P	0	0	0
	G	0	0	0
	-	512	512	512
AS-VAP-C-81	C	0	0	0
	P	0	0	0
	G	0	0	0
AS-VAP-P-34	-	256	256	256
	C	0	0	0
	P	0	0	0
AS-VAP-P-77	G	0	0	0
	-	256	256	128
	C	0	0	0
AS-VAP-P-78	P	0	0	0
	G	0	0	0
	-	512	512	512
AS-VAP-G-35	C	0	0	0
	P	0	0	0
	G	0	0	0
AS-VAP-G-79	-	256	256	256
	C	0	0	0
	P	0	0	0
AS-VAP-G-80	G	0	0	0
	-	512	512	512
	C	0	0	0
AS-VAP-G-86	P	0	0	0
	G	0	0	0
	-	256	256	256

^x - Os títulos estão representados pelo inverso da diluição.
 - Antissoro não absorvido.

fração usada como antígeno removeu totalmente os anticorpos. Desta forma os antissoros absorvidos, quando colocados para reagir com as frações C,P e G, deram sempre resultados negativos.

4.5. Testes serológicos entre o VAP e alguns isolados do grupo do TRV

Os testes foram feitos pela técnica de precipitina em tubos. Os dados que apresentamos (Quadro 5) foram obtidos com base nos resultados da permuta de antissoros feita com o Dr.C.H.Cadman e D.Z.Maat. O VAP apresentou reações serológicas com o isolado do TRV da Escócia e com dois isolados do TRV da Holanda.

4.6. Título dos antissoros obtidos nas reações de dupla difusão em ágar

Os títulos obtidos nas reações serológicas de dupla difusão em ágar foram da ordem de 1:32. Observou-se, também, que os antissoros reagiram igualmente para as frações C,P e G quando se faziam reações cruzadas. Notou-se o aparecimento de uma única linha de precipitação, localizada sempre próxima do antígeno (Figs. 5,6 e 7).

4.7. Testes serológicos, infetividade e observações ao microscópio electrónico das frações C,P e G submetidas a tratamentos térmicos

O tratamento térmico das frações C,P e G, durante 10 minutos a diferentes temperaturas, permitiu constatar uma série de fatos de interêsse (Quadro 6). A temperatura afetou sensivelmente a morfologia das partículas contidas nas frações C,P e G (Figs. 8A-D e 9A-F). Os tes

1207

Quadro 5. Título dos antissoros obtidos nas reações cruzadas entre o VAP, alguns isolados do TRV e o PEBV.

Antissoro	VAP	TRV-E	TRV-S	TRV-H	TRV-HT	TRV-G	PEBV
AS-VAP-C-65	^x 1024	8	0	4	32	0	0
AS-TRV-E	8	128	0	128	128	-	-
AS-TRV-S	0	0	128	128	128	-	-
AS-TRV-H	4	128	128	128	128	-	-
AS-TRV-HT	2	-	-	-	1024	-	512
AS-TRV-G	0	-	-	-	-	256	-
AS-PEBV	0	-	-	-	512	-	1024

^x - Os títulos estão representados pelo inverso da diluição.

- = Não foram feitos testes.

TRV-E = TRV isolado da Escócia.

TRV-S = TRV isolado dos Estados Unidos.

TRV-H = TRV isolado da Holanda.

TRV-HT = TRV isolado da Holanda (típico).

TRV-G = TRV isolado a partir de Gladiolos sp.

PEBV = pea early browning virus.



Figura 5. Teste serológico de dupla difusão em agar. Antissoro para partículas pequenas (AS-VAP-C-81) em diluição x Fração C (partículas pequenas-55 μ e partículas grandes-200 μ). Distância entre os orifícios = 8mm (centro a centro). a=linha a



Figura 6. Teste serológico de dupla difusão em agar. Antissoro para partículas pequenas (AS-VAP-P-77) em diluição x Fração G (partículas grandes-200 μ) Distância entre os orifícios = 8mm (centro a centro). a=linha a



Figura 7. Teste serológico de dupla difusão em agar. Antissoro para partículas grandes (AS-VAP-G-79) em diluição x Fração P (partículas pequenas-55 μ). Distância entre os orifícios = 8mm (centro a centro). a=linha a

Quadro 6. *Resultados dos testes serológicos, de infetividade e das observações ao microscópio electrónico das frações C,P e G submetidas a tratamentos térmicos durante 10 minutos.

Fração	Teste	Contrôle	Temperatura em ° C											
			40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	
C	Sa	+a	+a	+a	+a	+a	+bc	+bc	+bc	+bc	+bc	+bc	+bc	+bc
	Sg	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	ME	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	I	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
P	Sa	+a	+a	+a	+a	+a	+bc	+bc	+bc	+bc	+bc	+bc	+bc	+bc
	Sg	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	ME	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-
	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	Sa	+a	+a	+a	+a	+a	+bc	+bc	+bc	+bc	+bc	+bc	+bc	+bc
	Sg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ME	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	I	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

Sa= linha de precipitação (teste de dupla difusão em ágar); a= linha a, b= linha b, c= linha c.
 Sg= precipitado serológico (teste de microprecipitina em caixas de Petri).
 ME= presença de partículas ao microscópio electrónico.
 I= infetividade (lesões locais em C.quinao e C.amaranticolor).
 (+)= lesões locais e partículas nem sempre presentes.
 * - representam a média de varios testes efetuados.

2007

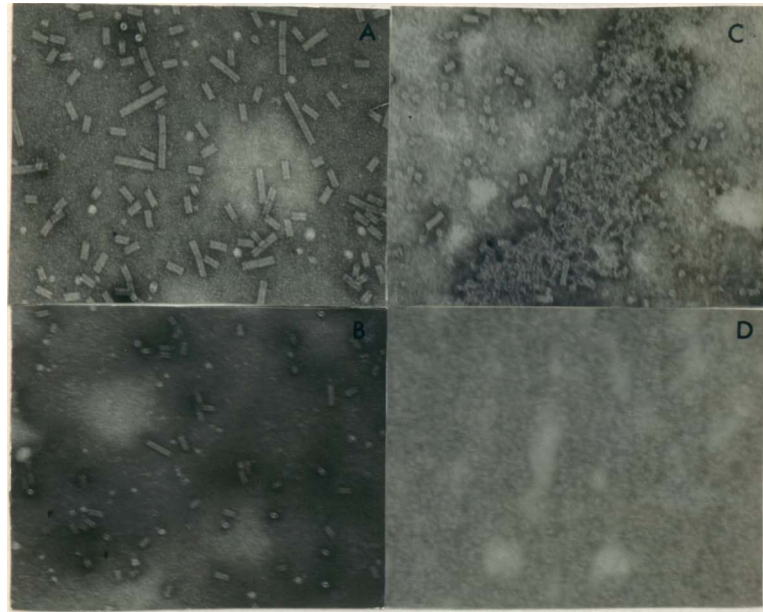


Figura 8. Fração P (partículas pequenas - 55 μ) aquecida durante 10 minutos a diferentes temperaturas. A = controle não aquecido; B = 60°C; C = 65°C; D = 70°C (40000 x).

207

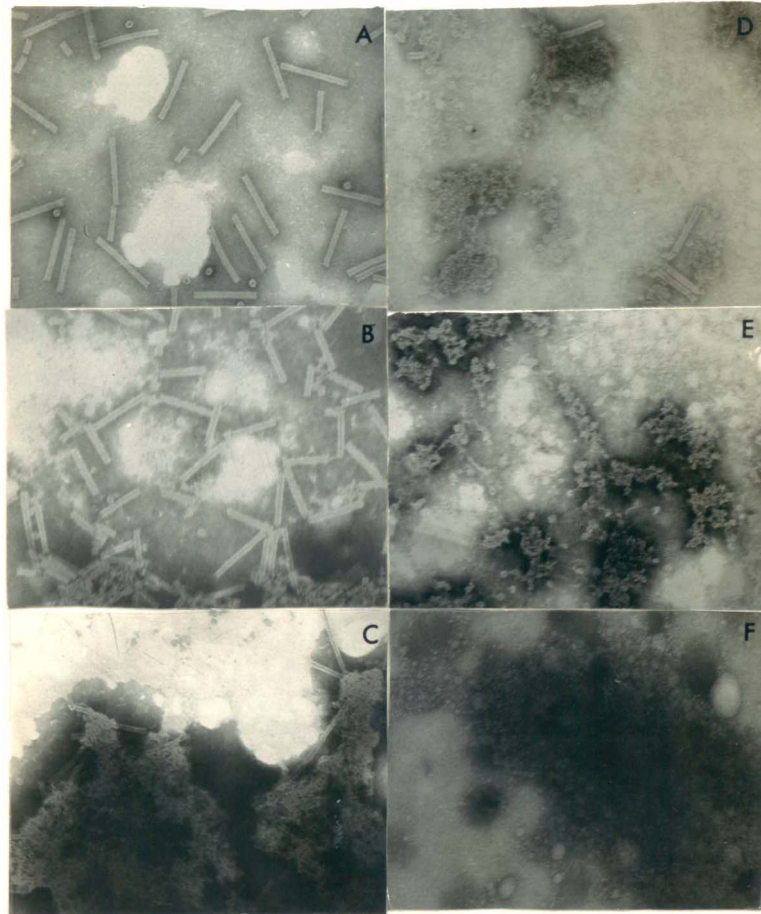


Figura 9. Fração G (partículas grandes - 200 μ) aquecida durante 10 minutos a diferentes temperaturas. A = controle não aquecido; B = 65°C; C = 70°C; D = 75°C; E = 80°C; F = 90°C (40000 x).

tes de infetividade mostraram que as frações C e G permaneceram ativas até o tratamento a 70°C por 10 minutos. Com relação às propriedades antigênicas verificou-se que, em testes de microprecipitina em caixas de Petri e precipitina em tubos, as frações C e G deram reações serológicas positivas para as preparações tratadas até a 70°C por minutos. A fração P permaneceu serologicamente ativa até o tratamento a 60°C durante 10 minutos. Nos testes serológicos de dupla difusão em ágar, feitos com antissoros homólogos e heterólogos, pôde-se observar o aparecimento de linhas de precipitação para tôdas as frações em todos tratamentos térmicos realizados. Notou-se inicialmente a formação de uma única linha de precipitação próxima do antígeno (linha a). Nos tratamentos a 60°C observou-se o aparecimento de uma segunda linha de precipitação próxima do antissoro (linha c). Do tratamento térmico a 65°C em diante observou-se que a linha de precipitação que inicialmente ficava próxima do antígeno (linha a) deslocou-se um pouco mais na direção do antissoro (linha b). A linha c permaneceu constante até o tratamento térmico a 90°C (Figs. 10,11,12 e 13).

4.8. Teste serológico de dupla difusão em ágar para estudar o comportamento antigênico do VAP e do TMV após um tratamento térmico a 90°C por vários períodos.

Em face dos resultados obtidos nos testes de dupla difusão em ágar com as frações C,P e G do VAP, submetidas a tratamentos térmicos, procurou-se fazer um teste comparativo com o TMV. Submeteram-se as frações C,P,G e o TMV (purificado pelo mesmo processo descrito para a primeira fase da purificação do VAP) a um tratamento térmico a 90°C durante vários períodos. Os resultados mostraram que as frações C,P e G, embora submetidas ao tratamento térmico, ainda reagiram serologicamente, fato que não aconteceu com o TMV (Quadro 7).

1107



Figura 10. Teste serológico de dupla difusão em ágar. Antissoro para partículas pequenas e partículas grandes (AS-VAP-C-81) x Fração C (partículas pequenas - 55 μ e partículas grandes - 200 μ) aquecida a diferentes temperaturas durante 10 minutos; a = linha a; b = linha b; c = linha c. Distância entre os orifícios = 8mm (Centro a centro).

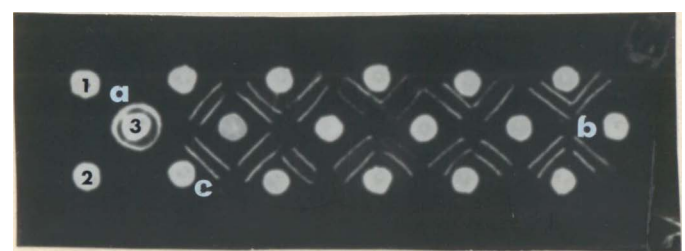


Figura 11. Teste serológico de dupla difusão em ágar. 1 = Antissoro para partículas grandes (AS-VAP-G-86); 2 = Antissoro para partículas pequenas (AS-VAP-P-77); 3 = Fração G (partículas grandes - 200 μ) aquecida durante 10 minutos a diferentes temperaturas. Da esquerda para a direita; controle não aquecido; 70°C; 75°C; 80°C; 85°C e 90°C. Distância entre os orifícios = 8 mm (centro a centro). a = linha a; b = linha b; c = linha c.

1107

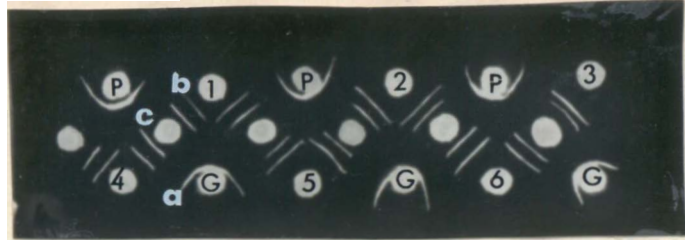


Figura 12. Teste serológico de dupla difusão em agar. Antissoros para partículas pequenas (AS-VAP-P-34) x Fração P (partículas pequenas - 55 μ) e Fração G (partículas grandes - 200 μ) aquecidas durante 10 minutos a diferentes temperaturas. P = Fração P não aquecida; 1 = Fração P a 70°C; 2 = Fração P a 80°C; 3 = Fração P a 90°C. G = Fração G não aquecida; 4 = Fração G a 70°C; 5 = Fração G a 80°C; 6 = Fração G a 90°C. Distância entre os orifícios = 8 mm (centro a centro). a = linha a; b = linha b; c = linha c.

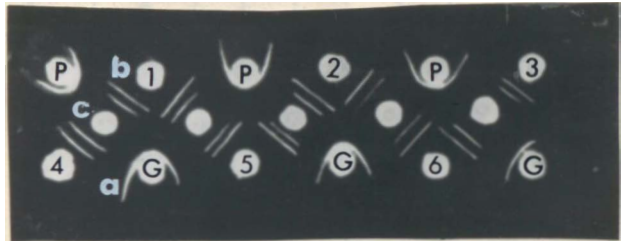


Figura 13. Teste serológico de dupla difusão em agar. Antissoros para partículas grandes (AS-VAP-G-86) x Fração P (partículas pequenas - 55 μ) e Fração G (partículas grandes - 200 μ) aquecidas durante 10 minutos a diferentes temperaturas. P = Fração P não aquecida; 1 = Fração P a 70°C; 2 = Fração P a 80°C; 3 = Fração P a 90°C. G = Fração G não aquecida; 4 = Fração G a 70°C; 5 = Fração G a 80°C; 6 = Fração G a 90°C. Distância entre os orifícios = 8 mm (centro a centro). a = linha a; b = linha b; c = linha c.

1207

Quadro 7. *Resultados obtidos nos testes serológicos de dupla difusão em agar para estudar o comportamento antigênico das frações C,P,G e do TMV após um tratamento térmico de 90°C em diversos períodos.

Antissoro	Antígeno	Contrôle	Temperatura de 90°C durante (minutos)					
			10	15	30	60	120	180
AS-VAP-P-77	C	+a	+bc	+bc	+bc	+(b)c	+(b)c	+(b)c
	P	+a	+bc	+bc	+(b)c	+(b)c	+(b)c	+(b)c
	G	+a	+bc	+bc	+(b)c	+(b)c	+(b)c	+(b)c
	TMV	-	-	-	-	-	-	-
AS-TMV-87	C	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-
	G	-	-	-	-	-	-	-
	TMV	+a	-	-	-	-	-	-

Contrôle = sem aquecimento ; a=linha a ; b=linha b ; (b)=linha b nem sempre presente c=linha c

+ reação positiva

- reação negativa

* representam a média de vários testes efetuados.

4.9. Observações dos precipitados serológicos ao microscópio electrónico

Os precipitados serológicos, resultantes das reações entre as frações P contra antissoro para a fração G e vice-versa, examinados ao microscópio electrónico, possibilitaram observações de interesse. A notável uniformidade das frações P e G e os resultados das reações serológicas cruzadas evidenciaram a identidade serológica entre as partículas pequenas e grandes do VAP (Figs. 14 e 15).

4.10. Diagnóstico serológico da presença do VAP em plantas de fumo, pimentão e tomate

Experimentos prévios feitos para diagnosticar serologicamente a presença do VAP no suco extraído de folhas de plantas de fumo, pimentão e tomate, infetadas com o vírus, deram resultados negativos. Em vista disto, elaborou-se um esquema para investigar quais os motivos que impediam as reações serológicas. Os resultados dos testes serológicos de microprecipitina e de dupla difusão em ágar, feitos com as alíquotas I, II, III e IV (Esquema 2) das plantas de fumo, pimentão e tomate, vieram esclarecer alguns pontos importantes (Quadro 8). Verificou-se que as alíquotas I e II, correspondentes ao suco filtrado e ao líquido sobrenadante após o tratamento com n-butanol e centrifugação a baixa rotação, respectivamente, deram reações não específicas para pimentão e tomate nos testes de microprecipitina. No caso particular do tomate, as reações não específicas foram observadas também nos testes de dupla difusão em ágar. As alíquotas IV, correspondentes a parte dos sucos concentrados que, após a adição de solução A, reproduziram o volume dos sucos originais, deram resultados serológicos negativos, tanto para pimentão como para toma-

1407

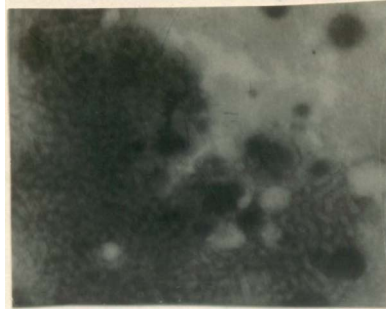


Figura 14. Electromicrografia do precipitado serológico obtido na reação entre a Fração P (partículas pequenas - 55 μ) x Antissoro para partículas grandes (AS - VAP - G - 86). (40000 x).

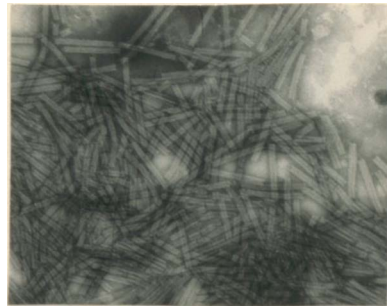


Figura 15. Electromicrografia do precipitado serológico obtido na reação entre a Fração G (partículas grandes - 200 μ) x Antissoro para partículas pequenas (AS-VAP - P - 77). (40000 x).

De 1

Quadro 8. *Resultados dos testes serológicos de microprecipitina em caixa de Petri e dupla difusão em ágar feitos com as alíquotas I, II, III e IV do suco de plantas de fumo, pimentão e tomate infetadas com VAP.

Teste	Antissoro	Fumo				Pimentão				Tomate			
		I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Microprecipitina	AS-VAP-C-74	(+)	(+)	+	(+)	?	?	+	-	?	?	+	-
	AS-VAP-P-77	(+)	(+)	+	(+)	?	?	+	-	?	?	+	-
	AS-VAP-G-86	(+)	(+)	+	(+)	?	?	+	-	?	?	+	-
	Sôro Normal	-	-	-	-	?	?	-	-	?	?	-	-
Dupla difusão em ágar	AS-VAP-C-74	-	-	+a	-	-	-	+a	-	?	?	+a	-
	AS-VAP-P-77	-	-	+a	-	-	-	+a	-	?	?	+a	-
	AS-VAP-G-86	-	-	+a	-	-	-	+a	-	?	?	+a	-
	Sôro Normal	-	-	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-

+ = reação positiva ; (+) = reação positiva nem sempre presente

? = reação não específica ; +a = reação positiva, com linha de precipitação próxima do antígeno (linha a)

- = reação negativa

* - representam a média de vários testes efetuados.

AKM

te. As alíquotas I,II e IV do fumo deram, em alguns casos, reações positivas em testes de microprecipitina. As alíquotas III, correspondentes aos sucos dez v^êzes mais concentrados, deram sempre reações serológicas positivas, tanto em testes de microprecipitina como em testes de dupla difusão em ágar (Fig. 16).

oooo000oooo

107

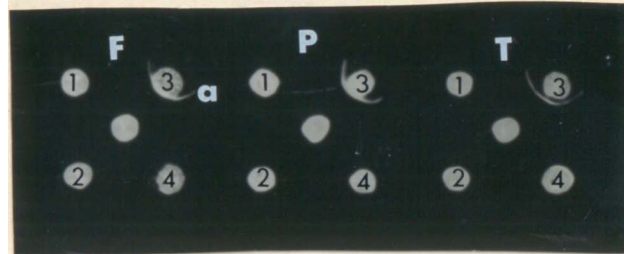


Figura 16. Teste serológico de dupla difusão em ágar. Antissoro para partículas pequenas e partículas grandes (AS-VAP-C-74) x alíquotas I(1), II(2), III(3) e IV(4) do suco de plantas de fumo (F), pimentão (P) e tomate (T). Distância entre os orifícios = 8 mm (centro a centro). a = linha a.

5. DISCUSSÃO

Ensaio preliminares para purificar o VAP foram feitos com auxílio de técnicas descritas na literatura. Dentre outras podemos citar o tratamento do suco de folhas de fumo infetadas pelo VAP com n-butanol a 8% (Silva, 1965), o processo de clarificação do suco pela adsorção em fosfato hidratado de cálcio (Fulton, 1959; Silva et al. 1961), a clarificação do suco pela aplicação de um sistema difásico, éter-tetracloro de carbono (Wetter, 1960).

O desenvolvimento da técnica de congelamento do suco de plantas de fumo infetadas pelo VAP, centrifugações diferenciais e dois ciclos de centrifugações em gradiente de densidade de sacarose, permitiu a purificação e separação das partículas grandes e partículas pequenas do VAP. Os resultados foram mais satisfatórios do que aqueles obtidos nos ensaios preliminares. Experimentos de extração do suco de folhas de fumo infetadas pelo VAP e a conservação no congelador (-20°C) possibilitaram algumas observações importantes. Em primeiro lugar, verificou-se que o suco conservado no congelador, por um período superior a 72 horas, e posteriormente submetido a uma centrifugação a 5000 rpm durante 20 minutos, permitiu a obtenção de um líquido sobrenadante bastante claro. Dispensaram-se, dessa forma, os tratamentos com solventes orgânicos e outras substâncias que normalmente são empregados para denaturar as proteínas normais da planta hospedeira do vírus, dissolver os lipídeos, eliminar a clorofila e precipitar os detritos das células rompidas. Em segundo lugar, observou-se que a conservação do suco no congelador não alterou a infetividade, a morfologia e nem as propriedades antigênicas das partículas do VAP. Com base nos

experimentos realizados, pode-se afirmar que o VAP, contido no suco de fôlhas ou raízes de plantas de fumo, mantém suas propriedades quando conservado no congelador por um período mínimo de 4 meses. Desta forma há possibilidade de se armazenar uma grande quantidade de material facilitando sensivelmente o trabalho de purificação.

Na purificação do VAP, Silva (1965) utilizou apenas uma centrifugação em gradiente de densidade de sacarose para separar as partículas pequenas das partículas grandes. Obteve também provas de que, provavelmente, a infetividade do VAP estaria relacionada às partículas grandes (200 mu). Os resultados obtidos no presente trabalho revelaram, porém, ser necessário a aplicação de dois ciclos de centrifugação em gradiente de densidade para que a separação das partículas seja completa. Na verdade, as partículas grandes quando submetidas a um segundo gradiente apresentaram algumas partículas menores. Estas partículas, porém, não possuíam uniformidade para serem consideradas como partículas pequenas (55 mu) e portanto seria mais lógico interpretar como sendo fragmentos das partículas grandes. Outro fato que reforçou a afirmação de que as partículas menores, que foram observadas na fração G, eram fragmentos das partículas grandes foi o seguinte: os testes de aquecimento, feitos com a fração P, mostraram que as partículas pequenas desagregavam-se totalmente quando aquecidas a 70°C durante 10 minutos. Entretanto, os mesmos testes feitos com a fração G mostraram que fragmentos de partículas podiam ser observados mesmo após o tratamento a 85°C durante 10 minutos. Quer tenham êsses fragmentos resistido ao tratamento ou se formado após êste, não são êles idênticos às partículas pequenas (Figs. 8A-D e 9A-F).

Os resultados obtidos nos testes de infetividade

skm

das frações P e G separadas por dois gradientes de densidade (Quadro 1) evidenciaram que a atividade do VAP está relacionada unicamente às partículas grandes. Além disso, os testes de infetividade feitos com as frações submetidas a tratamentos térmicos mostraram que as partículas grandes mantinham a atividade biológica até o tratamento a 70°C durante 10 minutos, podendo em alguns casos chegar até 85°C (Quadro 6). É importante notar que o tratamento térmico a 70°C durante 10 minutos induziu completa desagregação das partículas pequenas.

Harrison e Nixon (1959) apresentaram evidências de que as partículas pequenas e partículas grandes do TRV seriam serologicamente idênticas. Oliveira e Wetter (1963), em estudos preliminares, verificaram que o mesmo ocorria com os dois tipos de partículas do VAP. Os trabalhos de Bercks (1963, 1965), porém, indicaram que, para averiguar sobre relações de parentesco entre vírus diferentes, estirpes ou entre componentes de um mesmo vírus, seria preciso que se preparassem antissoros específicos para cada antígeno a ser estudado. Além disso, sempre que possível, cada antígeno deveria ser utilizado na imunização de mais de um animal, visto que a capacidade de formar anticorpos é variável. Finalmente dever-se-ia proceder a uma série de testes serológicos cruzados e de absorção para então demonstrar ou não as relações serológicas de identidade.

As possíveis diferenças antigênicas entre as partículas pequenas e as partículas grandes do VAP foram investigadas com auxílio de antissoros específicos. Verificou-se que os títulos dos antissoros nas reações homólogas foram praticamente iguais, independentemente do processo de imunização (Quadro 2), indicando que os antígenos possuíam alguns grupamentos antigênicos muito ativos. Quando

foram feitas as reações cruzadas (Quadro 3) entre os antígenos e antissoros homólogos e heterólogos, os títulos obtidos foram também praticamente os mesmos. Observou-se ainda que, após o processo de absorção cruzada (Quadro 4), os antissoros não reagiram com os antígenos C,P e G. Os testes cruzados e os testes de absorção indicaram que as frações C,P e G possuíam grupamentos antigênicos idênticos.

Nos testes de dupla difusão em ágar obteve-se sempre uma única linha de precipitação, independentemente dos antígenos (C,P e G) e antissoros usados. A linha de precipitação mantinha-se sempre próxima do orifício do antígeno (Figs. 5,6,7,10,11,12 e 13), indicando pouca difusibilidade das partículas. Quando as frações C,P e G foram colocadas lado a lado, obteve-se uma perfeita união das linhas de precipitação, indicando identidade serológica (Ouchterlony,1962). Os resultados dos testes de dupla difusão em ágar confirmaram a perfeita identidade serológica entre as frações C,P e G. Os precipitados serológicos, obtidos nas reações cruzadas entre a fração P e antissoro para a fração G e vice-versa, foram observados ao microscópio eletrônico (Figs. 14 e 15). Considerando-se a uniformidade dos antígenos usados nas reações pode-se afirmar que as partículas pequenas e partículas grandes do VAP são serologicamente idênticas.

Os tratamentos térmicos das frações C,P e G permitiram uma série de observações importantes (Quadro 6). A fração P, submetida aos diversos tratamentos térmicos, não foi infetiva o mesmo ocorrendo com o controle não aquecido. As frações C e G permaneceram infetivas até 70°C durante 10 minutos sendo que em alguns casos a infetividade foi mantida após o tratamento a 85°C durante 10 minutos. Os resultados obtidos confirmaram os testes de inativação

RM

térmica do VAP feitos por Costa et al (1960). A atividade serológica das frações C,P e G foi preservada mesmo após os tratamentos térmicos a 90°C por vários períodos. Nos testes de microprecipitina a fração P manteve atividade serológica até o tratamento a 60°C enquanto que as frações C e G foram ativas até o tratamento a 70°C. O aspecto dos precipitados indicava que as reações eram devidas à presença de partículas intatas ou parcialmente alteradas. Alíquotas das frações C,P e G observadas ao microscópio eletrônico mostraram que a fração P, aquecida a 60°C durante 10 minutos, continha partículas pequenas em fase de desagregação (Fig. 8-B). As frações C e G aquecidas a 70°C continham, além de fragmentos e partículas em desagregação, um número razoável de partículas intatas (Fig. 9-C). As linhas de precipitação, obtidas nos testes de dupla difusão em ágar, permitiram uma melhor interpretação das modificações que se processaram na morfologia das partículas do VAP submetidas aos tratamentos térmicos. A linha a (Fig. 10), próxima do antígeno, foi indicativa da presença de grande número de partículas intatas e portanto com poucas possibilidades de difusão. O aparecimento da linha b foi interpretado como sendo devido à reação de fragmentos menores das partículas desagregadas. Finalmente a linha c, próxima do antissoro, indicou que a desagregação das partículas, possivelmente, estava ao nível de grupos de subunidades.

Sabe-se que a unidade infetiva do vírus é o ácido nucléico. A perda da atividade biológica está diretamente relacionada com alterações que possam ocorrer no ácido nucléico. A atividade serológica está relacionada com a capa protéica do vírus. Alterações que promovam desnaturação dos grupamentos antigênicos tornam a proteína serologicamente inativa. Um vírus de planta, quando é submetido

a tratamentos térmicos, pode perder a atividade biológica e, ainda assim, manter a atividade serológica (Bawden, 1943). Testes comparativos foram feitos para estudar o comportamento serológico do VAP em relação ao TMV, após ambos terem sido submetidos a um tratamento térmico a 90°C durante vários períodos (Quadro 7). As alterações morfológicas que se processaram nas partículas do VAP e do TMV foram sensivelmente diferentes. Os testes serológicos de dupla difusão em ágar deram resultados negativos para o TMV enquanto que as frações C, P e G do VAP mostraram linhas de precipitação mesmo após 180 minutos de tratamento a 90°C. Shikata (1966), com auxílio da microscopia eletrônica, estudou as alterações que ocorriam na morfologia das partículas do TMV após as preparações do vírus terem sido submetidas a tratamentos térmicos. Verificou que as preparações tratadas a 90°C por 10 minutos apresentavam um precipitado formado por uma rede de partículas contidas numa massa amorfa. Não encontrou partículas no líquido sobrenadante. Mostrou, também, que em virtude da difícil solubilização do precipitado não foi possível estudar o comportamento serológico dos prováveis grupos de subunidades representados pela massa amorfa. Os estudos feitos com as frações C, P e G do VAP mostraram que o tratamento térmico atuou sobre as partículas de forma a induzir um rompimento gradativo em frações menores até atingir, provavelmente, o nível de subunidades protéicas. Os resultados dos testes serológicos de dupla difusão em ágar obtidos com o VAP podem ser interpretados como consequência da decomposição gradativa das partículas e, também, pela alta estabilidade dos grupamentos antigênicos.

Os resultados obtidos nos testes serológicos cruzados entre o VAP, estirpes do TRV e o PEBV que também pertence ao grupo, permitem dizer que o VAP apresenta re-

lações serológicas muito distantes com as estirpes TRV-E, TRV-H e TRV-HT (Quadro 5). Fazendo-se uma comparação desses resultados com aqueles obtidos por Harrison e Woods (1966) é perfeitamente possível considerar o VAP como pertencente a um Serotipo diferente dos demais vírus do grupo do TRV.

Maat (1965) obteve uma série de resultados negativos quando investigou as possibilidades de diagnosticar a presença do TRV no suco de plantas de fumo, com auxílio de testes serológicos de microprecipitina e de dupla difusão em ágar. Somente obteve resultados positivos quando submeteu o TRV, contido no suco, a uma certa concentração. Cremer (1965) em estudos feitos com um isolado do TRV, obtido a partir de Gladiolos sp., encontrou também dificuldades. Quando fazia testes serológicos de microprecipitina ou de dupla difusão em ágar, com suco de plantas de Gladiolos sp. infetadas com o TRV, obtinha sempre reações não específicas. Os testes serológicos feitos para diagnosticar a presença do VAP em suco de fôlhas de fumo, pimentão e tomate apresentaram também alguns problemas. As reações serológicas não específicas obtidas, com o VAP a partir de suco de fôlhas de pimentão e tomate infetadas, podem ter sido devidas à presença de substâncias inibidoras existentes no suco das plantas. As experiências mostraram que, quando o VAP, contido no suco, foi submetido a uma concentração, possibilitando a eliminação de grande parte de substâncias contidas no suco original, as reações não específicas desapareceram. Os resultados obtidos (Quadro 8) mostraram que a viabilidade de se conseguir um diagnóstico serológico rápido da presença do VAP no suco de plantas de fumo, pimentão e tomate está na dependência direta da concentração do vírus no suco e da eliminação das substâncias inibidoras das reações.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

O congelamento do suco de fôlhas de plantas de fumo infetadas pelo VAP, a aplicação de centrifugações diferenciais e dois gradientes de densidade de sacarose permitiram purificar o vírus e separar perfeitamente as partículas pequenas (55 mu) das partículas grandes (200 mu). Essa técnica apresentou resultados mais satisfatórios do que outras descritas na literatura.

Os testes de infetividade, feitos com as partículas separadas, mostraram que somente as partículas grandes (200 mu) são infetivas.

A separação das partículas permitiu o preparo de antissoros específicos. Os testes serológicos cruzados, os testes de absorção cruzada e as observações dos precipitados serológicos ao microscópio electrónico, constituem provas convincentes de que as partículas pequenas (55 mu) e partículas grandes (200 mu) do VAP são serologicamente idênticas.

Os tratamentos térmicos induziram sensíveis modificações na morfologia das partículas do VAP. Inicialmente houve uma fragmentação em partículas menores. Estas, em seguida, romperam-se em pequenos anéis e finalmente se transformaram numa massa amorfa constituída, provavelmente, de grupos de subunidades proteicas. Essas modificações puderam ser interpretadas, principalmente, pelos resultados obtidos nos testes serológicos de dupla difusão em ágar e pelas observações ao microscópio electrónico.

O VAP apresentou relações serológicas muito dis

1807

- 31 -

tantes quando comparado com alguns isolados do grupo do TRV. Com base nos resultados obtidos pode-se considerar o VAP como pertencente a um Serotipo diferente dos demais vírus do grupo do TRV.

O diagnóstico serológico da presença do VAP no suco (não tratado) de fôlhas de fumo, pimentão e tomate foi negativo. Quando, porém, o vírus contido no suco foi submetido a uma certa concentração e purificação os resultados foram sempre positivos.

oooo000ooco

7. SUMMARY

Juice from tobacco plants infected with VAP, stored at -20°C up to four months, thawed, centrifuged at alternate cycles of low and high speed plus two cycles of sucrose density gradient, permitted not only the purification, but also an almost perfect separation of the short and long particles (55 μ and 200 μ respectively). The results were better than those obtained with other purification techniques previously described.

Infectivity tests performed with separated particles indicate that only the long particles (200 μ) are infective.

The separation of the particles allowed the preparation of specific antisera. Cross serological tests, absorption tests and observations of the serological precipitates under the electron microscope have shown that short and long particles are serologically identical.

Heat treatment induced changes in the particle morphology. At first there was a fragmentation in small particles, followed immediately by a rupture of these in small rings and finally reaching the size of protein subunit groups. These modifications could be interpreted specially by serological double diffusion tests in agar and by the observations of the heat treated supernatants under the electron microscope.

The results of the cross serological tests between the VAP and several strains of the TRV-group have shown that the former presented only distant serological relationship with one strain of TRV from Scotland and with

also

two strains of TRV from Holland. It seems reasonable to consider the VAP as belonging to a completely different Serotype-group within the TRV-group.

Serological diagnosis of the VAP in crude sap preparations from tobacco, sweet pepper and tomato has not been possible yet. When the virus from the sap was partially concentrated the serological diagnosis became possible without any difficulty.

oooo000oooo

AKM
8. LITERATURA CITADA

BALL, ELLEN MOORHEAD - 1961 - Serological tests for the identification of plant viruses. Committee on Plant Virology - American Phytopath. Society.

BAWDEN, F.C. - 1943 - Plant viruses and virus diseases - (Chronica Botanica Co., Waltham, Mass., 294 pp.).

BEHRENS, J. - 1899 - Die Mauche (Mauke) des Tabaks. Landwirtsch. Vers. Stat. 52:422-447.

BERCKS, R. - 1963 - Untersuchungen über individuelle Unterschiede von Antiseren gegen Kartoffel-X-Virus bei Reaktionen mit verwandten Viren. Phytopath. Z. 47:301-313.

-----, -. - 1965 - Estudo das relações serológicas de parentesco entre alguns vírus de plantas. (Comunicação Verbal).

BIRKELAND, J.M. - 1934 - Serological studies of plant viruses. Bot. Gaz. 95:419-436.

BONING, K. - 1931 - Zur Ätiologie der Streifen und Kräuselkrankheit des Tabaks. Z. Parasitenkde. 3:103-141.

BOS, L. and J.P.H. van der WANT - 1962 - Early browning of pea a disease caused by a soil- and seed-borne virus. Tijdschr. Plziekten 68:368-390.

BRAKKE, M.K. - 1951 - Density gradient centrifugation: A new separation technique. J. Am. Chem. Soc. 73:1847.

JKM

- BRÄKKE, M.K. - 1960 - Density gradient centrifugation and its application to plant viruses. *Advan. Virus. Res.* 7:193-224.
- BRANDES, J. and C. WETTER - 1959 - Classification of elongated plant viruses on the basis of particle morphology. *Virology* 8:99-115.
- BRENNER, S. and R.W. HORNE - 1959 - A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochem. Biophys. Acta* 34:103-110.
- CADMAN, C.H. - 1959 - Potato stem-mottle disease in Scotland. *European Potato J.*, 2:165-175.
- , --- and B.D. HARRISON - 1959 - Studies on the properties of soil-borne viruses of the tobacco - rattle type occurring in Scotland. *Ann. Appl. Biol.* 47:542-556.
- CHESTER, K.S. - 1935 - Serological evidence in plant virus classification. *Phytopath.* 25:686-701.
- COSTA, A.S., E.W. KITAJIMA e A.R. OLIVEIRA - 1960 - Vírus do anel do pimentão: um integrante do grupo do "rattle" do fumo. (Dados não publicados).
- CREMER, M.C. - 1965 - Testes serológicos com um isolado do TRV a partir de Gladiolos sp. (Comunicação Verbal).
- FULTON, R.W. - 1959 - Purification of sour cherry necrotic ringspot and prune dwarf viruses. *Virology* 9:521.

207

- GRATIA, A. - 1933 a - Pluralité antigénique et identification sérologique des virus des plantes. Compt. rend. soc. biol. 114:923-924.
- , -. - 1933 b - Qualité antigénique des virus des plantes et des bactériophages. Compt. rend. soc. biol. 114:1382.
- HANSEN, H.P. - 1946 - Undersøgelser og Iagttagelser over Tabak viroser i Danmark. T. Planteavl. 50:191-298.
- HARRISON, B.D. and H.L. NIXON - 1959 - Separation and properties of particles of tobacco rattle virus with different lengths. J. Gen. Microbiol. 21:569-581.
- , ---. and R.D. WOODS - 1966 - Serotypes and particle dimensions of tobacco rattle viruses from Europe and America. Virology 28(4):610-620.
- KITAJIMA, E.W. - 1963 - Microscopia eletrônica do VAP. (Comunicação Verbal).
- MAAT, D.Z. - 1963 - Pea early-browning virus and tobacco rattle virus two different but serologically related viruses. Tijdschr. PlZiekten 69:287-293.
- , ---. - 1965 - Testes serológicos para diagnosticar a presença do TRV em plantas hospedeiras. (Comunicação Verbal).

JKM

MATSUMOTO, T. and K. SOMAZAWA - 1932 - Immunologic studies of mosaic disease. II. Distribution of antigenic substance of tobacco mosaic in different parts of host plants. Contr. Phytopath. Lab. Tai-koku Univ. (Formosa) 4:161-168.

-----, -. and ----- - 1933 - Immunologic studies of mosaic diseases. III. Further studies on the distribution of antigenic substance of tobacco mosaic in different parts of host plants. J. Soc. Trop. Agr. 5:37-43.

OLIVEIRA, A.R. e C. WETTER - 1963 - Estudos serológicos do vírus do anel do pimentão (VAP). (Dados não publicados).

OUCHTERLONY, O. - 1949 - Antigen-antibody reactions in gels. Ark. Kemi. Min. Geol. 26b, 14.

-----, -. - 1958 - Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. In Progress in Allergy. S. Karger, Basel, New York. 5:1-78.

-----, -. - 1962 - Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. In Progress in Allergy. S. Karger, Basel, New York. 6:30-154.

PAUL, H.L. and O. BODE - 1955 - Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Kartoffelviren. II. Vermessung der Teilchen von drei Stämmen des Rattle-Virus. Phytopathol. Z. 24:341-351.

PURDY, H.A. - 1928 - Immunologic reactions with tobacco mosaic virus. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 25:702-703.

JKM
PURDY, H.A. BEALE - 1931 - Specificity of the precipitin reaction in tobacco mosaic disease. Contr. Boyce Thompson Inst. Pl. Res. 3:529-539.

-----, - 1934 - The serum reactions as aid in the study of filtrable viruses of plants. Contr. Boyce Thompson Inst. Pl. Res. 6:407-435.

QUANJER, H.M. - 1943 - Bijdrage tot de kennis van de in Nederland voorkomende ziekten van tabak en van de tabaksteelt op kleingrond. Tijdschr. PlZiekten 49:37-51.

ROZENDAAL, A. - 1947 - Ziekten van het stengelbont-type bij aardappel. Tijdschr. PlZiekten 53:93-101.

-----, - en J.P.H. van der WANT - 1948 - Over de identiteit van het ratel-virus van de tabak en het stengelbont virus de aardappel. Tijdschr. PlZiekten 54:113-133.

SCHMELZER, K. - 1957 - Untersuchungen über den Wirtspflanzenkreis des Tabakmauche-Virus. Phytopathol. Z. 30:281-314.

SHIKATA, E. - 1966 - Electron microscopic studies on plant viruses. J. Fac. Agr. Hokkaido Univ. 55:1-110.

SILBERSCHMIDT, K. - 1932 - Studien zum Nachweis von Antikörpern in Pflanzen II. Beiträge Biol. Pfl. 20:105-178.

WALKINSHAW, C.H. and R.H. LARSON - 1959 - Corky ringspot of potato. Wisconsin Univ. Agr. Expt. Sta. Res. Bull. 217:1-31.

WANT, J.P.H. van der en A. ROZENDAAL - 1948 - Electronen microscopisch onderzoek van het virus, dat de Rattelziekte van de tabak en het stengelbont van aardappel veroorzaakt. Tijdschr. PlZiekten 54-134-141.

-----, - - - - - - 1952 - Some remarks on a soil-borne potato virus. Proc. Conf. Potato Virus Dis. Wageningen-Lisse (1951).

WETTER, C. - 1960 - Partielle Reinigung einiger gestreckter Pflanzenviren und ihre Verwendung als Antigene bei der Immunisierung mittels Freundschem Adjuvans. Arch. Mikrobiol. 37:278-292.

oooo000oooo