

FEIJOEIRO MANTEIGA, PLANTA-TESTE PARA OS VÍRUS DE VIRA-CABEÇA
E DA NECROSE BRANCA

A. S. Costa, Engenheiro-agrônomo
Seção de Virologia, Instituto Agronômico de Campinas

Tese de doutoramento apresentada à
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"
da Universidade de São Paulo

Campinas, Outubro de 1955

ERRATA

| <u>Localização do erro</u> | <u>Onde se lê</u> | <u>Leia-se</u> |
|--|--|--|
| Página 5, linha 8 | pedaços | pedaços |
| Página 5, linha 17 | totais. | totais (t-10%). |
| Página 15, Quadro 3 sob Vira-cabeça | 0,1-0,05-0,0125-0,0125 | 0,1-0,05-0,025-0,0125 |
| Página 23, Quadro 8 sob Vira-cabeça e Necrose branca | supe- infe- rior rior | infe- supe- rior rior |
| Página 28, linha 6 | indicado | indicando |

ASG

FEIJOEIRO MANTEIGA, PLANTA-TESTE PARA OS VÍRUS DE VIRA-CABEÇA

E DA NECROSE BRANCA

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1 - INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 - MATERIAIS E MÉTODOS | 2 |
| 3 - RESULTADOS | 6 |
| 3.1 - Suscetibilidade das variedades de feijoeiro aos dois vírus | 6 |
| 3.2 - Tipos de lesão local | 7 |
| 3.2.1 - <u>Vira-cabeça</u> | 7 |
| 3.2.2 - <u>Necrose branca</u> | 7 |
| 3.3 - Os vírus de vira-cabeça e da necrose branca em geral não se tornam sistêmicos nos feijoeiros inoculados mecanicamente | 8 |
| 3.4 - Influência dos tratamentos aplicados ao inóculo ou à planta-teste sobre o número de lesões locais | 9 |
| 3.4.1 - <u>Extração do inóculo em presença de vários diluentes</u> | 9 |
| 3.4.2 - <u>Influência do pH do bufer de fosfato</u> | 12 |
| 3.4.3 - <u>Concentração do bufer de fosfato</u> | 14 |
| 3.4.4 - <u>Concentração do sulfito de sódio</u> | 16 |
| 3.4.5 - <u>Desenvolvimento das fôlhas primárias na ocasião da inoculação</u> | 18 |
| 3.4.6 - <u>Condicionamento das plantas-teste sob luz reduzida</u> | 20 |
| 3.4.7 - <u>Comparação da inoculação feita nas faces inferior e superior das fôlhas</u> | 22 |
| 4 - DISCUSSÃO | 24 |
| 5 - RESUMO | 30 |
| 6 - LITERATURA CITADA | 32 |

ADK

FELJOEIRO MANTEIGA, PLANTA-TESTE PARA OS VÍRUS DE VIRA-CABEÇA

E DA NECROSE BRANCA DO FUMO

1 - INTRODUÇÃO

Os estudos com qualquer vírus de planta, transmissível mecânicamente, são grandemente facilitados quando se dispõe de planta-teste que forneça lesões locais adequadas para contagens. Tal planta permite comparações quantitativas entre diferentes preparações do vírus; a fácil determinação de muitas de suas propriedades físicas; o isolamento de estirpes a partir de lesões individuais; a separação do vírus de certas misturas; e, muitas vezes, a rápida identificação do vírus causador de uma moléstia.

Uma boa planta-teste para as finalidades acima mencionadas deve ser fácil de cultivar em vasos, nas estufas; deve atingir rapidamente o porte que deverá ter para ser usada, e, além disso, possuir folhas uniformes, comparáveis e bem suscetíveis ao vírus. As lesões formadas devem aparecer em poucos dias, ser bem visíveis, isoladas, sem muita tendência para coalescer.

Vira-cabeça (19,24)¹ e a necrose branca (14) são duas das mais importantes moléstias de vírus das plantas no Estado de São Paulo. Ambas têm vasto círculo de hospedeiras, incluindo muitas plantas econômicas e ervas más. O conhecimento do círculo de hospedeiras destas moléstias está sendo constantemente aumentado.

¹Os números entre-parênteses se referem à literatura citada.

Os estudos feitos com as duas moléstias acima mencionadas, no Instituto Agronômico de Campinas, sempre se ressentiram da falta de boa planta-teste fornecedora de lesões locais, embora várias das que têm sido mencionadas na literatura para vírus idênticos ou semelhantes, que ocorrem em outros países, já tenham sido usadas. Nicotiana glutinosa L. (26), N. paniculata L. (15) e Petunia hybrida Vilm. (26), formam lesões locais nas fôlhas inoculadas com o vírus de vira-cabeça (Lethum australiense H.); o guar (Cramopsis tetragonalobus (L.) Taub.) (20), o fumo Burley (Nicotiana tabacum L.) (18) formam lesões quando inoculados com o vírus do "tobacco streak" (Annulus orae H.). Tôdas essas plantas-teste têm sido experimentadas neste laboratório, mas nunca foram consideradas inteiramente satisfatórias.

Em estudos sôbre hospedeiras do vírus do "tobacco streak" no Canadá (5) foi verificado que plantas de feijoeiro (Phaseolus vulgaris var. humilis) desenvolviam lesões locais quando inoculadas com êsse vírus. Êsses resultados foram confirmados posteriormente nos Estados Unidos (20). Nenhum desses autores, entretanto, pareceu considerar o feijoeiro como planta-teste satisfatória para o vírus.

Estudos sôbre o círculo de hospedeiras de vira-cabeça e da necrose branca vêm sendo feitos em Campinas há muitos anos. Numerosas espécies pertencentes a várias famílias foram inoculadas mecânicamente com os vírus causadores destas moléstias. Nenhuma foi encontrada que se tenha mostrado boa planta-teste para lesões locais, embora Beta patellaris Jacq. (11) tenha sido usada com relativo êxito em estudos sôbre o vírus da necrose branca (12). Ês

W. A. J.

- 3 -

te vírus representa uma nova variedade do grupo do vírus do "tobaco streak" e receberá oportunamente o nome Annulus orae H. var. flo-rideformans (13). Mais recentemente, variedades de feijoeiros (Phaseolus vulgaris L.) foram experimentadas tendo sido verificado que algumas formavam lesões locais nas fôlhas primárias inoculadas com o vírus da necrose branca. A variedade Manteiga mostrou-se bastante suscetível ao vírus e constituiu surpresa satisfatória verificar-se que ela era também bastante suscetível ao vírus de vira-cabeça. Posteriormente uma coleção com mais de 200 variedades² de feijoeiro foi submetida à inoculação com os dois vírus. Sob o ponto de vista do porte e conformação das fôlhas outras variedades apresentaram vantagens sôbre a Manteiga, mas nenhuma se mostrou tão sensitiva aos dois vírus como esta. Desde então plantas da variedade Manteiga vem sendo usadas intensivamente em vários experimentos com êstes vírus, tendo se revelado extremamente úteis para trabalhos quantitativos. Algumas fases do trabalho com a variedade Manteiga como planta-teste para êsses dois vírus constituem o assunto desta tese.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

Os feijoeiros das variedades usadas nos experimentos foram cultivados em vasos de 15 cm diâmetro, permitindo-se que 3 a 4 plantas crescessem em cada vaso. Na maioria dos testes feitos com plantas da variedade Manteiga, compararam-se 2 ou 4 tratamentos, usando-se as quatro meias-fôlhas das duas fôlhas primárias das plan

² As variedades de feijoeiros utilizadas foram obtidas das Seções de Genética, de Leguminosas e de Olericultura do Instituto Agronômico de Campinas.

W. A. G.

tas. A comparação dos tratamentos nas meias-fôlhas foi feita em pares ou então quatro tratamentos foram comparados ao acaso nas quatro meias-fôlhas de cada planta. Na maioria dos ensaios de condicionamento sob luz reduzida compararam-se plantas tratadas com não tratadas.

O inóculo do vírus de vira-cabeça foi obtido sempre de plantas de fumo recém-infetadas que mostravam sintomas necróticos locais e sistêmicos. Aquêlo do vírus da necrose branca foi obtido na maioria dos casos de fôlhas novas de plantas de fumo infetadas, na fase de recuperação.

Em alguns ensaios apenas uma amostra do inóculo foi utilizada. Em outros, para os quais se necessitaram quatro amostras do mesmo inóculo, foram elas preparadas de uma das seguintes maneiras: 1) as fôlhas utilizadas foram cortadas em quatro partes aproximadamente iguais; cada uma das partes foi por sua vez cortada em quatro partes, e estas novamente subdivididas em quatro. Prepararam-se então quatro amostras compostas, misturando-se ao acaso cada uma das unidades finais de uma área com cada uma das unidades finais das outras; 2) pequenos discos de 1 cm de diâmetro foram tirados das fôlhas que forneceram o inóculo por meio de um furador de rôlhas, usando-se então para cada amostra o mesmo número de discos escolhidos ao acaso. A extração do inóculo foi sempre feita esmagando-se a amostra dos tecidos infetados num almofariz, em presença do diluente usado. Este foi em geral adicionado na proporção de 5:1 em pôso e consistiu, em muitos experimentos, numa mistura de bufer de fosfato a 0,05 M com pH 7 mais sulfito de sódio a 0,025 ou 0,0125 M. Depois de estarem os tecidos bem esmagados foram êlos espremidos em um pedaço do pano limpo, obtendo-se assim o líquido a ser utilizado como inóculo.

ASG

- 5 -

Os feijociros foram usados em inoculações com o vírus do vira-cabeça quando suas fôlhas primárias estavam com côrca de 2/3 da expansão total ou ligeiramente mais velhas. Para o vírus da necrose branca foram utilizadas plantas que tinham suas fôlhas primárias com 2/3 da expansão total ou ligeiramente mais novas.

Pó fino de carborundo (malha 400) foi sempre polvilhado sôbre as fôlhas a serem inoculadas. A fricção do inóculo nas fôlhas foi feita com pedaços de gaze de 2,5 x 2,5 cm, ou com o dedo indicador molhado no líquido.

A contagem das lesões foi feita assinalando-se estas com a ponta de um lápis no caso de pequeno número de lesões por fôlha. Quando as lesões eram muito numerosas fez-se uma estimativa do seu número.

A análise estatística³ da maioria dos experimentos foi feita determinando-se a variância dos grupos de dados relativos a cada tratamento e determinando-se os limites fiduciais para os totais. No ensaio em que se comparou o número de lesões produzidas nas facos superior e inferior das fôlhas fez-se a análise dos dados pareados.

Os experimentos com o vírus do vira-cabeça foram efetuados independentemente daqueles com o vírus da necrose branca. Os resultados de experimentos idênticos com os dois vírus foram, entretanto, incluídos nos mesmos quadros para maior facilidade de exame e discussão.

³ Queremos consignar nossos agradecimentos à Seção de Técnica Experimental do Instituto Agronômico, pela análise estatística dos experimentos.

ASG

3 - RESULTADOS

3.1 - Suscetibilidade das variedades do feijoeiros aos dois vírus

Mais de 200 variedades de feijoeiros foram ensaiadas quanto à sua suscetibilidade aos vírus de vira-cabeça e da necrose branca. A suscetibilidade (ou sensibilidade) das variedades quanto à formação de lesões locais foi bastante variável. Lesões locais características daquelas causadas pelo vírus de vira-cabeça foram observadas em 26 por cento das variedades do feijoeiro ensaiadas. Apenas 3 variedades se mostraram bastante sensíveis, sendo estas a Mantoiga, Chumbinho 63⁴ e Chumbinho 79.

De uma maneira geral as variedades do feijoeiro mostraram-se mais suscetíveis ao vírus da necrose branca do que ao vírus da vira-cabeça. Cerca de 52 por cento das variedades apresentaram lesões locais quando inoculadas com o vírus da necrose branca e destas 23 se mostraram bastante sensíveis. Foram as seguintes as mais sensíveis a este vírus: Mantoiga, Chumbinho 180-1-1, Roxinho 23, Roxinho 58, Roxinho 153, 956-Paroto Roy de los Negros, 1272-Bico de Ouro, 1373-SNS Brando, 1400-Chumbinho, 1408-Roxinho, 1418-Jalo, 1419-Paco, 1421-Rosinha, 1425-Paquinho Mineiro, 1427-Bico de Ouro, 1428-Mulatinho Lustroso, 1429-Mulatinho Claro, 1430-Mulatinho Rosado, 1431-Chumbinho, 1432-Mulatinho, 1435-Mulatinho, 1437-Mulatinho, 1468-Mantoiga.

A variedade Mantoiga se mostrou bastante sensível tanto ao vírus de vira-cabeça como ao vírus da necrose branca, mas o

⁴ Número das variedades e nomes, constantes do registro da Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas.

mesmo não se dou com outras variedades, não tendo havido correlação na suscetibilidade aos dois vírus.

3.2 - Tipos de lesão local

3.2.1 - Vira-caboça. As lesões locais causadas pelo vírus do vira-caboça nas folhas primárias do feijoeiro Mantoiga usualmente aparecem de 3 a 6 dias após a inoculação. São manchinhas cloróticas, pequenas a princípio, mas que vão aumentando em tamanho quando se tornam mais velhas (Est. 1-A, Est. 2-A). O tamanho das lesões varia entre 1 a 4 mm em diâmetro. Em alguns casos as lesões cloróticas podem ser circundadas por anel necrótico com ou sem pinta necrótica central.

3.2.2 - Necrose branca. De 1 a 4 dias após a inoculação aparecem as lesões locais nas folhas primárias do feijoeiro Mantoiga que foram friccionadas com o inóculo deste vírus. Primeiramente são lesões necróticas de coloração parda do tamanho de ponta de alfinete, mas depois crescem atingindo de 1 a 2 mm em diâmetro (Est. 1-B). As lesões são mais distintas se as folhas quando inoculadas não ultrapassam 2/3 de sua expansão total. Em folhas velhas a inoculação produz lesões menos definidas, que passam a ter a forma de anéis, manchas amarelas indefinidas ou outras formas. Foi também notado que a temperatura tem influência sobre a conformação das lesões causadas por este vírus no feijoeiro Mantoiga. No verão, quando a temperatura nas estufas era bastante elevada, as lesões eram mais da forma de anéis. (Est. 2-D). No inverno, ou durante períodos frios do ano, as lesões eram do tipo de ponta de alfinete.

AAW

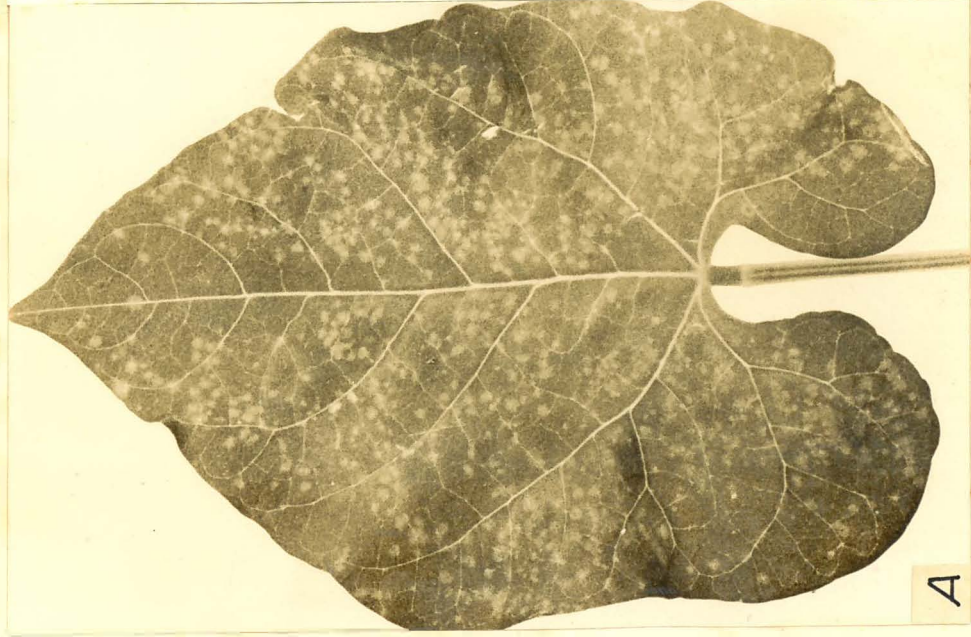
A maioria das estirpos comuns do vírus da necrose branca causou os sintomas descritos, mas encontraram-se outras que provocaram sintomas diferentes. Uma delas induz lesões na forma de anéis necróticos muito fracos. Outra estirpo causa apenas pintas cloróticas (Est. 2-B), em parte semelhantes às aquelas causadas pelo vírus do vira-cabeça.

As lesões locais formadas na maioria das outras variedades que se mostraram suscetíveis ao vírus apresentaram tendência para crescer mais e coalescer do que aquelas formadas em Manteiga. Dessa maneira deram origem a grandes áreas com necrose do tipo concêntrico ou provocaram a morte de áreas indefinidas das folhas.

3.3 - Os vírus do vira-cabeça e da necrose branca raramente se tornam sistêmicos nas plantas inoculadas mecanicamente

O vírus do vira-cabeça em nenhum caso se tornou sistêmico nos feijoeiros da variedade Manteiga inoculados mecanicamente, não obstante o número de lesões por folha ter sido de 500 ou até mais. Em nenhuma outra variedade também se tornou o vírus sistêmico quando inoculado mecanicamente. Note-se, entretanto, que esse vírus já foi recuperado de feijoeiros do campo, invadidos sistemicamente, o que provavelmente tinham sido infectados por meio do vetor (17).

Da mesma forma que o vírus do vira-cabeça, também as estirpos comuns do vírus da necrose branca não se tornam sistêmicas em plantas do feijoeiro Manteiga ou de outras variedades, inocu-



A

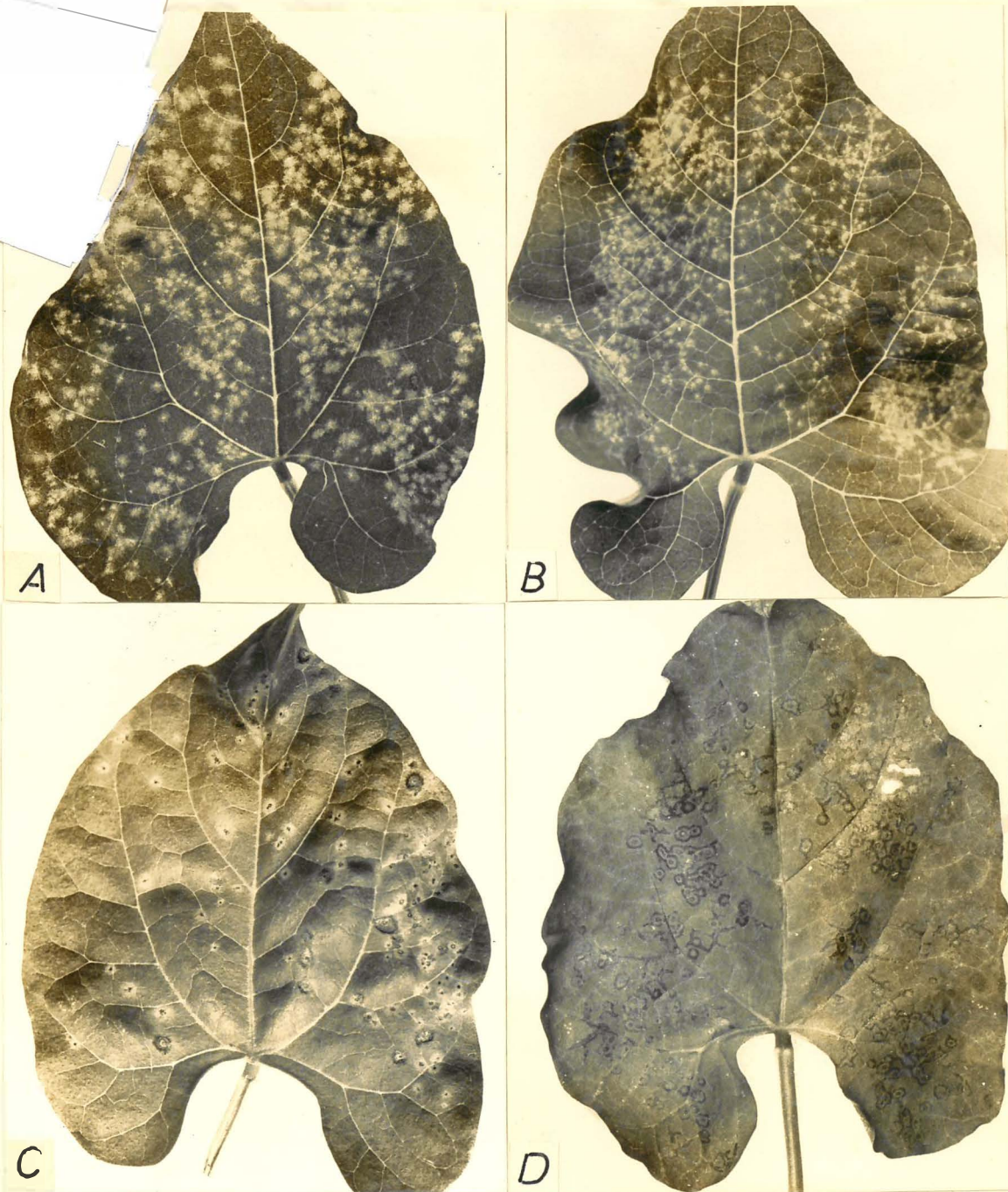


B

Lesões locais em folhas do feijociro Manteiga. A - Manchas cloróticas arro-
dondadas causadas pelo vírus de vira-cabeça 8 dias após inoculação;
B - Pontuações necróticas ou pequenos anéis causados pelo vírus da necrose
branca 6 dias após a inoculação.

Handwritten signature

MS 1



Tipos de losões locais em fôlhas primárias do feijoeiro.
A - Manchas cloróticas grandes causadas pelo vírus de vira-cabeça; B - Manchas cloróticas pequenas causadas por uma estirpe fraca do vírus da necrose branca; C - Pontuações necróticas com halo clorótico causadas pela mesma estirpe de vírus em Chumbinho; D - Necrose em anéis concêntricos causada pelo vírus da necrose branca.

AKM

ladas mecânicamente. Sabe-se, no entanto, que nos Estados Unidos há um vírus próximo ao da necrose branca que causa uma moléstia sistêmica do feijoeiro (29). Em São Paulo há um estirpe amarela do vírus da necrose branca, que se tornou sistêmica em plantas dessa variedade. Quando sistemicamente invadidos os feijoeiros mostraram necrose severa.

Mesmo as estirpes comuns do vírus da necrose branca podem, em certas ocasiões, causar necrose ao longo do pecíolo da folha e no ponto de inserção daquele na haste. Se a necrose for severa nesse ponto, pode ocasionar a morte daquela parte da planta situada acima da inserção do pecíolo na haste.

3.4 - Influência dos tratamentos aplicados ao inóculo ou à planta-teste sobre o número de lesões locais

3.4.1 - Extração do inóculo em presença de vários diluents

O efeito de diluents adicionados aos tecidos infetados na ocasião em que o inóculo é preparado foi comparado em uma série de ensaios. Usaram-se como diluents a água destilada, o buffer do fosfato a 0,1 M com pH 7, o sulfato de sódio a 0,01 M e uma mistura de buffer com sulfato de sódio. Os resultados de 6 ensaios com cada um dos dois vírus estão apresentados no quadro 1. Eles indicam que o inóculo do vírus do vira-caboça extraído em presença da água destilada causou em geral pequeno número de lesões. Extraído com sulfato de sódio a 0,01 M, causou maior número de lesões locais do que com água destilada, mas maior aumento foi obtido quando se usou como diluente o buffer do fosfato

ASG

- 10 -

a 0,1 M, com pH 7. A mistura de bufor com sulfito de sódio aumentou grandemente o número de lesões locais quando comparada com extração em água destilada, mas o aumento obtido pela interação dos dois diluentes foi em média ligeiramente menor do que aquele produzido só pelo bufor.

O vírus da necrose branca extraído em presença de água destilada unicamente não causou nenhuma lesão local nas folhas de feijoeiro Mantoiga. Quando inóculo comparável foi extraído com bufor de fosfato a 0,1 M de pH 7, algumas lesões foram obtidas. O inóculo extraído em presença do sulfito de sódio a 0,01 M causou grande número de lesões. A mistura bufor mais sulfito causou ainda maior número de lesões.

Agua

QUADRO 1. - Efeito de vários diluentes, adicionados na extração dos vírus de vira-cabeça e da necrose branca, sobre o número de lesões locais produzidas em folhas de feijoeiro Manteiga.

| Ensaio Nº | Lesões formadas em 12 meias-fôlhas das plantas-teste quando o inóculo foi extraído em presença dos diluentes abaixo indicados | | | | | | | |
|--------------|---|-------------------|-------------------------|---------------------|----------------|-------------------|-------------------------|---------------------|
| | Vira-cabeça | | | | Necrose branca | | | |
| | água destilada | buffer pH 7 0,1 M | sulfito de sódio 0,01 M | buffer mais sulfito | água destilada | buffer pH 7 0,1 M | sulfito de sódio 0,01 M | buffer mais sulfito |
| 1 | 6 ± 6,2 | 526 ± 172 | 8 ± 8,5 | 489 ± 173 | 0 | 228 ± 74 | 2300 ± 766 | 3950 ± 486 |
| 2 | 49 ± 18 | 2480 ± 344 | 1537 ± 526 | 2520 ± 518 | 0 | 56 ± 42 | 212 ± 133 | 3050 ± 449 |
| 3 | 11 ± 7,2 | 435 ± 87 | 44 ± 27 | 133 ± 48 | 0 | 0 | 410 ± 160 | 2350 ± 408 |
| 4 | 73 ± 37 | 2313 ± 521 | 418 ± 148 | 400 ± 80 | 0 | 6 ± 6,2 | 850 ± 314 | 1740 ± 536 |
| 5 | 52 ± 31 | 3300 ± 363 | 247 ± 149 | 1970 ± 457 | 0 | 37 ± 19 | 1270 ± 356 | 3950 ± 247 |
| 6 | 955 ± 404 | 3505 ± 1070 | 1879 ± 613 | 3832 ± 790 | 0 | 149 ± 56 | 1780 ± 310 | 3100 ± 416 |
| Média | 191,0 | 2091,5 | 688,8 | 1557,3 | 0 | 79,3 | 1220,3 | 3023,3 |

3.4.2 - Influência do pH do bufer de fosfato. O efeito do pH de vários sistemas de buffers sôbre os vírus de plantas tem sido estudado por vários autores (22, 27, 28). Best & Samuel (8) fizeram êstes estudos com o vírus do "tomato spotted wilt" na Australia, que é semelhante ao vírus de vira-cabeça que ocorre no Brasil.

Nos presentes ensaios estudou-se apenas a influência do pH do bufer de fosfato quando o inóculo foi extraído em presença dêste e inoculado logo após sem ajustamento posterior.

Os buffers foram preparados usando-se diferentes proporções de Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 (10) para se obter quatro níveis: pH 5,3, 6, 7 e 8. Amostras de fôlhas infetadas por vira-cabeça e pela necrose branca foram extraídas separadamente em presença dos buffers com os diferentes pH. A cada uma das preparações do vírus da necrose branca adicionou-se a mesma quantidade do sulfito de sódio para que a concentração dêste atingisse 0,0125 M. Com o vírus de vira-cabeça não se adicionou sulfito de sódio.

Com cada um dos vírus ensaiados fizeram-se quatro provas, em épocas diferentes. Os resultados destas estão apresentados no quadro 2. Ellos indicam que as preparações dos dois vírus obtidos por extração do inóculo em presença de bufer do pH 7 e 8 deram maior número de lesões do que quando extraídos com bufer do pH 5,3 e 6. Não houve diferença significativa entre os resultados obtidos com os buffers do pH 7 e 8.

QUADRO 2. - Efeito do pH do bufer de fosfato usado na extração do inóculo sobre o número de lesões locais produzidas em folhas de feijoeiro Manteiga

| Ensaio Nº | Lesões formadas em 12 meias-fôlhas das plantas-teste quando o inóculo foi extraído em presença de bufer de fosfato a 0,05 M com os pH indicados | | | | | | | |
|--------------|---|-------------|--------------|--------------|----------------|-------------|--------------|--------------|
| | Vira-cabeça | | | | Necrose branca | | | |
| | 5,3 | 6,0 | 7,0 | 8,0 | 5,3 | 6,0 | 7,0 | 8,0 |
| 1 | 155 + 47 | 143 + 40 | 1425 +614 | 1470 +343 | 195 + 56 | 397 +170 | 1850 +539 | 2020 +526 |
| 2 | 144 + 89 | 320 +253 | 3250 +337 | 3520 +338 | 750 +301 | 525 +183 | 3530 +248 | 1220 +247 |
| 3 | 428 + 65 | 556 +139 | 3220 +293 | 2210 +197 | 188 +100 | 111 + 46 | 990 +343 | 1060 +305 |
| 4 | 47 + 37 | 154 +117 | 1150 +264 | 1690 +291 | 660 +355 | 626 +498 | 3650 +247 | 3300 +281 |
| Média | 193,5 | 293,2 | 2261,2 | 2222,5 | 448,2 | 414,7 | 2505,0 | 1900,0 |

¹ Nos testes com o vírus da necrose branca foi adicionado sulfito de sódio a 0,0125 M aos vários bufers.

3.4.3 - Concentração do bufer de fosfato. O efeito comparativo de várias concentrações do bufer de fosfato (16, 22) o de soluções de fosfato de potássio (28) em relação ao número de lesões locais produzidas em plantas-teste já foi estudado por alguns autores para outros vírus.

Nos presentes ensaios procurou-se verificar qual o efeito de quatro concentrações molares do bufer de fosfato com pH 7, quando usadas para extração dos vírus do vira-cabeça e da necrose branca e inoculadas em folhas do feijoeiros Mantoiga. As concentrações ensaiadas foram as seguintes: 0,1, 0,05, 0,025 e 0,0125 M. Nos ensaios com o vírus da necrose branca adicionou-se sulfito de sódio às várias concentrações de bufer para atingir a concentração de 0,0125 M. Nos ensaios com o vírus de vira-cabeça não foi adicionado sulfito de sódio.

Os resultados de quatro ensaios com cada um dos dois vírus estão no quadro 3. Eles indicam que os efeitos das concentrações de bufer de fosfato entre os limites ensaiados não diferiram grandemente entre si. Há, entretanto, ligeira tendência para que as concentrações molares de 0,05 e 0,025 sejam ligeiramente melhores do que as outras. Esse efeito foi notado no caso de inoculações tanto do vírus de vira-cabeça como no da necrose branca.

O bufer de fosfato a 0,1 M pode causar danos às folhas, especialmente se elas não forem lavadas logo após a inoculação.

AS

QUADRO 3. - Efeito da concentração do bufer de fosfato usado na extração do inóculo sobre o número de lesões locais produzidas em folhas de feijoeiro Manteiga.

| Ensaio | Lesões formadas em 12 meias-fôlhas das plantas-teste quando o inóculo foi extraído em presença de bufer com pH 7,0 da concentração molar ¹ abaixo indicada | | | | | | | |
|--------|---|--------------|--------------|--------------|----------------|--------------|--------------|--------------|
| | Vira-cabeça | | | | Necrose branca | | | |
| | 0,1 | 0,05 | 0,0125 | 0,0125 | 0,1 | 0,05 | 0,025 | 0,0125 |
| 1 | 270 +109 | 264 + 77 | 409 + 82 | 44 + 17 | 3250 +362 | 2950 +449 | 2880 +514 | 2650 +362 |
| 2 | 279 +103 | 480 +138 | 404 + 92 | 203 +109 | 2900 +292 | 3400 +484 | 3800 +502 | 2650 +386 |
| 3 | 1115 +196 | 3270 +372 | 2970 +440 | 1390 +314 | 2530 +515 | 2700 +387 | 2710 +525 | 2480 +455 |
| 4 | 540 +181 | 1100 +238 | 1070 +267 | 435 +124 | 2060 +273 | 2700 +281 | 3250 +522 | 2580 +502 |
| Média | 551,0 | 1278,5 | 1213,2 | 518,0 | 2685,0 | 2937,5 | 3160,0 | 2590,0 |

¹ Nos ensaios com o vírus da necrose branca foi adicionado sulfato de sódio a 0,0125 M às várias concentrações do bufer.

3.4.4 - Concentração do sulfito de sódio. O efeito do sulfito de sódio a 0,01 M adicionado na extração do inóculo foi de muito maior importância para o vírus da necrose branca do que para o vírus de vira-caboça. Sem esse agente redutor as preparações do vírus da necrose branca não mostraram nenhuma atividade ou esta foi reduzidíssima. A extração do vírus de vira-caboça em presença de sulfito de sódio também resultou em maior atividade quando medida pelo número de lesões locais produzidas pela preparação.

Em virtude do efeito favorável do sulfito de sódio a 0,01 M sobre a atividade das preparações dos dois vírus em estudo, efetuaram-se alguns ensaios para verificar a influência relativa de diferentes concentrações deste agente redutor.

Cinco ensaios foram feitos com cada um dos vírus, estudando-se o efeito de 4 concentrações molares de sulfito de sódio: 0,1, 0,05, 0,025 e 0,0125. Estas soluções de sulfito foram feitas com buffer de fosfato a 0,05 M com pH 7.

Os resultados dos ensaios efetuados estão reproduzidos no quadro 4. Eles mostram que as concentrações mais favoráveis foram as mais baixas, 0,025 e 0,0125 M, não tendo havido diferença significativa entre elas. Estas duas concentrações foram, entretanto, significativamente melhores do que as duas concentrações mais fortes. Entre estas duas também não houve diferença significativa.

Concentrações fortes de sulfito de sódio podem também danificar as folhas inoculadas, principalmente se elas não foram lavadas imediatamente após a inoculação.

ACM

QUADRO 4. - Efeito de várias concentrações de sulfito de sódio em bufer de fosfato a 0,05 M com pH 7, usado na extração do inóculo dos vírus de vira-cabeça e da necrose branca, sôbre o número de lesões locais produzidas em fôlhas de feijoeiro manteiga

| Ensaio Nº | Número de lesões obtidas em 12 meias-fôlhas quando o inóculo foi extraído em presença de bufer, mais sulfito de sódio nas concentrações molares indicadas. | | | | | | | |
|--------------|--|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| | Vira-cabeça | | | | Necrose branca | | | |
| | 0,1 | 0,05 | 0,025 | 0,0125 | 0,1 | 0,05 | 0,025 | 0,0125 |
| 1 | 267 ± 64 | 1201 ± 247 | 1864 ± 233 | 2539 ± 640 | 585 ± 274 | 1850 ± 247 | 2900 ± 320 | 3150 ± 378 |
| 2 | 48 ± 23 | 200 ± 81 | 258 ± 100 | 337 ± 134 | 890 ± 310 | 2380 ± 421 | 2730 ± 290 | 2600 ± 359 |
| 3 | 43 ± 24 | 263 ± 123 | 628 ± 206 | 780 ± 243 | 1055 ± 502 | 1150 ± 439 | 2100 ± 539 | 1670 ± 480 |
| 4 | 546 ± 272 | 601 ± 270 | 1424 ± | 1761 ± 705 | 1162 ± 299 | 2011 ± 437 | 2977 ± 440 | 3404 ± 926 |
| 5 | 365 ± 123 | 1160 ± 281 | 1381 ± 339 | 1325 ± 250 | 1433 ± 343 | 3334 ± 442 | 3369 ± 609 | 4801 ± 384 |
| Média | 253,8 | 685,0 | 1111,0 | 1348,4 | 1025,0 | 2145,0 | 2815,2 | 3125,0 |

AACT

3.4.5 - Influência do desenvolvimento das folhas primárias na ocasião da inoculação. A finalidade destes ensaios foi verificar a influência do desenvolvimento das folhas primárias do feijoeiro Mantoiga sobre a sua sensibilidade aos vírus do vira-caboça e da necrose branca.

Os feijoeiros usados foram plantados em seis dias consecutivos. Nove dias após o último plantio, quando as folhas primárias das plantas mais novas tinham cerca de $1/3$ de sua expansão total, foram todas inoculadas com a mesma preparação. Nessa ocasião as plantas das séries mais velhas já tinham folhas primárias completamente desenvolvidas. Os resultados dos ensaios estão no quadro 5. Eles mostram que no caso do vírus do vira-caboça as folhas mais velhas apresentaram tendência para desenvolver maior número de lesões do que as mais novas. Para este vírus as folhas primárias com $2/3$ de sua expansão total ou pouco mais velhas foram mais sensíveis. Resultados de outros ensaios, entretanto, têm indicado que as folhas primárias das plantas-teste não devem ser demasiadamente velhas, porque então diminui grandemente sua suscetibilidade.

Dentro dos limites de idade utilizados, não houve grande diferença no número de lesões locais formadas nas plantas dos seis grupos inoculados com o vírus da necrose branca. Houvo, entretanto, tendência para que as folhas mais novas fossem mais sensíveis. Foi notado em muitos ensaios que as folhas primárias com $2/3$ de sua expansão total ou ligeiramente mais novas, davam melhores resultados, sendo as lesões mais distintas e fáceis de contar.

ACM

QUADRO 5. - Efeito da idade da planta sobre o número de lesões locais produzidas pelos vírus de vira-cabeça e da necrose branca em fôlhas de feijoeiro Manteiga

| Idade da planta - teste em dias | Lesões obtidas em 36 meias-fôlhas quando o vírus foi inoculado em plantas com a idade indicada, em três ensaios | | | | | | | |
|---------------------------------|---|-----------------|----------------|--------|----------------|---------------|---------------|--------|
| | Vira-cabeça | | | | Necrose branca | | | |
| | 1 | 2 | 3 | Média | 1 | 2 | 3 | Média |
| 14 | 7320 ± 1159 | 8650 ± 983 | 238 ± 70 | 5402,7 | 2287 ± 754 | 695 ± 196 | 138 ± 48 | 1040,0 |
| 13 | 2975 ± 635 | 10500 ± 1209 | 4171 ± 866 | 5882,0 | 1912 ± 402 | 1080 ± 252 | 1956 ± 448 | 1649,3 |
| 12 | 3600 ± 697 | 11100 ± 762 | 3094 ± 1056 | 5931,3 | 1577 ± 484 | 1665 ± 276 | 3761 ± 636 | 2334,3 |
| 11 | 1071 ± 224 | 5140 ± 820 | 4209 ± 968 | 3473,3 | 1853 ± 531 | 2690 ± 397 | 3561 ± 521 | 2701,3 |
| 10 | 797 ± 145 | 5275 ± 665 | 1972 ± 470 | 2681,3 | 2685 ± 588 | 2710 ± 453 | 1878 ± 361 | 2424,3 |
| 9 | 955 ± 227 | 1676 ± 437 | 1735 ± 595 | 1455,3 | 2715 ± 712 | 1705 ± 226 | 1972 ± 616 | 2130,7 |

3.4.6 - Condicionamento das plantas-teste sob luz reduzi-
da. A influência do pré-condicionamento das plantas-teste em
luz reduzida, sobre o número de lesões locais obtidas pela ino-
culação dos vírus do vira-caboça e da necrose branca, foi estuda-
da nestes ensaios. O pré-condicionamento foi feito sob bancas
em estufas, onde a luminosidade era muito reduzida. As plan-
tas testemunhas permaneceram sobre as bancas, na estufa. Após
a inoculação todas as plantas foram colocadas na estufa. Os
resultados dos ensaios estão no quadro 6.

No caso do vírus de vira-caboça o aumento da sensibilidade
de das folhas primárias do feijoeiro Mantoiga foi maior. O nú-
mero de lesões obtido em plantas pré-condicionadas foi duas a
três vezes maior do que aquele nos controles. No caso do ví-
rus da necrose branca houve aumento no número de lesões nas fô-
lhas submetidas ao pré-condicionamento em alguns ensaios, mas
de uma maneira geral as diferenças foram menores.

Em outro experimento, em lugar de submeter as plantas in-
teiras ao pré-condicionamento, cobriram-se com saquinhos do pa-
pel preto apenas uma das folhas primárias de cada planta, por-
manecendo a outra folha exposta à luz, como controle. Tais
plantas foram conservadas em estufas e então inoculadas após 24
a 48 horas. Os resultados estão no quadro 7. Eles indicam
que tanto no caso do vira-caboça como no da necrose branca hou-
ve um aumento no número de lesões devido ao condicionamento por
48 horas. O condicionamento por 24 horas não teve efeito pa-
ra o vírus de vira-caboça, mas promoveu um aumento no caso do
vírus da necrose branca. Notou-se que as folhas primárias co-
bertas com saco preto ficaram menores do que as folhas opostas
(controle)

QUADRO 6. - Efeito do condicionamento das plantas-teste sob luz reduzida, antes da inoculação, sobre o número de lesões locais formadas nas folhas primárias do feijoeiro Manteiga

| Ensaio Nº | Número de lesões locais formadas em 36 meias-fôlhas das plantas inoculadas e submetidas ao tratamento indicado | | | | | |
|--------------|--|-------------------|---|----------------|-------------------|---|
| | Vira-cabeça | | | Necrose branca | | |
| | con- trôle | luz re- duzida | aumento de- vido ao con- dicionamento | con- trôle | luz re- duzida | aumento do- vido ao con- dicionamento |
| 1 | 3775 | 9400 | 5625** | 4330 | 4850 | 520 |
| 2 | 4255 | 10025 | 5770** | 6070 | 5700 | - 370 |
| 3 | 2695 | 2980 | 285 | 4580 | 5345 | 765 |
| 4 | 4514 | 8680 | 4166** | 4020 | 6130 | 2110** |
| 5 | 2491 | 9090 | 6599** | 3260 | 5680 | 2420** |
| Média | 3546,0 | 8035,0 | | 4452,0 | 5541,0 | |

QUADRO 7. - Efeito do condicionamento das folhas primárias do feijoeiro Manteiga com papel preto sobre o número de lesões locais produzidas pelos vírus do vira-cabeça e da necrose branca

| Duração do trata- mento | Número de lesões formadas em 12 meias-fôlhas das plantas inoculadas e submetidas ao tratamento indicado | | | | | |
|----------------------------------|---|-------------------|---|----------------|-------------------|---|
| | Vira-cabeça | | | Necrose branca | | |
| | con- trôle | luz re- duzida | aumento de- vido ao con- dicionamento | con- trôle | luz re- duzida | aumento de- vido ao con- dicionamento |
| 24 | 1838 | 1814 | - 24 | 1585 | 2285 | 673 |
| 48 | 2452 | 3242 | 790 | 1717 | 2769 | 1052* |



3.4.7 - Comparação da inoculação feita nas faces inferior e superior da fôlha. As duas faces de uma fôlha podem diferir em sua suscetibilidade a determinados vírus, produzindo número de lesões locais diferentes quando a inoculação é feita mecanicamente. Essa diferença entre as duas faces pode resultar de variações de suscetibilidade dos tecidos propriamente ditos ou do efeito sobre a suscetibilidade do ambiente diferente a que estão sujeitas. A diferença em suscetibilidade quando medida pelo número de lesões locais produzidas poderia ainda resultar da maior ou menor facilidade com que ambos os lados da fôlha podem ser inoculados.

Quatro ensaios foram feitos com a finalidade de se verificar no caso do feijoeiro Mantoiga se havia diferença na suscetibilidade aos vírus do vira-cabeça e da necrose branca entre as duas faces da fôlha. A inoculação da face superior da fôlha foi feita da maneira usual, apenas na metade direita desta, após ter sido polvilhada com carborundo; em seguida à inoculação de cada moia-fôlha na sua face superior, torceu-se a fôlha do modo que a moia-fôlha da esquerda ficasse do lado direito com a face inferior voltada para cima. Essa metade foi então polvilhada com carborundo e inoculada. Os resultados de 4 ensaios com cada um dos dois vírus estão no quadro 8. As inoculações feitas na face superior deram maior número de lesões do que quando feitas na face inferior. Estes resultados foram semelhantes para os dois vírus.

AS

QUADRO 8. - Comparação entre o número de lesões formadas quando os vírus de vira-cabeça e da necrose branca foram inoculados na face inferior e superior de folhas de feijoeiro Manteiga

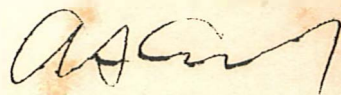
| Ensaio Nº | Número de lesões obtidas em 36 meias-fôlhas quando o vírus foi inoculado na face indicada da fôlha | | | | | |
|--------------|--|----------|-----------|----------------|----------|-----------|
| | Vira-cabeça | | Diferença | Necrose branca | | Diferença |
| | superior | inferior | | superior | inferior | |
| 1 | 278 | 725 | 447** | 2600 | 4250 | 1650** |
| 2 | 1880 | 4650 | 2770** | 2110 | 4050 | 1940** |
| 3 | 2295 | 7100 | 4805** | 2435 | 6725 | 4290** |
| 4 | 2800 | 9100 | 6300** | 3190 | 8500 | 5310** |
| Média | 1813,3 | 5393,7 | | 2583,8 | 5881,2 | |

4 - DISCUSSÃO.

As variedades do feijoeiro ensaiadas mostraram vários graus de suscetibilidade aos vírus de vira-cabeça e da necrose branca. Entre mais de 200 variedades provadas, maior número se mostrou suscetível ao vírus da necrose branca do que ao do vira-cabeça, não tendo havido correlação entre a suscetibilidade aos dois vírus. A variedade Manteiga, entretanto, mostrou-se altamente suscetível a ambos.

Variedades de feijoeiro suscetíveis ao vírus da necrose branca mostram diferenças no número de lesões formadas por área e na maneira de crescimento destas. A variedade Manteiga desenvolve grande número de lesões, mas elas permanecem pequenas, ao passo que em muitas outras variedades que formam menor número de lesões por área, o crescimento destas é mais rápido. Além das diferenças na conformação das lesões entre diferentes variedades de feijoeiro, foi notado que estirpes diferentes do vírus induzem o aparecimento de lesões de conformação diferente. Estudos de variedades de feijoeiro como hospedeiras diferenciais para os tipos do vírus da necrose branca estão sendo feitos.

Houve também certa diferença entre os sintomas formados nas diferentes variedades de feijoeiro quando inoculadas com o vírus de vira-cabeça. Estas não foram, entretanto, da mesma magnitude como no caso do vírus da necrose branca, mas poderão eventualmente servir para diferenciação de estirpes do vírus. As diferenças neste caso consistiram principalmente na formação de lesões apenas cloróticas e na formação de lesões com tendência para necrose.



É interessante mencionar que a variedade Manteiga, que é bastante suscetível aos vírus do vira-cabeça e da necrose branca, não apresenta lesões locais quando inoculada com o vírus do mosaico comum do fumo (Marmor tabaci H.), sendo imune a êste (25). Esta observação foi confirmada neste laboratório e parece indicar que os fatores responsáveis pela suscetibilidade a essas duas moléstias são também diferentes daqueles responsáveis pela suscetibilidade ao mosaico comum do fumo. A imunidade da variedade Manteiga ao vírus do mosaico comum do fumo permite o seu uso como planta-filtro para separar o vírus do vira-cabeça e o da necrose branca das misturas com o vírus do mosaico comum do fumo. Esses resultados já foram obtidos neste laboratório com misturas naturais do vírus do vira-cabeça e do mosaico comum, e com uma mistura feita em laboratório do vírus da necrose branca e do mosaico comum.

Está claro que a inoculação destes dois vírus em feijoeiros da variedade Manteiga poderia ser utilizada para separá-los também de outros vírus que não infetam o feijoeiro, sendo êsse fato de bastante interesse visto se tratar do vírus de propriedades fracas e, portanto, difíceis de serem separados das misturas com outros vírus que têm maior resistência.

O fato de muitas variedades do feijoeiro se mostrarem imunes ao vírus do vira-cabeça e da necrose branca, bem como ao vírus do mosaico comum do fumo (25), mostra bem a necessidade de se inocularem muitas variedades de uma mesma espécie, nos estudos do círculo de hospedeiras dos diferentes vírus. Caso apenas uma ou outra variedade seja ensaiada, como é feito na

ASCA

maioria dos casos, corre-se o risco de se obter conceito errôneo sobre a suscetibilidade da espécie, se coincidir que a variedade ensaiada tenha sido uma imuno.

Plantas do feijoeiro são capazes de permitir a multiplicação de numerosos vírus pertencentes a grupos não relacionados. O conjunto de variedades desta espécie constitui, portanto, verdadeiro reservatório onde se pode esperar encontrar variedades que produzam lesões locais quando inoculadas com grande número dos vírus transmissíveis mecanicamente. O fato de certas espécies, como o feijoeiro, permitirem a multiplicação de grande número de vírus, sugere que elas possuem grande parte dos precursores necessários para a multiplicação de tais vírus ou que seus sistemas genéticos controladores da síntese de proteínas se submetem facilmente à interferência dos vírus que penetram em suas células e que passam a controlar parte do sistema, dirigindo-se na síntese de proteína vírus. É, pois, de interesse que nos estudos de vírus transmissíveis mecanicamente seja sempre experimentada uma coleção representativa de variedades de feijoeiros, pois há bastante possibilidade que alguma destas possa servir como planta-teste para lesão local.

Há certa diferença de opinião entre os investigadores sobre o efeito de substâncias adicionadas às preparações de vírus que inibem ou estimulam a atividade deste quando esta é medida pelo número de lesões locais que a preparação causou (27, 28). Alguns alegam que o efeito é sobre o vírus, mas a maior parte acredita que o efeito é sobre a planta hospedeira. Nos experimentos aqui relatados a extração do inóculo em presença

de vários diluentes indicou que a ação pode ser sobre a planta-teste ou sobre a preparação do vírus. O efeito sobre a preparação pode ser também indireto em relação ao vírus, isto é, preservando sua atividade que poderia ser diminuída por substâncias liberadas ou formadas durante a extração do inóculo.

Quando o inóculo da necrose branca foi extraído em presença de água, nenhuma atividade pôde ser constatada por inoculação em folhas do feijoeiro manteiga. Esse fato provavelmente resultou da inativação do vírus na preparação, devido à oxidação, como já tinha sido demonstrado (21). A extração deste vírus em presença de sulfito de sódio fez com que as preparações causassem numerosas lesões locais, isso indicando que esse agente redutor preservou a atividade do vírus na preparação. O bufer sòzinho não aumentou grandemente a atividade das preparações do vírus da necrose branca, isto porque o bufer não evitou a perda de atividade por oxidação, embora possa ter melhorado a sensibilidade da planta. Quando a mistura de sulfito de sódio e bufer foi usada, o número de lesões foi maior do que aquele obtido com o sulfito sòzinho, isso indicando que o sulfito de sódio preservou a atividade do vírus e a presença do bufer na preparação melhorou a sensibilidade da planta-teste.

O vírus de vira-cabeça também é sensível à oxidação durante a extração e armazenamento in vitro, como já foi demonstrado em uma série de trabalhos por pesquisadores da Austrália (1,7,9,23). Nas presentes experiências houve aumento

17/11/57

no número de lesões locais obtidas com preparações do vírus do vira-cabeça extraídas em presença do sulfito de sódio, quando esse número foi comparado com o de preparações extraídas em presença de água. O aumento obtido com esse agente redutor foi, entretanto, menor do que no caso do vírus da necrose branca, isso indicado que o vírus do vira-cabeça não foi tão sensível à oxidação como o da necrose branca. O inóculo extraído em presença do bufer apresentou aumento elevado no número de lesões, mostrando que a sensibilidade da planta foi bastante melhorada. Quando o sulfito de sódio e o bufer foram misturados, o número de lesões obtido foi menor do que aquele obtido com bufer sozinho. Esse fato não está bem explicado, mas pode indicar que a adição de sulfito ao bufer, embora possa ter reduzido a perda de atividade devido à oxidação, diminuiu bastante a eficiência do bufer em aumentar a sensibilidade da planta-teste.

Nas presentes experiências e em outras realizadas com combinações de vírus e plantas-teste diferentes, tem sido notado pelo autor que o efeito do bufer do fosfato é mais importante sobretudo quando a planta-teste é leguminosa (Phaseolus, Vigna, Dolichos, etc.). O uso de sulfito de sódio a 0,02-0,01 M em bufer do fosfato a 0,05-0,01 M com pH 7 é hoje operação de rotina neste laboratório, sendo empregado na extração de todo inóculo. Desde que a adição desse diluente passou a ser rotina, foi notada grande melhoria nos ensaios de transmissão. A fim de facilitar a preparação diária da solução de sulfito, posam-se papéisinhos com a quantidade de sulfito necessária para obter a concentração desejada, assim como se faz nas farmácias. Na hora de preparar o diluente, mistura-se primeiramente o bufer a partir de soluções estoques de Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 e depois se dissolve neste a quantidade de sulfito de um papolzinho.

As inoculações efetuadas na face superior da fôlha do feijoeiro Manteiga deram maior número de lesões do que quando feitas na face inferior. Esse resultado é diferente daquele obtido com o vírus causador do amarelo (Coriwm betae H.) da beterraba (Beta vulgaris L.), que causou maior número de lesões locais quando inoculado na face inferior da fôlha (16). Desconhece-se, no caso de feijoeiros Manteiga inoculados com os dois vírus, se o menor número de lesões obtido na face inferior da fôlha indica menor suscetibilidade dos tecidos dessa região ou se resulta do fato de ser mais difícil de nela se aplicar o inóculo uniformemente, devido a serem as nervuras salientes nessa face da fôlha.

O condicionamento das plantas-teste no escuro por um período de 48 horas precedendo a inoculação aumentou bastante a suscetibilidade das fôlhas do feijoeiro Manteiga quando inoculadas com o vírus de vira-cabeça. Fato semelhante já tinha sido verificado para plantas de fumo inoculadas com o vírus do "tomato spotted wilt" (1) e para outras plantas-teste inoculadas com outros vírus (2,3). No caso do vírus da necrose branca houve pequeno aumento no número de lesões devido ao condicionamento no escuro em alguns ensaios, efeito mais significativo em outros e ligeira diminuição em 1. Os resultados de uma maneira geral foram menos significantes do que para o vírus de vira-cabeça. Para os trabalhos quantitativos com os vírus de vira-cabeça e da necrose branca, usando-se o feijoeiro Manteiga, não é necessário condicionar as plantas-teste sob luz reduzida antes da inoculação, pois plantas desta variedade são bastante sensíveis com esse tratamento.

5 - RESUMO

Entre côrca de 200 variedades de feijoeiro onsaídas, a Manteiga foi mais sensitiva aos vírus de vira-cabeça e da necrose branca, formando, nas fôlhas primárias, lesões locais adequadas para contagens. Com o vírus de vira-cabeça as lesões locais apareceram de 3 a 6 dias após as inoculações sob a forma de manchas cloróticas, às vêzes com anéis necróticos; com o vírus da necrose branca as lesões se manifestaram em 1 a 4 dias sob a forma de pontuações necróticas, pequenos anéis necróticos ou, em caso de certas estirpes do vírus, como pintas cloróticas.

Feijoeiros com as fôlhas primárias tendo $\frac{2}{3}$ de sua expansão ou mais desenvolvidas deram melhores resultados para o vírus de vira-cabeça; para o vírus da necrose branca os melhores resultados foram obtidos com fôlhas que tinham $\frac{2}{3}$ ou ligeiramento menos de sua expansão total.

O vírus de vira-cabeça não se tornou sistêmico em plantas inoculadas mecânicamente. A maioria das estirpes do vírus da necrose branca também não se tornou sistêmica em feijoeiros inoculados mecânicamente. Uma estirpe amarela dêste tem a capacidade de se tornar sistêmica em feijoeiros sob determinadas condições.

O sulfito de sódio a 0,025 ou 0,0125 M, usado na extração do inóculo, aumentou ligeiramente o número de lesões formadas nas fôlhas do feijoeiro Manteiga pelo vírus de vira-cabeça; aumento consideravelmente maior foi obtido com a extração em presença de bufer de fosfato a 0,05 ou 0,025 M com pH 7 ou 8,

Almeida

sendo êsse efeito atribuído a um aumento da sensibilidade da planta-teste. A mistura de ambos causou aumento igual ou ligeiramente menor que o bufer só.

Para o vírus da necrose branca a presença de sulfito de sódio a 0,025 ou 0,0125 M durante a extração aumentou consideravelmente o número de lesões, sendo êsse efeito atribuído à diminuição na perda de atividade do vírus devida à oxidação; o bufer sózinho ocasionou pequeno aumento em comparação com a testemunha, mas a mistura de bufer e sulfito de sódio deu o maior aumento.

O bufer de fosfato de pH 7 ou 8, adicionado antes da extração do inóculo, ocasionou maior número de lesões do que o bufer de pH 5,3 ou 6. Concentrações do bufer de 0,1, 0,05, 0,025 e 0,0125 M não causaram grandes diferenças no número de lesões locais, mas as melhores parecem ser 0,05 e 0,025 M.

De quatro concentrações de sulfito de sódio ensaiadas, 0,1, 0,05, 0,025 e 0,0125 M, as duas mais fracas deram os maiores números de lesões nas plantas inoculadas tanto com o vírus de vira-cabeça como com o vírus da necrose branca.

Feijoeiros da variedade Manteiga mantidos por 48 ^{horas} sob luz reduzida deram maior número de lesões locais quando inoculados com o vírus de vira-cabeça do que plantas testemunhas que receberam iluminação normal. O aumento no número de lesões devido ao condicionamento sob luz reduzida foi menor no caso do vírus da necrose branca.

As inoculações feitas na face superior das fôlhas ocasionaram maior número de lesões do que quando feitas na face inferior, no caso dos dois vírus.

LITERATURA CITADA

1. Bald, J. G. & Samuel, G. Some factors affecting the inactivation rate of the virus of tomato spotted wilt. Ann. appl. Biol. 21:179-190. 1934.
2. Bawden, F. C. & Roberts, F. M. The influence of light intensity on the susceptibility of plants of certain viruses. Ann. appl. Biol. 34:286-295. 1947.
3. ~~-----~~ & ~~-----~~ Photosynthesis and predisposition of plants to infection with certain viruses. Ann. appl. Biol. 35:418-428. 1948.
4. Beraha, Louis, Varzende, Massoud, and Thornberry, H. H. Mechanism of the action of abrasives on infection by tobacco mosaic virus. Virology 1:141-151. 1955.
5. Berkeley, G. H. & Phillips, J. H. H. Tobacco streak. Canad. J. Res. C. 21:181-190. 1943.
6. Best, R. J. The relationship between the activity of tobacco mosaic virus suspension and hydrion concentration over the pH range 5 to 10. Austral. J. Biol. 14:323-328. 1936.
7. ~~-----~~ The preservative effect of some reducing systems on the virus of tomato spotted wilt. Austral. J. exp. Biol. 27:1-17. 1939.
8. ~~-----~~ & Samuel, G. The reaction of the viruses of tomato spotted wilt and tobacco mosaic to the pH value of media containing them. Ann. appl. Biol. 23:509-537. 1936.
9. ~~-----~~ & ~~-----~~ The effect of various chemical treatments on the activity of the viruses of tomato spotted wilt and tobacco mosaic. Ann. appl. Biol. 23:759-780. 1936.

10. Clark, W. M. The determination of hydrogen ions. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1928.
11. Costa, A. S. Beta patellaris, planta-teste para o vírus da necrose branca do fumo. Bragantia 10:275-276. 1950.
12. ----- The concentration of the Brazilian tobacco streak virus in infected plants. Phytopathology 42:231-236. 1952.
13. ----- Studies on the Brazilian tobacco streak virus. (em preparo)
14. -----, Lima, A. R. & Forster, R. Necrose branca, uma moléstia de vírus do fumo (Nicotiana tabacum L.) e "fumo couve" como sintoma tardio. J. Agron., Piracicaba 3:1-26. 1940.
15. ----- & Forster, R. Lista de hospedeiras de vira-cabeça. Bragantia 3:347-366. 1943.
16. ----- & Bennett, C. W. Studies on mechanical transmission of virus yellows. Phytopathology 45:233-238. 1955.
17. ----- & Pinto, A. J. D'Andréa. Vira-cabeça em feijoeiro. (em preparo)
18. Diachun, Stephen & Valteau, W. D. Nicotiana rustica as a source of tobacco streak virus. Phytopathology 40:128-134. 1950.
19. Forster, R. & Costa, A. S. Nota preliminar sobre a moléstia vira-cabeça do fumo. Rev. Agr., Piracicaba 13:1-12. 1938.
20. Fulton, R. W. Hosts of the tobacco streak virus. Phytopathology 38:421-428. 1948.
21. ----- Virus concentration in plants acquiring tolerance to tobacco streak. Phytopathology 39:231-243. 1949.