

**PURIFICAÇÃO E PROPRIEDADES BIO-FÍSICO-QUÍMICAS DO  
VÍRUS DO MOSÁICO DOURADO DO TOMATEIRO E UMA  
DE SUAS ESTIRPES, DO MOSÁICO DOURADO DO  
FEIJOEIRO E DO MOSÁICO DA EUFORBIA**

**JOSÉ CARLOS MATYIS**

Engenheiro-Agrônomo

**Orientador: Dr. Darcy Martins da Silva**

Dissertação apresentada à Escola Superior de  
Agricultura "Lutz de Queiroz", da Universidade  
de São Paulo, para obtenção do título de  
Mestre em Fitopatologia

**P I R A C I C A B A**

Estado de São Paulo - Brasil

Fevereiro, 1979

A meu pai e  
a minha mãe  
pelos sacrifícios

MEU RECONHECIMENTO

À minha mulher Lède  
aos meus filhos:  
Marco Aurélio e Ana Paula,  
pelo encorajamento

D E D I C O

## A G R A D E C I M E N T O S

Agradecemos a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e nos estimularam, especialmente:

- Ao Dr. Darcy Martins da Silva, pela orientação eficiente, amizade e estímulos recebidos;
- À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de estudo e apoio recebidos durante o curso;
- Ao Prof. Dr. Ferdinando Galli, chefe do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pelas facilidades oferecidas durante o curso de Pós Graduação;
- Ao Prof. Dr. Admar Cervellini, Diretor do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, pelo uso de seus laboratórios e facilidades para a realização deste trabalho;
- Ao Dr. Álvaro Santos Costa, do Instituto Agronômico de Campinas, pelo fornecimento de material vegetal infectado com os diversos vírus por nos pesquisados, pelos testes efetuados e pelos estímulos recebidos;
- Ao Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira, da Universidade de Campinas, pelas sugestões transmitidas e pela consideração e insentivos a nós transmitidos.

- À UNDT - IAEA - BRA - 71/556, na pessoa do Dr. Peter B. Vose, pelas doações que muito contribuíram para a realização desta dissertação;
- Ao Dr. Éric Balmer, do Departamento de Fitopatologia da E. S. A. "Luiz de Queiroz", pela ajuda do nosso ingresso no Curso de Pós-graduação em Fitopatologia e pelo estímulo e consideração;
- À Dr.<sup>a</sup> Elke J.B.N. Cardoso, do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, pela crítica dos originais e consideração;
- À Dr.<sup>a</sup> Neusa de Lima Nogueira, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, ao incentivo para ingressar-mos no Curso de Pós-graduação e pela transmissão das técnicas iniciais em microscopia;
- Aos meus colegas de curso, pela amizade e apoio recebidos.
- Ao Sr. Paulo J. Gáspari, pelos serviços de datilografia e impressão.

## Í N D I C E

	Página
1 - RESUMO .....	1
2 - INTRODUÇÃO .....	3
3 - REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA .....	6
4 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	10
4.1 - Fontes de Inóculo .....	10
4.2 - Extração Inicial .....	11
4.3 - Solução Tampão .....	12
4.4 - Métodos de Purificação .....	12
4.4.1 - Método I .....	13
4.4.2 - Método II .....	15
4.4.3 - Método III .....	17
4.5 - Inoculações Mecânicas .....	20
4.6 - Gradiente de Densidade .....	20
4.7 - Microscopia Eletrônica (ME) .....	22
4.8 - Análise do Espectrofotômetro .....	22
4.9 - Testes para Determinação do Ácido Nu- cléico .....	23
4.9.1 - Teste para RNA .....	23
4.9.2 - Teste para DNA .....	23

	Página
4.10 - Teste da Estabilidade das Partículas dos Virus a Vários pHs .....	24
4.11 - Testes para Estabilidade das Partículas de Virus a Várias Concentrações de EDTA .....	24
5 - RESULTADOS .....	26
5.1 - Caracterização do VMDT .....	26
5.2 - Caracterização do VME e VMDF .....	34
5.3 - Curva de Absorção e Ácido Nucléico dos Virus VMDT , VME e VMDF .....	35
6 - DISCUSSÃO .....	47
7 - CONCLUSÕES .....	54
8 - SUMMARY .....	56
9 - BIBLIOGRAFIA .....	58

## 1 - RESUMO

Os resultados relatados nesta dissertação dizem respeito a identificação, morfologia e algumas propriedades físico-químicas e biológicas das três espécies de vírus do grupo transmitidos por *Bemisia tabaci* Genn (mosca-branca). Os vírus estudados foram: o do mosaico dourado do tomateiro (VMDT) e uma de suas linhagens (VMDT-N), o do mosaico da *Euphorbia* (VME) e do mosaico dourado do feijoeiro (VMDF), todos com ampla distribuição e de razoável importância econômica em algumas regiões agrícolas. Várias hospedeiras foram utilizadas, sendo *Nicotiana glutinosa* L. ; *Nicotiana tabacum* L. ; *Datura stramonium* L. e *Physalis floridana* Rydberg, infectadas com

VMDT e VMDT - N ; *N. glutinosa* ; *D. stramonium* e *Euphorbia prunifolia* Jacq. infectadas com o VME e *Phaseolus vulgaris* L. com o VMDF.

As folhas de plantas doentes foram colocadas em nitrogênio líquido e posteriormente em uma solução tampão de fosfato de sódio pH 7,0 , 0,01 M com 2-mercaptoetanol a 1% . A clarificação inicial desse extrato foi feita em n-Butanol a 7% e a purificação dos virus foi realizada em sistema PEG-NaCl (6% e 1%) com posterior ultracentrifugação diferencial e em gradiente de sacarose.

A morfologia dos virus estudados é semelhante e apresentou-se como duas partículas isométricas geminadas, cada uma com um diâmetro de 13 - 15 nm. Tratamentos com várias concentrações de EDTA e em diversos valores de pH provocaram variações significativas nas dimensões e estruturas das partículas dos virus. Testes das preparações com orcinol reagiram positivamente.



## 2 - INTRODUÇÃO

O grupo de agentes fitopatogênicos transmitidos pela "mosca-branca" *Bemisia tabaci* Genn (Homoptera Aleyrodidae) só recentemente foi identificado como sendo de natureza viral (MATYIS *et alii*, 1975), podendo ser disseminado a partir de muitas espécies de hospedeiras naturais para áreas cultivadas e pastagens existentes nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e outras partes do Brasil. Esses agentes são conhecidos também como causadores de doenças importantes na Ásia, África, Índia e outras partes do mundo. As principais famílias infectadas por esses vírus são *Eurhorbiaceae*, *Labiatae*, *Malvaceae*, *Solanaceae*, *Compositae* e outras, apresentando mosaico do tipo dourado ou encrespamento.

Embora o conhecimento da ocorrência das moléstias do feijoeiro e do tomateiro, transmitidas pela mosca-branca *B. tabaci* em São Paulo e outras partes do Brasil date de alguns anos, a sua importância econômica não era grande no passado e, conseqüentemente, não vinham recebendo muita atenção. Em anos mais recentes, condições ambientais favoráveis e o grande desenvolvimento da cultura da soja, que é uma excelente hospedeira desse inseto vetor, proporcionaram o desenvolvimento de grandes populações da mosca branca em várias regiões do norte do Paraná, sul de São Paulo e em outras partes do país. Os níveis populacionais do inseto, principalmente em feijoads e tomates feitos em fins da época de cultura da soja, tem sido elevados. Conseqüentemente as moléstias transmitidas por esse inseto tiveram sua incidência muito aumentada, passando a representar perdas econômicas bastante sensíveis.

De extremo interesse era a comprovação definitiva da natureza dos agentes fitopatogênicos transmitidos por *B. tabaci*. A sua etiologia vinha sendo aceita como de natureza viral (COSTA, 1969 , 1975 ; VARMA, 1963) entretanto, descobertas feitas no campo dos agentes fitopatogênicos recentemente mostraram que micoplasma (DOI *et alii*, 1967) , riquetsias e outros organismos (DAVIS, 1973 ; DIENER, 1974 ; GILLASPIE, 1973 e MARAMOROSCH, 1972) poderiam ser causadores de moléstias em plantas, e que algumas até então tidas como sendo causadas por vírus tinham como agente etiológico microrganismos desses grupos.

Esses fatos trouxeram certa hesitação entre os que estudam as moléstias de plantas transmitidas pela "mosca-branca" em aceitar a sua etiologia viral como definitivamente comprovada. Para que isso viesse a ser estabelecido em bases sólidas seria necessário purificar o agente etiológico e reproduzir a moléscom o material obtido. Preparações altamente purificadas são necessárias para se fazerem análises químicas do vírus, bem como obter a produção de antissoro. Os métodos serológicos estão sendo muito utilizados atualmente pelos virologistas para a caracterização dos vírus, bem como para a verificação das relações de parentesco existentes entre os mesmos.

Portanto, o objetivo principal desta dissertação foi o de purificar o agente causal do VMDT para caracterizá-lo e também realizar estudos de suas propriedades bio-físico-químicas. Contudo, resultados preliminares com relação a dois vírus (VMDF e VME) e uma das estirpes do VMDT pertencentes ao grupo dos vírus transmitidos pela mosca-branca (*B. tabaci*) serão discutidos, pelas relações que apresentaram entre si e com o VMDT.

### 3 - REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA

A morfologia dos agentes infecciosos transmitidos por "mosca branca" não se achava ainda totalmente esclarecida e também havia relatos carentes de confirmação, em vista da pouca atenção que era dada para esse problema. Um dos primeiros trabalhos apresentados a respeito foi o de SHARP e WOLF (1949) no qual se utilizaram plantas de *Nicotiana tabacum* L., infectadas com o vírus do "leaf-curl", provenientes da Venezuela. O suco das plantas foi concentrado e parcialmente purificado através de ultracentrifugações diferenciais com a finalidade de se realizar estudos ao microscópio eletrônico, bem como sua análise em ultracentrífuga analítica. Os resultados obtidos por esses pesquisadores revelaram a presença de algumas

partículas alongadas de 1.140 nm de comprimento e a maioria de las media cerca de 280 nm por 15 nm de largura. Os mesmos autores, em 1951, publicaram outro trabalho relacionado com o mesmo vírus do "leaf curl", explicando que nas pesquisas anteriores tinha havido contaminação com o vírus do mosaico comum do fumo e, portanto, aquelas partículas não eram realmente as do vírus em questão. Nesta pesquisa o vírus do "leaf-curl" foi determinado como partículas de conformação aproximadamente esferoidal, sendo que o seu diâmetro era em torno de 39 nm, possuindo uma constante de sedimentação igual a 75 S.

Algumas pesquisas tem sido relatadas para evidenciar a presença dos vírus no interior das células hospedeiras infectadas pelos agentes infecciosos transmitidos por "mosca branca". TSAU (1963), utilizando plantas de *Gossypium hirsutum* L., sadias e inoculadas com o vírus "leaf-crumple", examinando cortes desse material ao microscópio ótico relatou ocorrência de inclusões em alguns núcleos de plantas inoculadas mas nunca em plantas sadias. As inclusões tinham forma aproximadamente esférica e diâmetros que variavam de 2 a 10  $\mu$ . Os núcleos com inclusões se apresentavam de duas a quatro vezes maiores que os normais e sempre estavam confinados nas células do parênquima do floema, dos feixes vasculares ou células dos feixes da bainha. Ocorriam somente ocasionalmente nas células da periferia do floema. Prevalciam em áreas foliares enrugadas, em contraposição com as áreas cloróticas.

SUN, em 1964, realizando estudos ao microscópio eletrônico de secções ultrafinas de folhas de *Abutilon striatum* var. *tompsonii*, infectadas com o vírus da clorose infecciosa, publicou um trabalho em que descrevia a presença de partículas esferoidais com um diâmetro aproximado de 80 nm, encontradas no citoplasma das células. O autor considerou como vírus essas partículas e revelou a presença de um núcleo interno com um diâmetro de 16 nm.

COSTA (1969) relatou que Kitajima, observando preparações rápidas de *Sida* sp. infectadas com a clorose infecciosa e de *Euphorbia prunifolia* e *Datura stramonium* infectadas com os vírus do mosaico da euphorbia, vírus do mosaico dourado do feijoeiro e vírus do "leaf-curl" do tomateiro, não observou nem partículas alongadas e nem grandes partículas esferoidais associadas à doença.

KITAJIMA e COSTA (1974), relataram que em secções ultrafinas de tecido foliar de plantas infectadas com o vírus do mosaico do Abutilon, os vasos crivados mostravam, com baixa frequência, a presença de partículas isométricas de 20-25 nm de diâmetro. Afirmaram que isso ocorreu nos seguintes casos: *Sida micrantha*, *Sida rombifolia*, quiabo, algodoeiro, rubi infectados com o mosaico do abutilon; *Phaseolus longipendunculus* com sintomas de mosaico dourado. O mesmo foi observado em um mosaico em *Vigna*, em feijoeiro coletado em Cali, Colômbia e mandioca com mosaico, procedente de Ibadan, Nigéria.

Mais recentemente, MATYIS *et alii* (1975) observaram, nas preparações purificadas do vírus do mosaico dourado do tomateiro (VMDT), partículas de morfologia bastante singular ou seja, constituídas de duas unidades isométricas germinadas com 12 - 13 nm de diâmetro, considerando essas partículas germinadas como o agente infeccioso. Mencionam, também, terem observado partículas com o mesmo tipo de morfologia do VMDT em preparações semi-purificadas de vírus do mosaico da euphorbia (VME) e do vírus do mosaico dourado do feijoeiro (VMDF).

Com relação ao VMDF, GALVEZ (1976) encontrou, em suas preparações purificadas, partículas com dimensões e morfologia semelhantes às mencionadas por MATYIS *et alii* (1975). BIRN (1975) tentando purificar o vírus que produz mosaico da euphorbia, encontrou partículas isométricas com 30 nm de diâmetro, as quais foram também observadas em cortes ultra-finos de folhas de plantas infectadas. Este resultado difere dos encontrados para o vírus do grupo dos transmitidos por *B. tabaci* e estudados nesta dissertação.

Quanto a esse tipo singular de morfologia, vale a pena assinalar que outros vírus não transmitidos por "mosca-branca" já foram relatados por PLAVIC-BAJAC e MARAMOROSCH (1972); SILVESTER (1973) e BOCK (1974/1975).

#### 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

##### 4.1 - Fontes de Inóculo

Utilizaram-se diferentes espécies vegetais a fim de selecionar a hospedeira mais adequada para a purificação dos virus, com respeito a uma preparação mais pura e com um maior rendimento final. As plantas doentes e as plantas controle sa<sub>u</sub>dias, foram obtidas na Seção de Virologia do Instituto Agrônômico de Campinas, e as espécies utilizadas foram as seguintes: *Nicotiana tabacum* (L.) , *Nicotiana glutinosa* , *Datura stramonium* e *Physalis floridana* , apresentando sintomas causados pelos virus do mosaico dourado do tomateiro (VMDT) e por uma de suas linhagens que provoca clorose ao longo das nervuras (VMDT-



N) ; *N. glutinosa* , *D. stramonium* e *Euphorbia prunifolia* , com sintomas dos virus do mosaico da euphorbia (VME) e *Phaseolus vulgaris* , apresentando sintomas de mosaico dourado do feijoeiro (VMDF). Para estudos as folhas novas e médias que apresentavam sintomas intensos foram utilizadas, eliminando-se as demais.

#### 4.2 - Extração Inicial

Um dos métodos utilizados foi o de selecionar as folhas com sintomas pronunciados e colocá-las em almofariz de porcelana, contendo nitrogênio líquido, a fim de que o mesmo rompesse todas as células, à baixa temperatura. Uma vez obtido o pó vegetal, este foi colocado em recipiente contendo a solução tampão e filtrado em pano de malha fina, para depois ser submetido a uma baixa centrifugação de 2.200 g.

Uma das variações na obtenção do extrato inicial foi o de colocar as folhas com sintomas em copo de liquidificador contendo solução tampão e submetê-las a agitação por 60 segundos. O extrato foi filtrado em pano de malha fina e submetido, também, a uma baixa centrifugação de 2.200 g.

#### 4.3 - Solução Tampão

Uma das soluções tampão usadas foi a mesma utilizada por BEST (1964), constituindo de uma variação do tampão de fosfato comum. A mesma foi preparada da seguinte maneira, para se obter um pH 7,0: misturaram-se 250 ml de  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  a 0,28 M ; 67,5 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  a 0,1 M ; 32,5 ml de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  a 0,1 M , adicionando-se ou não 10 ml de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 0,01 M ; em seguida, completou-se o volume a 1.000 ml com água destilada. Essa mistura foi denominada de solução A .

Nas etapas iniciais da extração foram adicionados 0,13 g de sulfito de sódio a cada 100 ml da solução A . A essa mistura denominou-se de solução B .

Outra solução tampão utilizada foi a de fosfato, constituída apenas de uma mistura de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  . Para a obtenção de pH 7,0 , para cada 100 ml de tampão de fosfato, adicionaram-se 31 ml de solução de fosfato de sódio monobásico, e 69 ml de solução de fosfato de sódio dibásico, preparando-se essa solução ora a 0,1 M ora a 0,01 M . O sulfito de sódio foi utilizado da mesma maneira que em solução B .

#### 4.4 - Métodos de Purificação

Além da escolha da melhor hospedeira foram experimentados diferentes métodos de purificação com o objetivo de sele

cionar o que produzisse concentração do agente infeccioso em boas condições e com uma menor quantidade de impurezas. Dentre os vários métodos selecionados, NORDAN (1973), destacamos os seguintes:

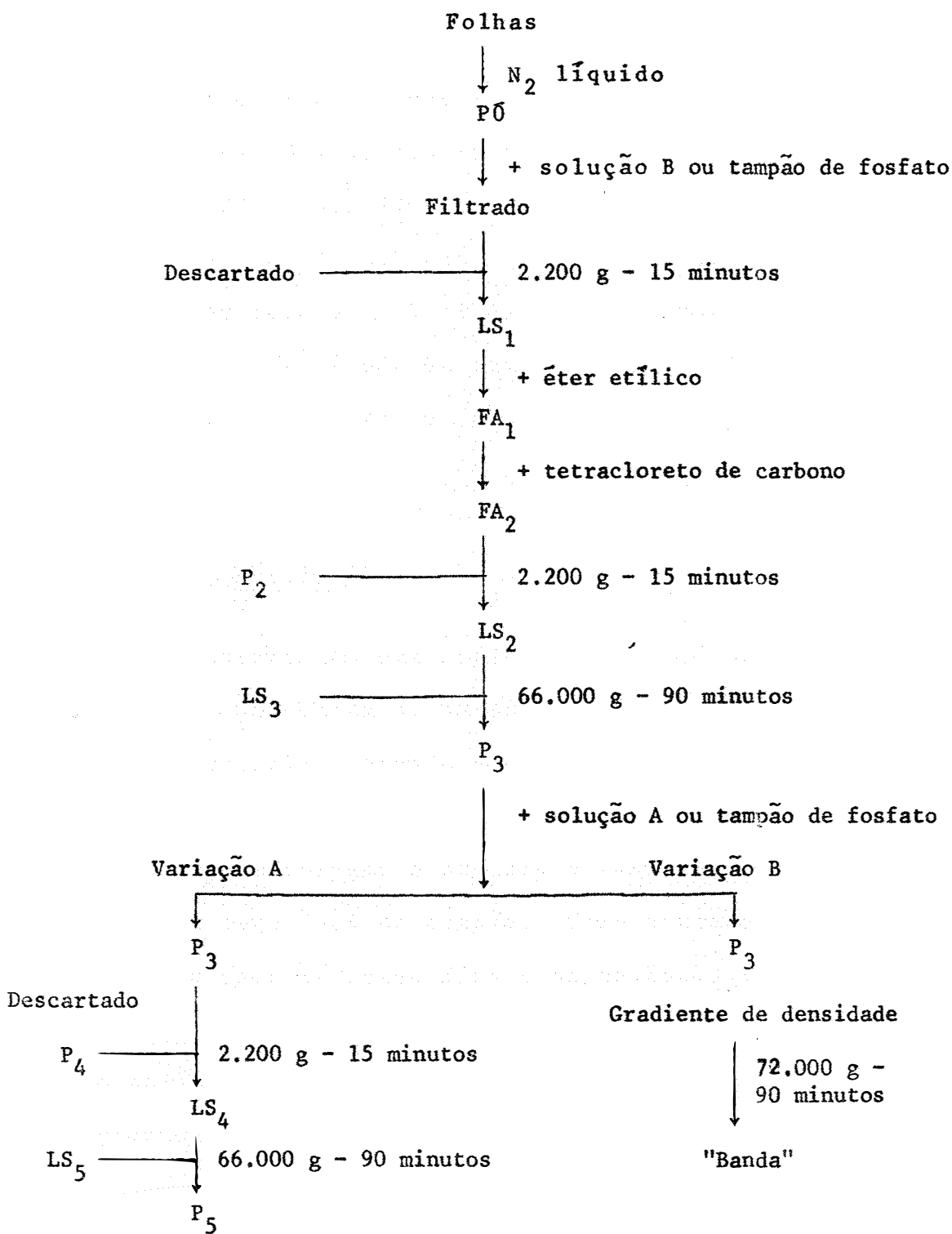
#### 4.4.1 - Método I

Consistiu em colocar 50-60 g de folhas doentes em almotariz de porcelana contendo nitrogênio líquido (ou em copo de liquidificador). Obteve-se dessa maneira o pó vegetal que foi adicionado a uma solução tampão B ou tampão de fosfato, na proporção de 2 ml de tampão para cada grama de folha. Esse extrato foi passado através de um pano de malha fina, com a finalidade de reter o material mais grosseiro e extrair a maior quantidade possível de fase líquida. Em seguida, o material retido foi colocado novamente em solução tampão B ou de fosfato comum para melhor extração da parte solúvel. O filtrado foi então centrifugado a 2.200 g por um período de 15 minutos.

O líquido sobrenadante era então submetido a um tratamento em sistema éter-tetracloro de carbono (peso/volume), e a fase aquosa (FA) foi separada em funil separador.

A mesma foi então submetida a uma baixa centrifugação a 2.200 g por 15 minutos e o líquido sobrenadante foi posteriormente ultracentrifugado a 66.000 g durante 90 minutos. 0

ESQUEMA DO MÉTODO I

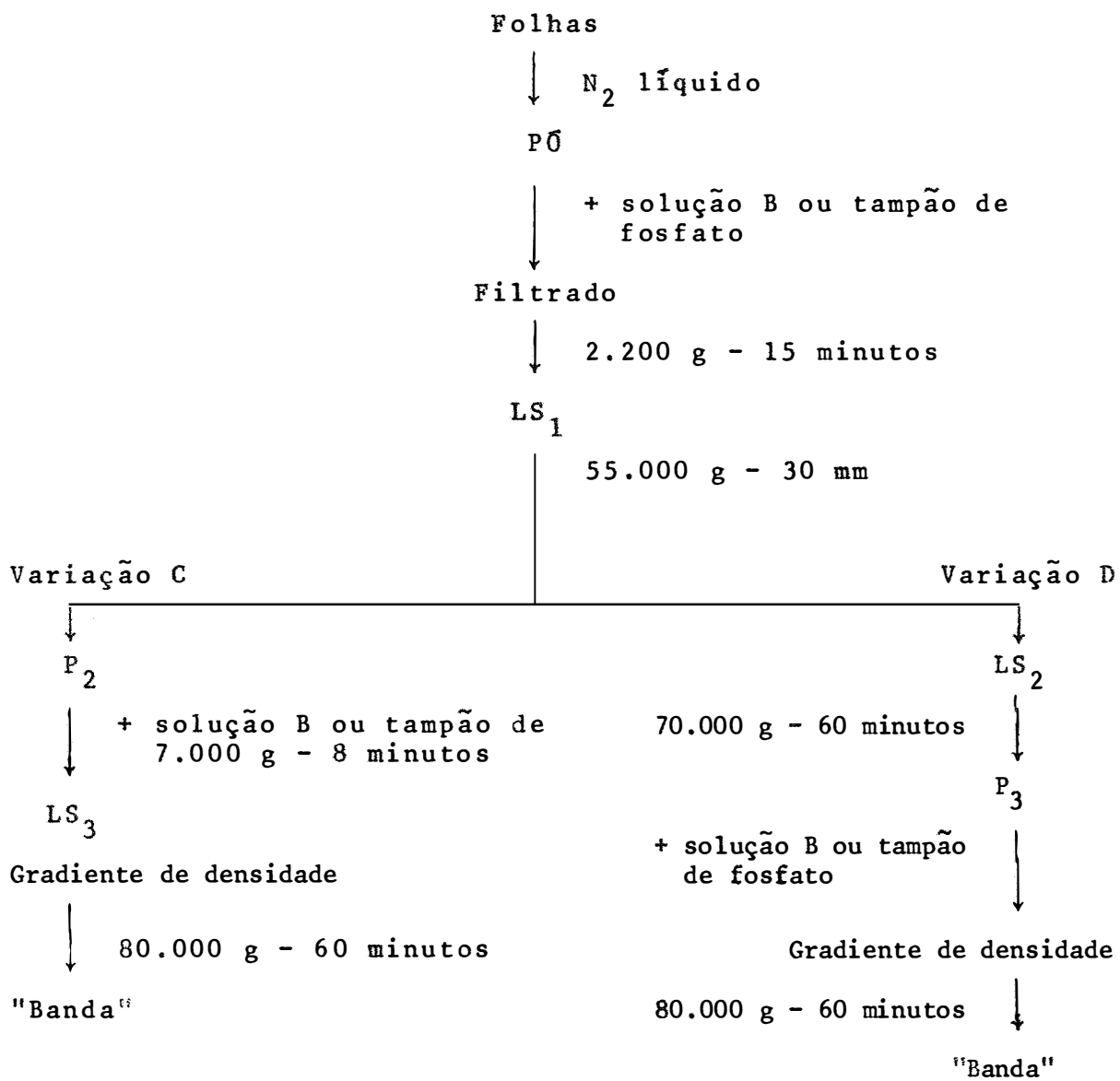


Neste ponto da purificação houve duas variações de processamento denominadas de A e B respectivamente. A variação A consistiu em submeter o "Pellet" resuspenso a uma baixa centrifugação de 2.200 g por 15 minutos para retirar a porção não solúvel, sendo o sobrenadante submetido a uma ultracentrifugação a 66.000 g por 90 minutos. O material sedimentado foi resuspenso em 2 ml de solução A ou tampão fosfato. A variação B consistiu em colocar 0,5 ml do "Pellet" resuspenso em coluna de gradiente de densidade de sacarose de 0-40% (BRAKKE, 1960), e ultracentrifugado a 72.000 g por 90 minutos.

#### 4.4.2 - Método II

Consistiu em uma modificação do método usado por BEST (1964). Colocaram-se 50-60 g de folhas com sintomas de doença em almofariz contendo nitrogênio líquido (ou em copo de liquidificador). Obteve-se dessa maneira o pó vegetal o qual foi adicionado à solução B ou tampão fosfato, na proporção de 1 g de folha para 2 ml de tampão. Esse extrato foi passado através de um pano de malha fina e os resíduos foram lavados como no Método I. O filtrado foi então centrifugado a 2.200 g por um período de 15 minutos. O líquido sobrenadante foi posteriormente centrifugado a 55.000 g por 30 minutos.

## ESQUEMA DO MÉTODO II

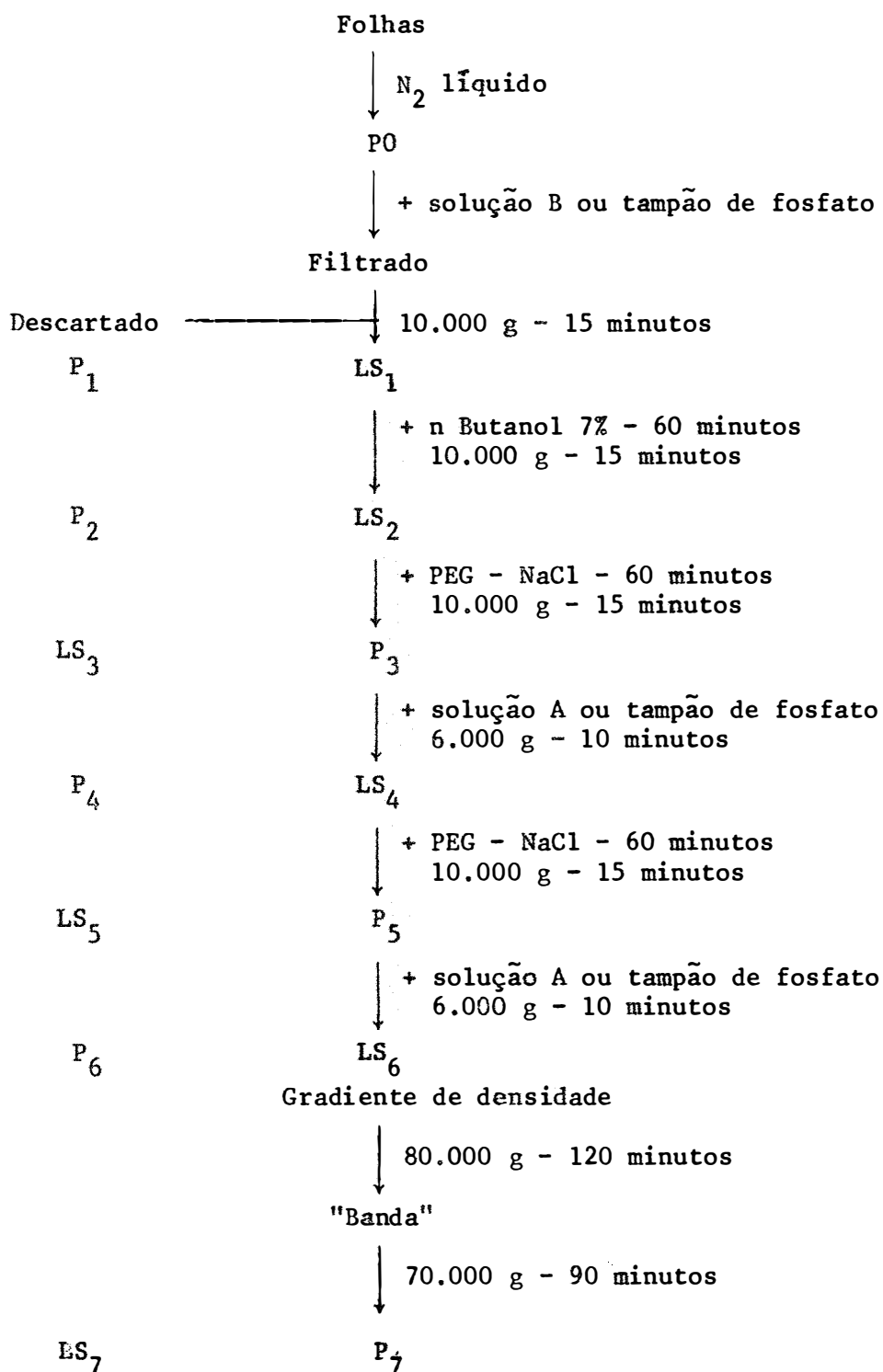


Neste ponto do processo de purificação houve duas variações denominadas de C e D respectivamente. A variação C consistiu em descartar o líquido sobrenadante da última centrifugação e resuspender o sedimento em solução B ou tampão fosfato, sendo o mesmo posteriormente centrifugado a 7.000 g por 8 minutos. O sobrenadante foi colocado em coluna de gradiente de densidade de sacarose 0-40% (BRAKKE, 1960) e ultracentrifugado a 80.000 g por 60 minutos. A variação D consistiu em descartar o sedimento da última centrifugação e submeter o líquido sobrenadante a uma ultracentrifugação a 70.000 g por um período de 60 minutos. O sedimentado foi então resuspenso em solução B ou tampão de fosfato e colocado em tubos com um gradiente de densidade de sacarose 0-40% (BRAKKE, 1960) e ultracentrifugado a 80.000 g por 60 minutos. As camadas formadas na coluna de gradiente foram separadas e observadas ao M.E.

#### 4.4.3 - Método III

Consistiu de uma metodologia em que se utiliza de um solvente orgânico (n-Butanol) para retirar a pigmentação do extrato e posterior tratamento com polietilenoglicol (PEG-6.000) e cloreto de sódio (NaCl), sendo este método bastante utilizado atualmente, apresentando grande eficiência na purificação de diversos vírus, em vários trabalhos, como os de FREIDMANN, 1970 ; GODDING, 1967 e HSU, 1973.

## ESQUEMA DO MÉTODO III





Cerca de 50-60 g de folhas com sintomas foram colocadas em almofariz contendo nitrogênio líquido (ou em copo de liquidificador). Obteve-se dessa maneira o pó vegetal e foi adicionado a uma solução B ou tampão fosfato na proporção de 2 ml de tampão para 1 g de folhas.

Esse extrato foi exprimido em pano de malha fina com a mesma finalidade dos dois métodos anteriormente descritos e os resíduos foram também lavados pela maneira descrita. O filtrado foi então submetido a uma centrifugação a 10.000 g por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se n-Butanol a 7% no líquido sobrenadante, com agitação constante por um período de 60 minutos, a  $+ 4^{\circ}\text{C}$ . Decorrido esse tempo, a mistura foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos.

O sobrenadante foi tratado com PEG e NaCl, a 6% a 1% respectivamente, por 60 minutos, em agitação constante a  $+ 4^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, a mistura foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos e o precipitado resuspenso em solução A ou tampão fosfato, sofrendo uma baixa centrifugação para separar o material insolúvel do sobrenadante. Posteriormente o solvente deste foi submetido a novo ciclo de tratamento com PEG-NaCl. O precipitado foi resuspenso em 1,5 ml de solução tampão, colocado em coluna de gradiente de densidade de sacarose 0-40% (BRAKKE, 1960) e submetido a ultracentrifugação a 80.000 g por 120 minutos. As camadas formadas no final da ultracentrifugação foram visualizadas pela difusão de um feixe de luz de uma lâmpada comum colocada na parte superior do tubo de celulose, con-

tendo solução de sacarose em gradiente. As camadas foram retiradas com seringa comum dotada de agulha com ponta recurvada e ultracentrifugadas a 70.000 g por 90 minutos.

#### 4.5 - Inoculações Mecânicas

Para cada etapa da clarificação e purificação foram coletadas pequenas porções dos extratos para testar a presença ou ausência de infectividade, procurando-se através de inoculações localizar o agente infeccioso. As diferentes frações foram inoculadas mecanicamente em folhas de *N. tabacum*, *N. glutinosa* e *D. stramonium* com 2 - 3 semanas de idade. Todas as inoculações foram realizadas na Seção de Virologia do Instituto Agronômico de Campinas.

A inoculação mecânica foi feita utilizando algumas gotas do extrato sobre folhas da planta teste cobertas com carborundo passado por peneira de 600 mesh. Após a inoculação, as folhas foram lavadas com água destilada e as plantas mantidas em estufa. Posteriormente, em vários períodos, as plantas foram observadas e os resultados da infectividade foram protocolados.

#### 4.6 - Gradiente de Densidade

Foram utilizados dois métodos para preparar as colunas de gradiente de sacarose: No primeiro método o gradiente

é formado imediatamente pela combinação gradativa de soluções tampão com sacarose a 40% e tampão de fosfato a níveis de um sistema de vasos comunicantes e no segundo o gradiente é formado por camadas de solução de sacarose de concentrações diversas, permanecendo em repouso durante 24 horas.

Para o método rápido (BRITTEN-ROBERTS, 1960) usaram-se dois cilindros de vidro contendo solução de sacarose em tampão fosfato de sódio, 0,01 M , pH 7,0 . As duas colunas foram montadas de modo a formar um sistema de vasos comunicantes, contendo um dos cilindros sacarose 10% e outro sacarose 40% , em volumes iguais. A solução de menor concentração fluía para o cilindro contendo a solução mais concentrada e através de um agitador magnético que promovia a mistura das duas soluções e obtinha-se no tubo de centrífuga um gradiente de densidade decrescente do fundo para o topo do tubo.

Pelo segundo método (BRAKKE, 1960), foram utilizadas soluções de sacarose a 10% , 20% , 30% e 40% em tampão fosfato de sódio 0,01 M , pH 7,0 . Em cada coluna adicionaram-se separada e vagarosamente volumes de 1,6 ml , 2,8 ml , 2,8 ml e 2,8 ml das respectivas concentrações, até perfazer 10 ml, iniciando-se com a maior concentração de sacarose. Após a colocação das camadas das soluções de sacarose, os tubos foram postos em geladeira a  $+ 4^{\circ}\text{C}$  e mantidos por período mínimo de 24 horas. Foram também preparadas colunas com gradiente de densidade diferente, obtidos com soluções de sacarose com 5% , 10%,

20% e 30% . Este gradiente de densidade foi obtido da mesma maneira que as colunas com o gradiente de sacarose anterior.

#### 4.7 - Microscopia Eletrônica (ME)

As diversas preparações purificadas foram observadas ao ME Siemens, modelo Elmiskopa IA . O material a ser examinado foi colocado em grades de cobre previamente cobertas com parlódio 1,5% e cobertas com camadas de carvão (SANTANDER, 1969), com a finalidade de conferir maior resistência à membrana de parlódio. A cobertura foi realizada em metalizador Siemens, modelo VBG 500. As preparações do tipo DIP foram contrastadas negativamente com ácido fosfotúngstico 1,5% (BRENNER e HORNER, 1958) neutralizadas com KOH 5 N , ou positivamente com acetato de uranila 3% .

#### 4.8 - Análise do Espectrofotômetro

Para a determinação da curva de absorção, as suspensões de vírus purificado foram colocadas em cubeta de sílica e as soluções de tampão sem vírus foram postas em outra cubeta como "branco". A medição da adsorção foi feita na faixa de luz ultravioleta com comprimentos de onda entre 2.000 Å e 3.000 Å . Posteriormente foi também obtida, nas mesmas condi-

ções, a absorvância de suspensões provenientes de plantas sa-  
dias que sofreram todos os processamentos de clarificação e pu-  
rificação.

#### 4.9 - Testes para Determinação do Ácido Nucléico

##### 4.9.1 - Teste para RNA

A solução reagente utilizada continha 100 mg de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  em 100 ml de HCl e 3,5 ml de solução de orcinol em etanol a 6% . Em 3,5 ml dessa solução adicionou-se 1,0 ml do purificado e os tubos contendo essa mistura foram colocados em água fervente por 20 minutos. Após esse tratamento, os mes-  
mos foram resfriados e em seguida realizaram-se as leituras de absorção em espectrofotometria, a um comprimento de onda de  $6.650 \text{ \AA}$  .

##### 4.9.2 - Teste para DNA

A solução reagente utilizada continha 1 g de difenil-  
lamina em 100 ml de ácido acético glacial acrescida de 2,75 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Posteriormente, as etapas foram idênti-  
cas às realizadas no teste para RNA.

#### 4.10 - Teste da Estabilidade das Partículas dos Virus a Vários pHs

Após a purificação do vírus, com a obtenção do "Pellet" final, este foi resuspenso em água bi-destilada e em seguida coletaram-se pequenos volumes com a finalidade de testar a estabilidade das partículas dos vírus, e determinar suas dimensões nos diversos valores de pH. A solução usada com diferentes valores de pH foi a de tampão fosfato de sódio, na concentração de 0,02 M .

Os valores de pH testados foram: 4,0 , 5,0 , 6,0 , 7,0 , 8,0 e 9,0. Volume por volume de purificado e solução tampão 0,02 M foram misturados para se obter no final um tampão com 0,01 M . A mistura foi mantida à temperatura ambiente por um período de 30 minutos. Decorrido esse tempo, prepararam-se as grades pelo método rápido (DIP) e, em seguida, foram observadas as dimensões e fotografadas ao ME.

#### 4.11 - Testes para Estabilidade das Partículas de Virus a Várias Concentrações de EDTA

Soluções de EDTA em tampão fosfato 0,05 M , pH 7,0 , foram feitas nas concentrações de 0,0002 M ; 0,002 M ; 0,02 M e um controle sem EDTA. Misturas (v : v) da suspensão de vírus e solução de EDTA foram preparadas, ficando a concentração

final com 0,0001 M ; 0,001 M e 0,01 M , e a molaridade do tam<sub>ã</sub>o fosfato a 0,025 M . Posteriormente foram determinadas as dimens<sub>õ</sub>es das part<sub>í</sub>culas tratadas nas diversas concentra<sub>õ</sub>es de EDTA.

## 5 - RESULTADOS

### 5.1 - Caracterização do VMDT

Inicialmente nossa pesquisa teve a principal preocupação de purificar o VMDT por ser, do grupo dos transmitidos pela *B. tabacchi*, um dos mais estáveis e por ser transmissível mecanicamente para diversas espécies vegetais, consideradas como boas indicadoras de viroses, facilitando assim os testes de infectividade das diferentes amostras retiradas durante o processo de purificação.

O extrato de folhas doentes obtido com nitrogênio líquido apresentava-se com menor quantidade de pigmentos verdes em comparação com o obtido no liquidificador. Isso foi obser-



vado e comprovado nos extratos de todas as espécies vegetais trabalhadas.

Dentre as várias soluções tampão utilizadas para o VMDT, os melhores resultados foram obtidos com a solução B e tampão de fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,0, acrescido de sulfito de sódio (130 mg / 100 ml tampão) ou 2-mercaptoetanol 1%. As variações da molaridade nas concentrações de 0,1 M a 0,01 M não mostraram ser críticas com respeito à obtenção do VMDT purificado mas, pelo exame ao ME, a estrutura das partículas obtidas em tampão a 0,01 M parecia melhor preservada.

As preparações finais de VMDT, que apresentaram boa infectividade nos testes biológicos, apresentavam ao ME partículas isométricas geminadas de 13-15 nm de diâmetro cada (Figura III). Tais partículas não foram encontradas em material obtido a partir de folhas de plantas sadias. Os melhores resultados de infectividade com os diferentes métodos de purificação para o VMDT foram os obtidos a partir de *N. glutinosa*, apresentando também grande concentração de partículas muito pequenas. Com *N. tabacum* e *D. stramonium*, apesar de apresentarem ao final quantidades razoáveis das partículas geminadas do vírus, revelaram ao ME uma quantidade maior de impurezas. *P. floridana* foi a espécie vegetal que apresentou resultados menos satisfatórios, tanto nos testes de infectividade como nas observações ao ME, onde raramente se observaram as partículas geminadas. Esses resultados podem ser vistos na Figura IV.

Os resultados dos vários métodos de purificação testados mostraram que a infectividade das preparações purificadas obtidas pelo método I foram positivas tanto em sua variação A como na B. A camada visualizada na coluna de sacarose a uma distância de 20-30 mm do menisco apresentou excelente infectividade. Observações ao ME desse material infectivo indicaram que a ultracentrifugação pelo método I proporcionava um meio de obter alta concentração de partículas geminadas e com menos impurezas que as preparações obtidas sem a utilização da coluna de sacarose. Esses resultados podem ser observados na Figura V.

Com a utilização do método II de purificação o material denominado  $P_1$  não foi infectivo e os resultados obtidos pela ultracentrifugação em gradiente de densidade de sacarose revelaram que as quatro camadas observadas nos tubos da ultracentrífuga eram também destituídas de poder infectivo. As observações ao ME também revelaram ausência das partículas geminadas de vírus. Os testes de infectividade da fração  $LS_1$  não foram consistentes, obtendo-se infectividade apenas com algumas das preparações. As observações ao ME dessas preparações revelaram a presença de partículas duplas geminadas do vírus, mas, contendo impurezas que não foram eliminadas pela ultracentrifugação em gradiente de densidade de sacarose.

O tratamento com n-Butanol e, posteriormente, PEG-NaCl, designado método III de purificação, proporcionou bons resultados com relação à concentração de partículas geminadas

de virus quando o tampão utilizado foi solução A com 1% de 2-mercaptoetanol e pH 7,0 . A ultracentrifugação em coluna de gradiente de densidade de sacarose do material obtido por este método separou mais eficientemente as partículas geminadas do virus das impurezas existentes na suspensão. Posteriormente, ultracentrifugação do material retirado da camada a 20-30 mm do menisco, permitiu obter preparações sensivelmente melhores, tanto com respeito à concentração de virus como quanto ao grau de pureza (Figura VI).

Com a obtenção de preparações apresentando grande concentração de partículas de virus, tornou-se mais fácil pesquisar a relação entre variação dos valores de pH do meio e a morfologia das partículas. Os resultados apresentados na Figura VII revelam que o VMDT é relativamente mais estável na faixa de valores de pH entre 4,0 e 7,0 , desintegrando-se gradativamente nos valores de pH 8,0 e 9,0.

Os resultados observados na Figura VIII mostram o efeito das concentrações de EDTA na faixa de 0,0001M a 0,01 M. Como se pode notar, as partículas do VMDT são submetidas a uma crescente desintegração, à medida que aumenta a concentração de EDTA.

Os resultados sobre o efeito do pH e da concentração de EDTA sobre as partículas do VMDT , além de trazer informações sobre características físico-químicas do VMDT, foram considerados nas pesquisas de purificação de dois outros vírus componentes do grupo (VMDF e VME) e uma estirpe isolada

por A. S. Costa (VMDT - N) a partir do VMDT. Quanto aos efeitos do pH a concentrações de EDTA nas dimensões das partículas, os resultados encontram-se nas Tabelas I e II.

TABELA I - Efeitos das variações do pH (4,0 ; 5,0 ; 6,0 e 7,0) sobre o tamanho total das partículas geminadas de VMDT. Comprimento das partículas em nm obtido diretamente das chapas fotográficas com aumento de 270.000 X

pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
27,78	25,93	25,93	29,63
24,08	24,08	25,93	27,78
27,78	24,08	24,08	24,08
29,63	25,93	22,22	24,08
25,93	22,22	31,48	22,22
25,93	27,78	22,22	24,08
25,93	22,22	25,93	25,93
27,78	25,93	22,22	31,48
27,78	25,93	25,93	27,78
25,93	27,78	25,93	33,33
25,93	24,08	27,78	29,63
24,08	24,08	25,93	29,63
25,93	25,93	24,08	25,93
25,93	22,22	24,08	29,63
24,08	25,93	25,93	29,63
27,78	22,22	27,78	25,93
24,08	22,22	27,78	25,93
25,93	24,08	22,22	25,93
25,93	25,93	24,08	25,93
24,08	25,93	24,08	25,93
$m_0 = 26,12$	$m_1 = 24,73$	$m_2 = 25,28$	$m_3 = 27,22$

## Análise de Variância

Causa da Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Tratamento	3	70,97	23,66	4,90 **
Resíduo	76	367,11	4,83	
Total	79			

$$m_0 - m_1 = 1,39$$

$$m_0 - m_2 = 0,84$$

$$m_0 - m_3 = 1,10$$

$$m_1 - m_2 = 0,55$$

$$m_1 - m_3 = 2,49 **$$

$$m_2 - m_3 = 1,94 *$$

$$\Delta = 1,83 \quad (5\%)$$

$$\Delta = 2,24 \quad (1\%)$$

TABELA II - Efeito das variações de concentração de EDTA (sem EDTA ; 0,0001 M ; 0,001 M) sobre o tamanho total das partículas geminadas de VMDT. Comprimento das partículas em nm obtidas diretamente das chapas fotográficas com aumento de 270.000 X

Sem EDTA	0,0001 M	0,001 M
24,08	27,78	25,93
24,08	29,63	25,93
24,08	25,93	25,93
22,22	29,63	29,63
22,22	27,78	27,78
25,93	27,78	27,78
25,93	25,93	25,93
27,78	27,78	25,93
22,22	27,78	25,93
22,22	27,78	27,78
27,78	27,78	25,93
25,93	27,78	29,63
25,93	29,63	27,78
27,78	27,78	29,63
25,93	29,63	29,63
27,78	27,78	27,78
25,93	29,63	24,08
25,93	27,78	27,78
27,78	24,08	27,78
22,22	27,78	27,78
$m_0 = 25,19$	$m_1 = 27,87$	$m_2 = 27,32$

## Análise de Variância

Causa da Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Tratamento	2	80,36	40,18	13,48 **
Resíduo	57	169,73	2,98	
Total	59			

$$m_0 - m_1 = 2,68 \quad **$$

$$m_0 - m_2 = 2,13 \quad **$$

$$m_1 - m_2 = 0,55$$

$$\Delta = 1,31 \quad (5\%)$$

$$\Delta = 1,65 \quad (1\%)$$

## 5.2 - Caracterização do VME e VMDF

Os primeiros ensaios de purificação do vírus do mosáico da Euphorbia (VME) a partir de *N. glutinosa*, *N. tabacum* e *D. stramonium* foram negativos quanto à infectividade e quanto às observações das partículas ao ME. Com a utilização da hospedeira *E. prunifolia* com sintomas de VME os resultados foram satisfatórios tanto quanto à infectividade do material como nas observações ao ME. Neste caso a purificação realizada pelo método I produziu preparações purificadas contendo partículas isométricas geminadas com 13-15 nm cada e semelhantes morfológicamente ao VMDT e VMDT - N (Figura IX).

Para a purificação do vírus do mosaico dourado do feijoeiro (VMDF) a hospedeira utilizada foi o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). Pelos processamentos dos métodos I e II de purificação não foi possível obter resultados positivos com o VMDF, a julgar pelos testes de infectividade mecânica e pelas observações ao ME. Com a utilização do método III não se pode demonstrar a infectividade das preparações purificadas mas, as observações ao ME revelaram a presença de partículas isométricas geminadas de 13-15 nm e semelhantes morfológicamente aos outros três vírus do grupo (Figura IX).



### 5.3 - Curva de Absorção e Ácido Nucléico dos Virus VMDT , VME e VMDF

Todas as preparações purificadas de VMDT e VMDT - N , bem como as parcialmente purificadas de VME e VMDF , pertencentes ao mesmo grupo, foram analisadas ao espectrofotômetro na faixa de luz ultravioleta entre 2.000 Å a 3.000 Å para a determinação na curva de absorbância. Todas as preparações de virus purificadas apresentavam uma curva característica de nucleoproteínas com um máximo de 2.580 Å e um mínimo de 2.460 Å (Figura I).

Testes preliminares com orcinol e difenilamina mostraram evidências na presença de RNA nas preparações.

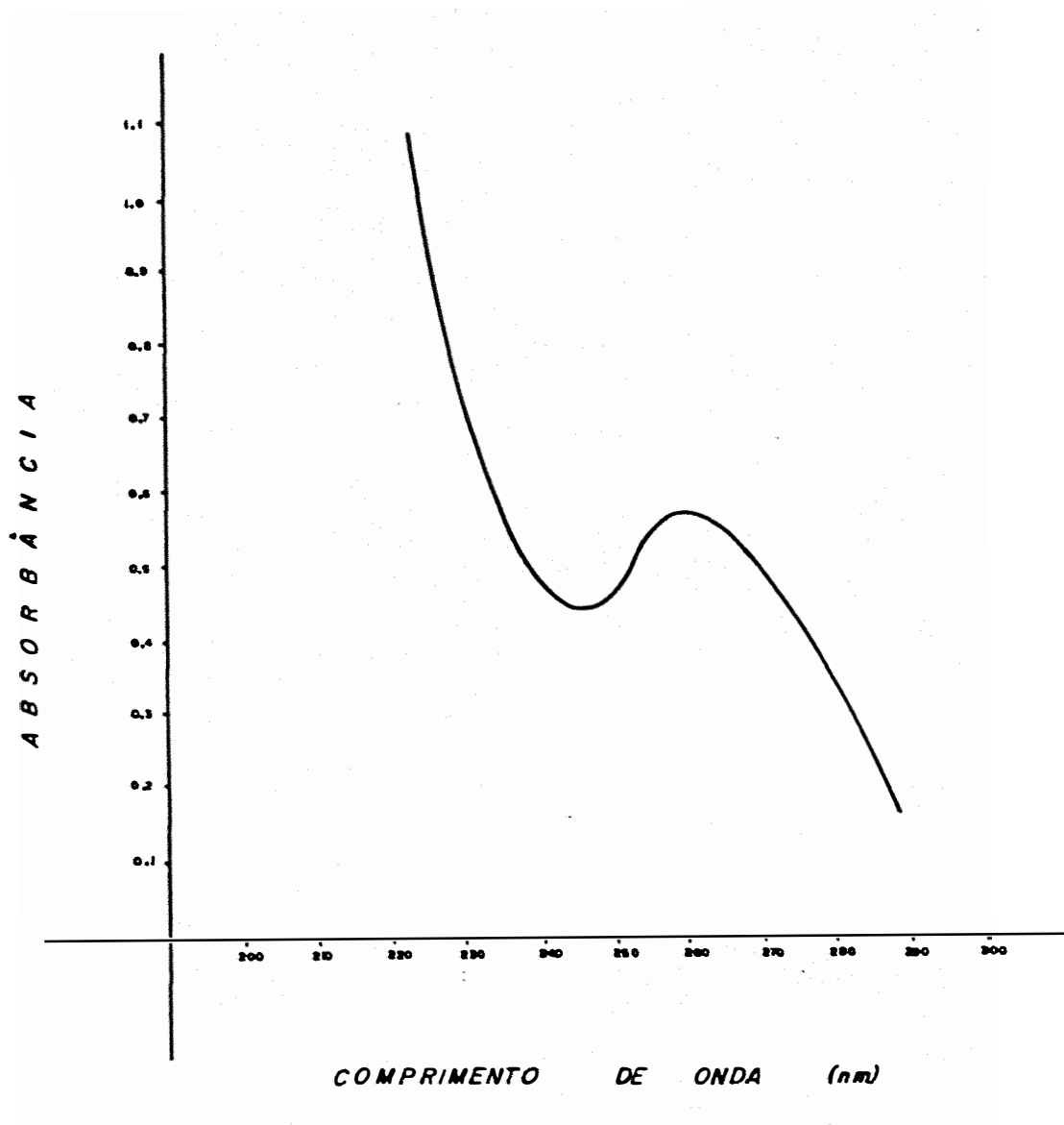


FIGURA I - Curva de absorvância dos purificados de VMDT , VME e VMDF

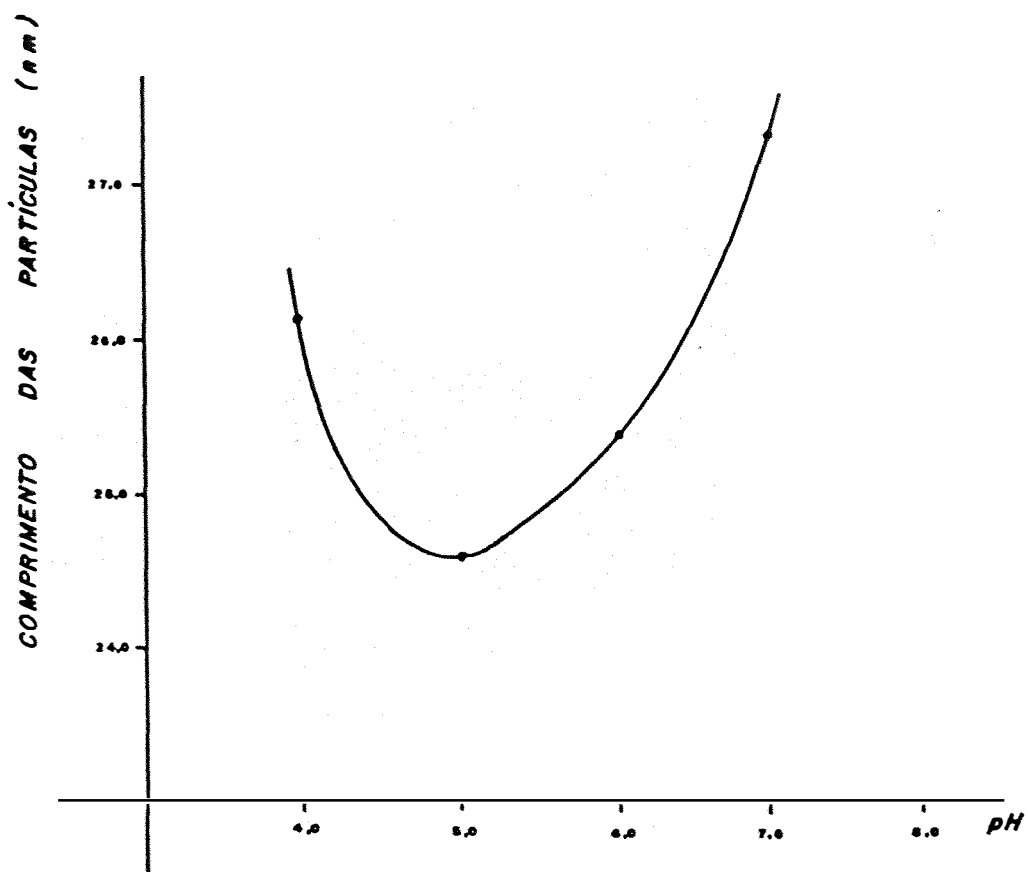


FIGURA II - Efeito do pH com relação às dimensões das partículas do VMDT

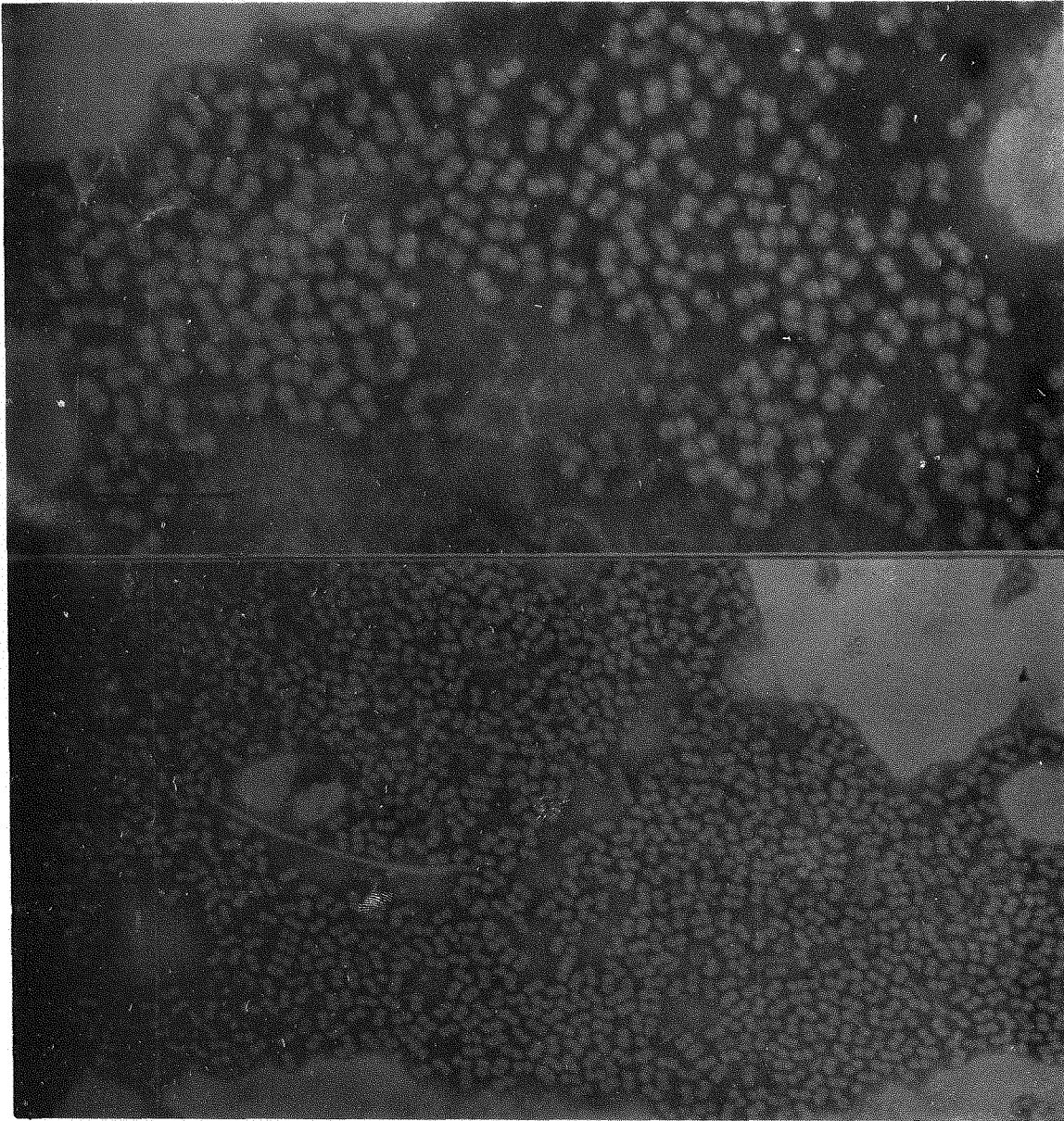


FIGURA III – Partículas isodiamétricas geminadas do vírus do mosaico amarelo do tomateiro (VMDT).

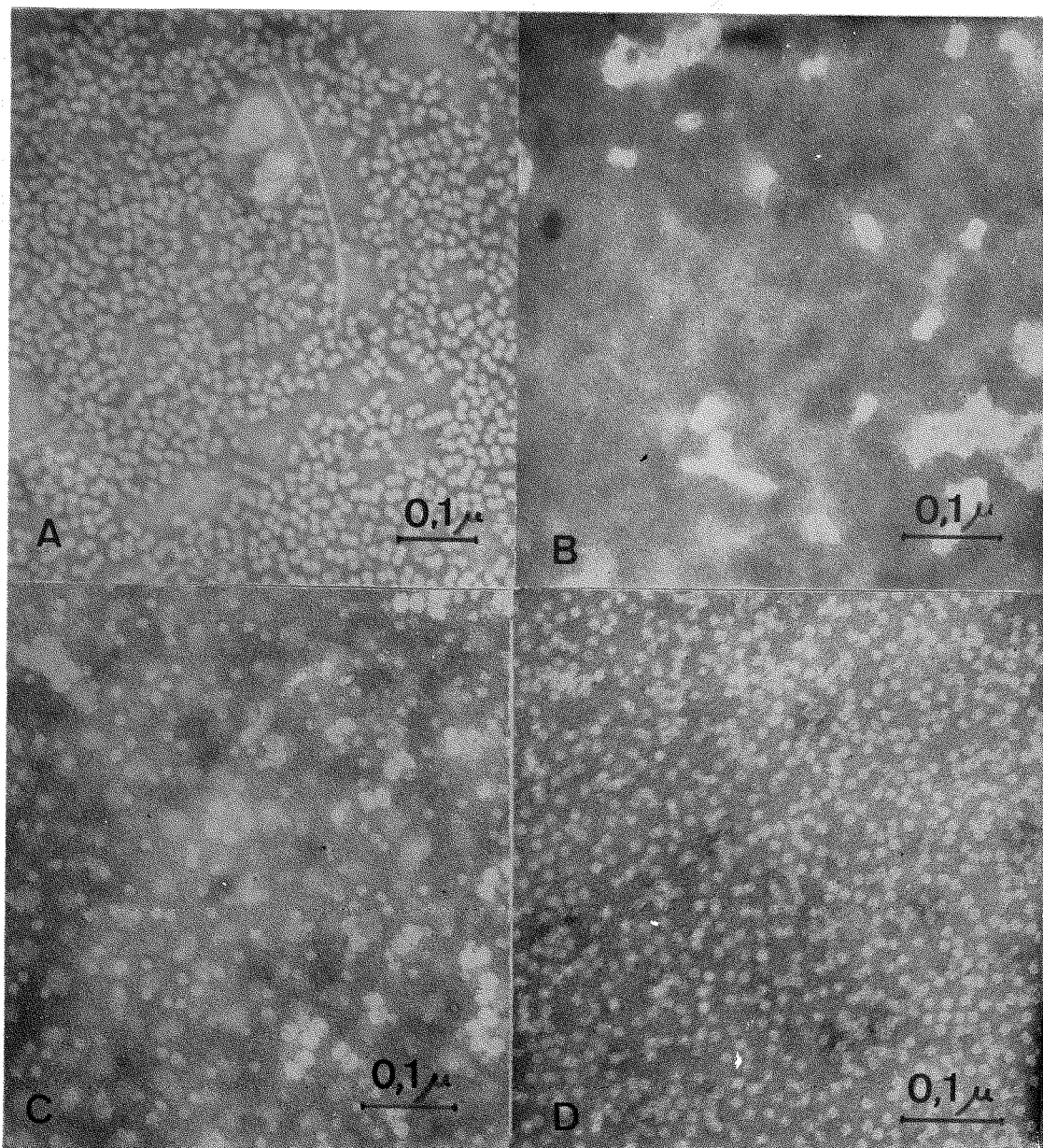


FIGURA IV - Purificação do VMDT a partir dos seguintes hospedeiros: A - *N. glutinosa*; B - *N. tabacum*; C - *D. stramonium*; D - *P. floridana*.

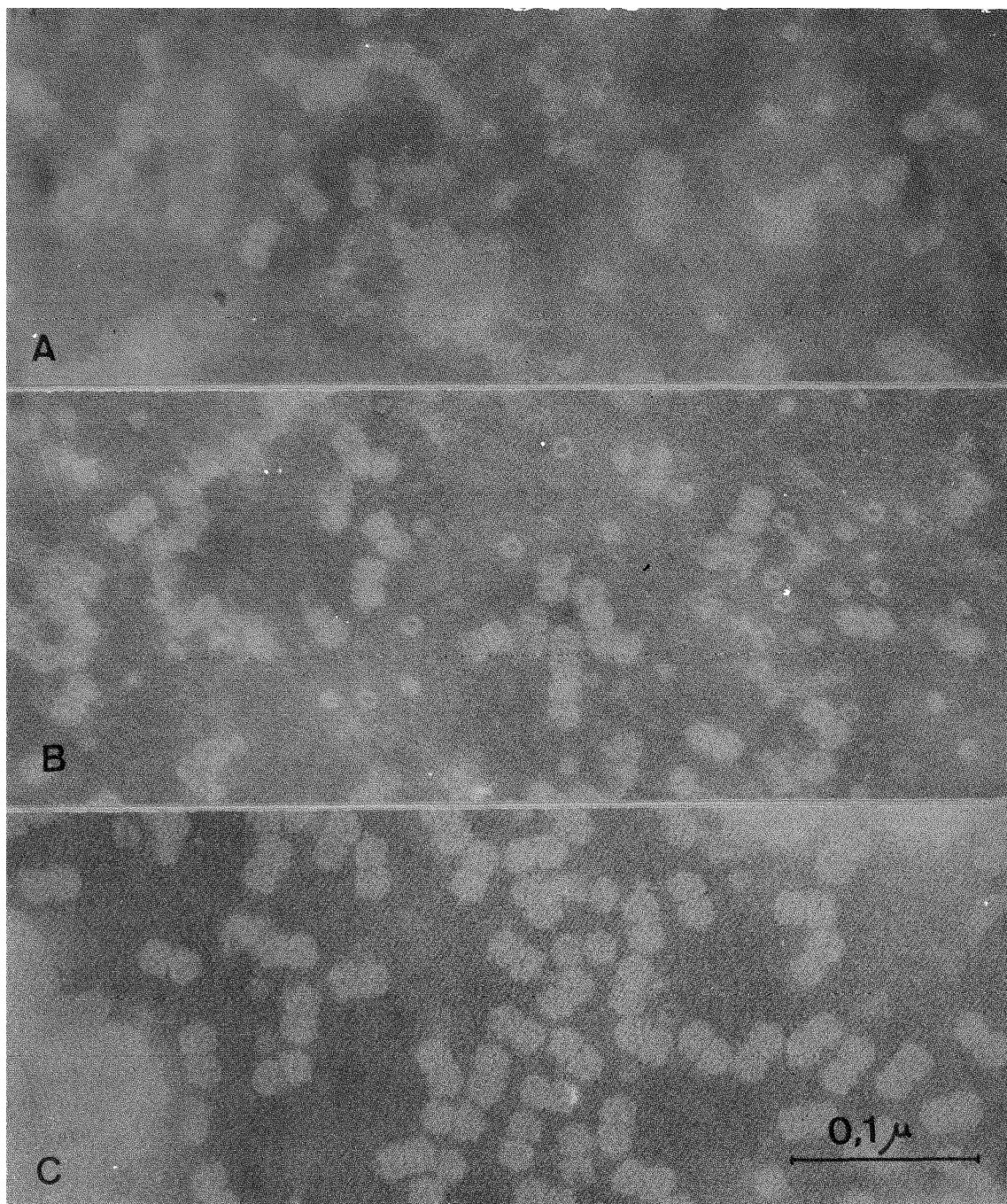


FIGURA V – Purificação com éter-tetracloro de carbono (tampão solução B, pH 7,0, 0,01 M) do VMDT:  
A-P<sub>3</sub>; B-P<sub>4</sub>; C-Gradiente.

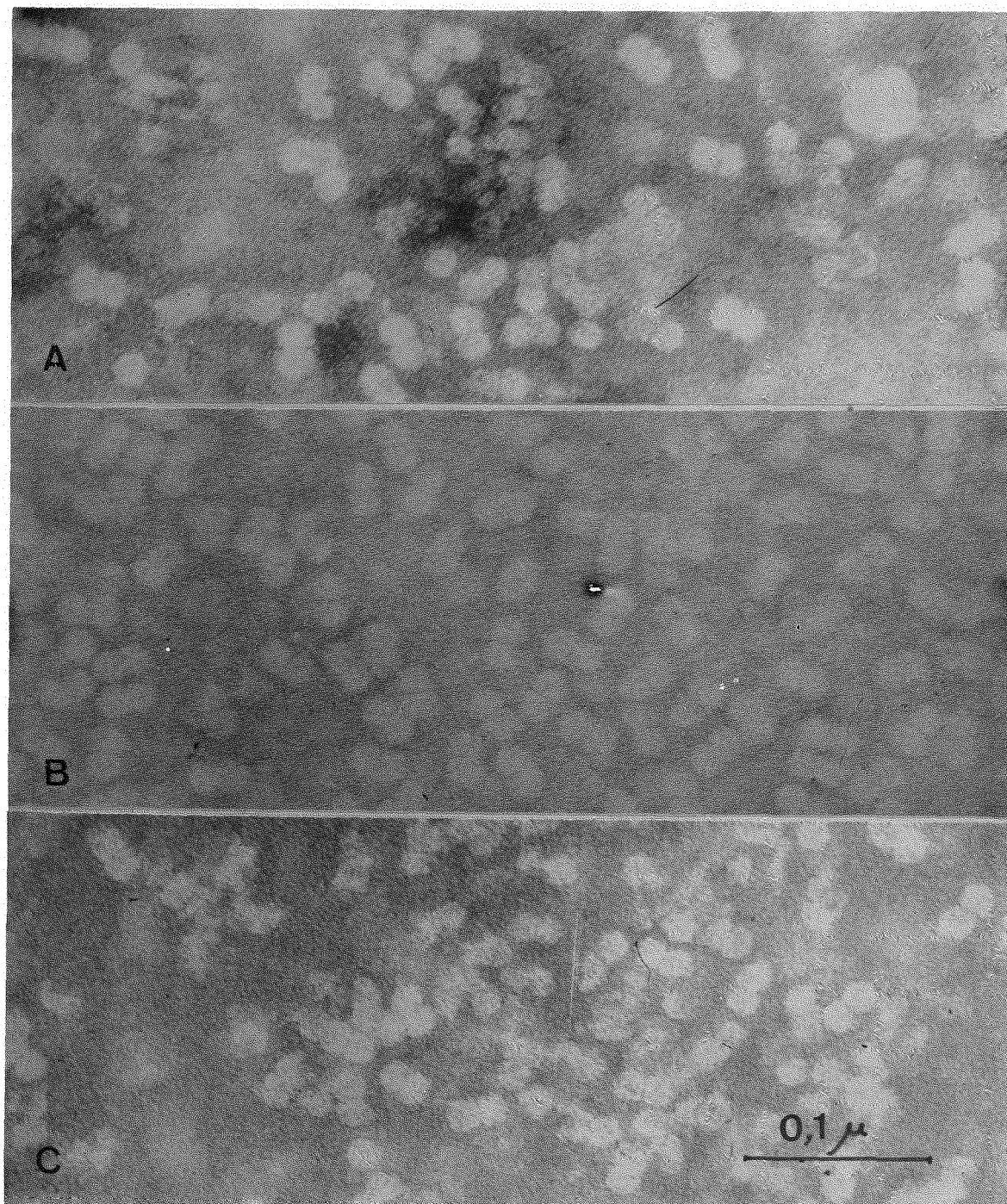


FIGURA VI – Purificação com butanol-PEG-NaCl (tampão solução B, pH 7,0, 0,01M) do VMDT: A-LS<sub>6</sub>; B-Gradiente; C-P<sub>7</sub>.

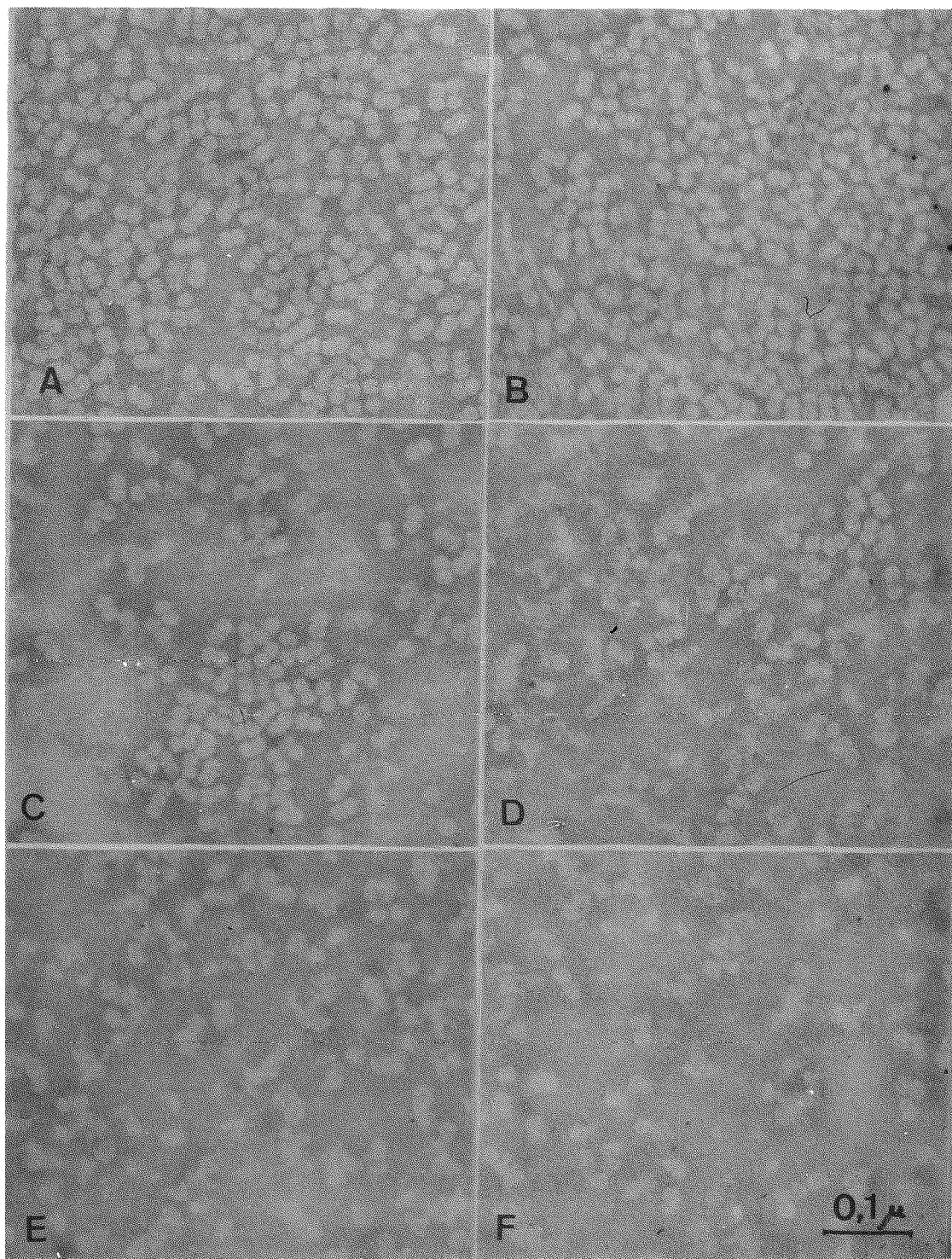


FIGURA VII - Efeito dos vários valores de pH na morfologia das partículas do VMDT: A - pH 4,0; B - pH 5,0; C - pH 6,0; D - pH 7,0; E - pH 8,0; F - pH 9,0.



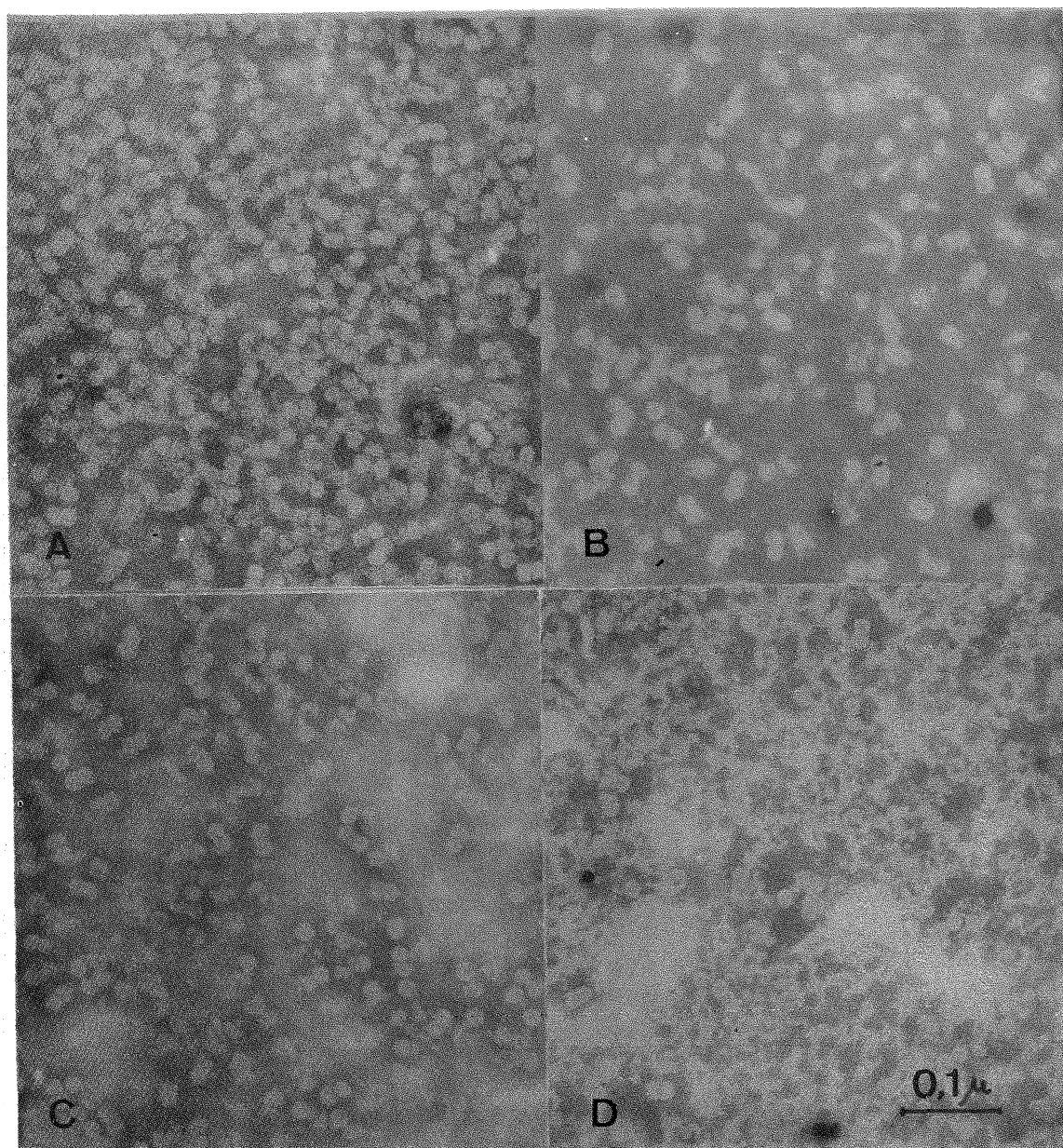


FIGURA VIII – Efeito de concentração de EDTA na morfologia das partículas do VMDT: A – sem EDTA; B – 0,0001 M; C – 0,001 M; D – 0,01 M.

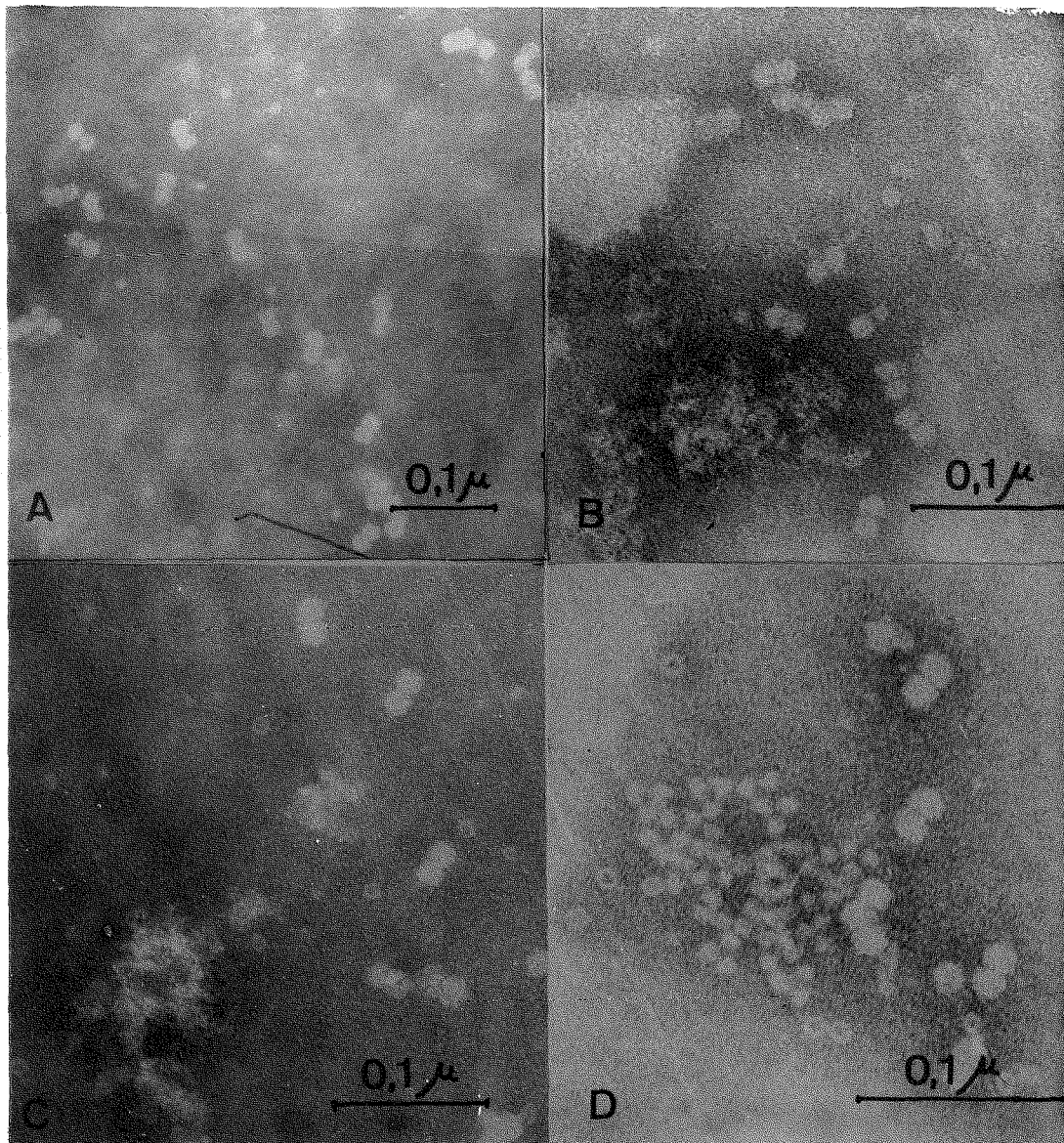


FIGURA IX - Morfologia dos diversos vírus do grupo transmitidos por "mosca-branca": A - VMDT; B - VMDT-N; C - VME; D - VMDF.

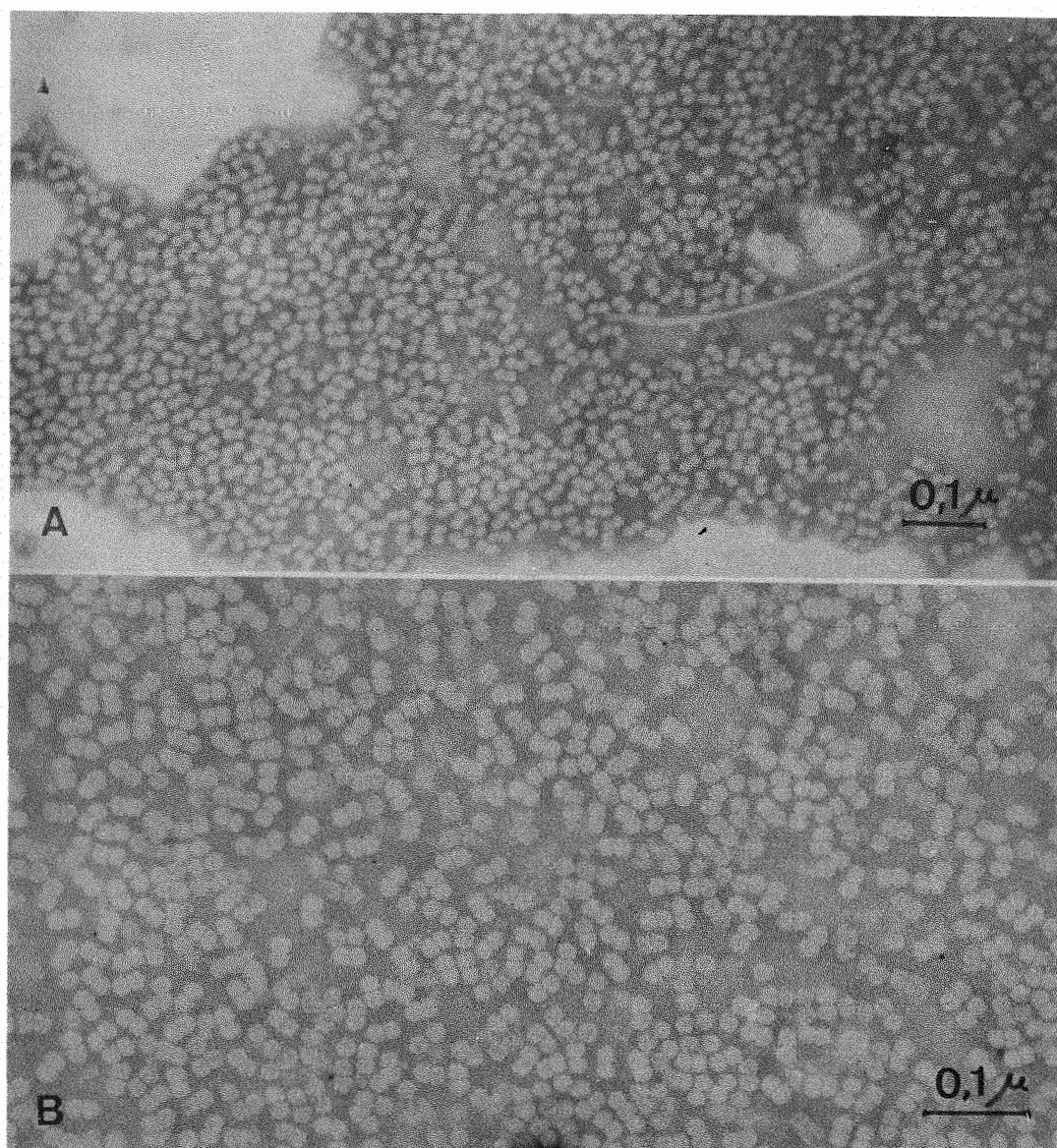


FIGURA X – A purificação do VMDT em sistema éter-tetracloro de carbono. B – purificação do VMDT com butanol-PEG-NaCl.

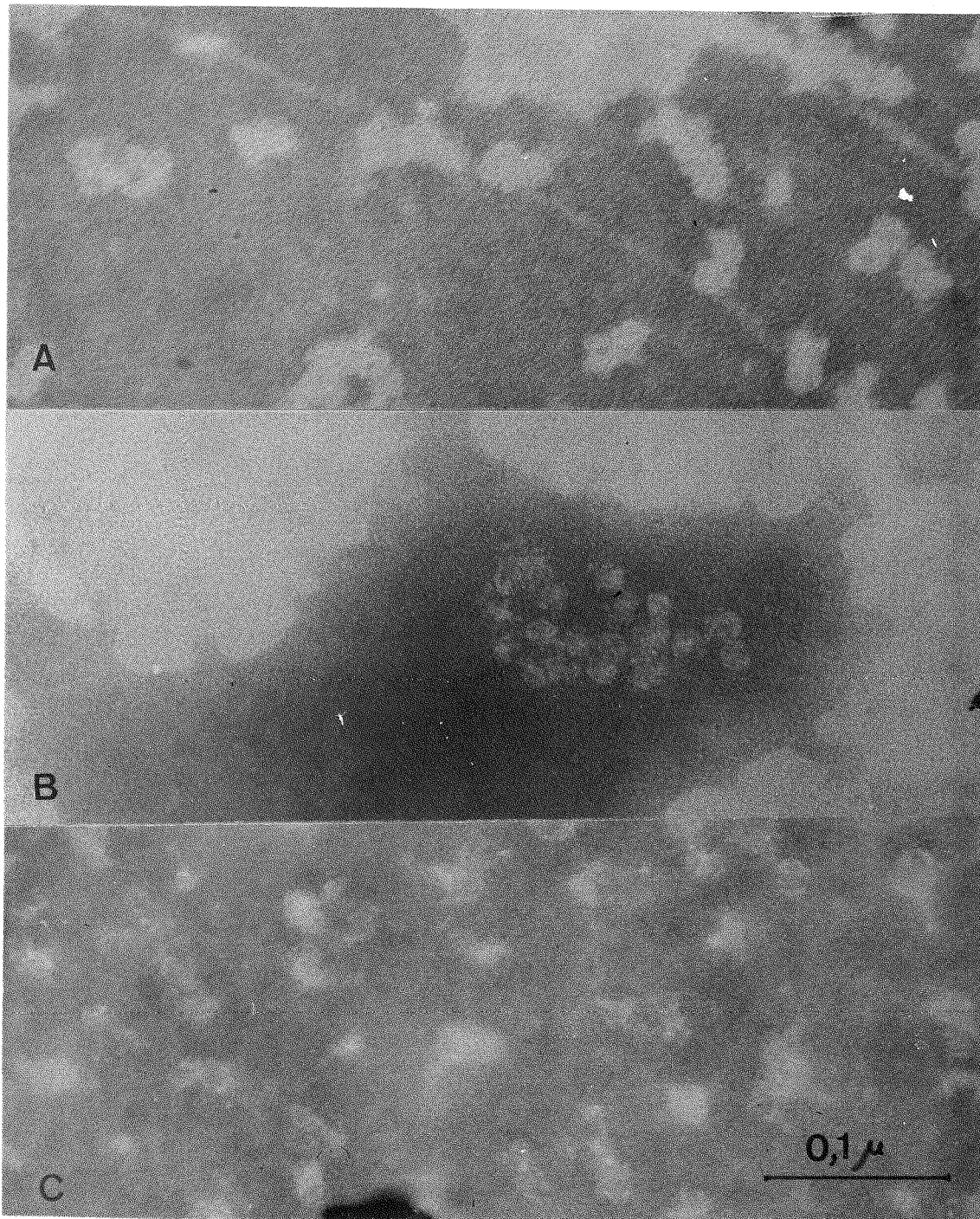


FIGURA XI - Purificação com butanol-PEG-NaCl (tampão solução B, pH 7,5, 0,01 M) do VMDT, A-LS<sub>6</sub>; B-Gradiente; C-P<sub>7</sub>.

## 6 - DISCUSSÃO

O material vegetal utilizado para a purificação foi em geral o de plantas vigorosas e folhas novas com intensos sintomas. Contudo, em algumas circunstâncias, o aproveitamento de material menos adequado ao processamento em questão veio mostrar que a obtenção de boas preparações purificadas era mais crítico para o VME e VMDF do que para o VMDT.

*N. glutinosa* revelou-se excelente fonte de vírus para a purificação tanto de VMDT como para o VMDT - N devido a eliminação mais fácil dos pigmentos e outros materiais, pelo tratamento com solventes orgânicos. As impurezas do extrato de *N. tabacum* e *D. stramonium* submetidas a idêntico tratamento eram bem mais difíceis de serem eliminadas (Figura IV).

Para o VME o hospedeiro que melhor resultado apresentou foi *E. prunifolia*, provavelmente devido a maior concentração do vírus nesta planta. Para a purificação do VMDF só se utilizou o *P. vulgaris*, que, a julgar pela sintomatologia, parece ser uma fonte com alta concentração de vírus.

Utilizando-se vários métodos de purificação podemos considerar o VMDT e o VMDT - N como os vírus mais estáveis dentre os purificados, do mesmo grupo. Graças a essa maior estabilidade foi possível testar o efeito dos tratamentos nas várias fases da purificação do VMDT, permitindo assim escolher o método de purificação mais adequado. O mesmo não se pode dizer com relação ao VME, apesar de ser transmissível mecanicamente. As preparações purificadas de VME quando observadas ao ME revelaram bem menor concentração de partículas geminadas do que VMDT. Quanto ao VMDF, sua observação ao ME revelou baixíssima concentração de vírus e, até o momento, não foi possível transmitir mecanicamente nenhuma das frações amostradas durante as várias etapas da purificação.

Quanto aos processos de purificações utilizados, constatamos que os métodos I e III permitiram purificar o VMDT e VMDT - N. Comparando-se as variantes dos métodos I, observou-se que a purificação com duas ultracentrifugações apenas não era tão eficiente como aquela em que os extratos após uma ultracentrifugação diferencial eram submetidos a uma alta centrifugação em gradiente de densidade. Por este meio obtive -

ram-se frações de virus livres dos contaminantes de densidades diferentes. Notou-se também que pelo método I, os virus eram mais denaturados sacrificando de certa forma o rendimento da preparação. Pela utilização do método II a quantidade de impurezas existente na preparação final tornou-se bastante elevada, pois a não utilização de solventes orgânicos propiciou a ocorrência de grande quantidade de partículas de densidade semelhante ao do virus, dificultando a separação do mesmo pelo gradiente de densidade. O método III se revelou bastante eficiente quanto à separação das partículas de virus dos demais componentes do extrato da planta, conseguindo-se dessa maneira grande concentração das partículas geminadas, especialmente quando a solução tampão era a solução A mais 2-mercaptoetanol a 1% (Figura X). Utilizando-se essa mesma metodologia, GALVEZ (1975) conseguiu, na Colômbia, visualizar partículas do VMDF. Na sua metodologia a fonte de virus utilizada foi *P. vulgaris*, utilizando-se no processo uma solução tampão de fosfato a 0,1 M e pH 7,5 com 2-mercaptoetanol a 1%. Para o VMDT esse pH não foi adequado (Figura XI), como se pode observar pelas alterações morfológicas que o mesmo provoca. A julgar pela morfologia e outras propriedades, os melhores resultados foram obtidos com solução A mantida a pH 7,0 e a 0,01 M contendo 2-mercaptoetanol a 1% (Figura X).

Os resultados das várias purificações iniciadas com éter-tetracloro quando comparados com os das tratadas com

PEG-NaCl mostraram que este tratamento é mais eficiente. Com este processo obtiveram-se preparações de VMDT e VMDT - N bem mais concentradas, notando-se também aumento sensível na concentração de VME.

A morfologia dos virus em questão sem dúvida é bastante singular, tendo sido relatadas até o momento poucas espécies de virus com a mesma conformação. Estruturas similares a essas foram encontradas por BOCK (1974) para "cassava latent virus", "maize streak virus", "beet curly top virus" e "bean summer death virus", virus estes não transmissíveis pela "mosca branca". Galvez, na Colômbia, após purificação do VMDT por MATYIS *et alii* (1975), visualizou partículas geminadas de VMDF contudo, o virus purificado apresenta algumas características diferentes do VMDF encontrado no Brasil, principalmente no que se refere ao comportamento de diversos valores de pH e a transmissão mecânica dos mesmos. SILVESTER (1973) encontrou em secções ultrafinas de folhas de milho infectadas com "maize streak virus" pequenas partículas duplas com diâmetro ao redor de 18 - 20 nm, localizadas apenas no núcleo. PLAVIC-BAJAC e MARAMOROSCH (1972) também encontraram no núcleo o mesmo tipo de morfologia em plantas de milho com "maize streak virus" coletadas na África.

SHARP e WOLF (1951), trabalhando com o vírus "Leaf curl" do fumo, transmissível por "mosca branca", relataram a ocorrência de partículas esféricas de 39 nm associada à doen-



ça e sugeriram que devido aos tratamentos podiam perder sua conformação esférica, apresentando um estrangulamento. Pela observação da fotografia de SHARP e WOLF (1951) o estrangulamento considerado como anormal é atualmente interpretado como o ponto de união das partículas geminadas, tal como se observa nas partículas das preparações do VMDT purificadas em nosso laboratório.

Quanto à utilização da coluna de gradiente de densidade de sacarose, a sua eficiência foi dependente dos tratamentos da pré-purificação. Os resultados com o gradiente de densidade pelo método II foram apenas razoáveis devido a não eliminação de grande quantidade de impurezas que se comportavam semelhantemente aos virus, na ultracentrifugação em gradiente, prejudicando a eficiência da purificação. Os tratamentos pelo método I e III foram mais eficientes principalmente com respeito à produção de partículas de virus e ao grau de pureza.

Com respeito ao efeito do pH sobre as dimensões das partículas do VMDT foi observado que a pH 5,0 as partículas a apresentam menor tamanho e aparecem bem estruturadas ao ME.

Nos valores de pH 4,0 e acima de 5,0 notou-se uma tendência gradativa de desorganização das partículas, atingindo ao total em pH maior que 8,0.

Comparações através do teste Tukey, as dimensões nos vários níveis de pH mostraram que as partículas de VMDT

a pH 6,0 apresenta diferença significativa em relação às do pH 7,0 , a nível de 5% de probabilidade e as dimensões das partículas em pH 5,0 e 7,0 a diferença foi a nível de 1% de probabilidade.

Esse aspecto sugere estudos futuros com respeito às forças que mantêm a organização das subunidades das partículas que em outros virus ora é devido principalmente à ligação do ácido nucléico e proteína, ora é devido às forças de ligações entre subunidades protéicas.

Como se pode observar na Figura II , a dimensão das partículas é uma função do pH e atinge um mínimo ao redor do pH 5,0 , podendo estar relacionado com o grupamento carboxílico, conforme foi encontrado para outros virus.

Com relação ao efeito da concentração de EDTA nas dimensões das partículas de virus, a determinação do teste Tukey indica diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade entre o tratamento sem EDTA e com EDTA 0,0001 M e 0,001 M , sendo que na concentração de 0,01 M houve quase que uma desintegração total das partículas geminadas. Esses resultados estão coincidentes com os obtidos por BOCH (1974) com "Maize streak virus", apesar de não ser do mesmo grupo dos transmitidos por "mosca branca", e diferem dos obtidos por GALVES (1975) com virus do mosaico dourado do feijoeiro, este pertencente ao grupo do VMDT.

Os resultados dos testes com orcinol foram positivos. Contudo, levando-se em conta que o processo de purificação desses virus foi realizado com um mínimo de operações torna-se difícil afirmar com segurança se o VMDF, sua estirpe e dos demais são virus do tipo RNA. Trabalhos posteriores deverão ser realizados afim de esclarecer a natureza do ácido nucléico viral, pois virus semelhantes aos estudados nesta Dissertação como o "maize streak virus" (MSV) e "cassava latent virus" (CLV) foram relatados por BOCK *et alii* (1977) como possuindo RNA. Contudo, GOODMAN (1977) comenta que Harrison demonstrou que MSV e CLV possuem DNA como ácido nucléico e segundo o mesmo autor o VMDF de Porto Rico apresenta também DNA. ALONSO (1977) determinou a presença de DNA em preparação purificadas do VMDF da Colômbia.

## 7 - CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos neste trabalho podemos tirar as seguintes conclusões:

- 7.1 - Dos métodos de purificação utilizados o que melhor se apresentou foi o do n-Butanol-PEG-NaCl, denominado Método III e a sua eficiência foi maior com o VMDT, VMDT-N, e menor com o VME e VMDF.
- 7.2 - Dentre as fontes de inóculo utilizadas as que se mostraram melhores para o processo de purificação do VMDT e VMDT - N foi *N. glutinosa*, e para o VME, *E. pronifolia*. A única fonte de inóculo de VMDF foi *P. vulgaris*.

- 7.3 - A morfologia dos virus do grupo estudado é semelhante e apresentou-se como duas partículas isométricas geminadas com um comprimento total entre 25-30 nm em tampão fosfato a pH 7,0 e 0,01 M .
- 7.4 - A dimensão e a estruturação das partículas do VMDT revelaram-se altamente dependentes do pH do meio.
- 7.5 - A presença de EDTA no tampão de fosfato ao invés de separar as partículas geminadas do VMDT , provocou denaturação das mesmas nas concentrações de 0,0001 M e 0,001 M .

## 8 - SUMMARY

The results presented in this work are concerned with identification, morphology and some Bio-physico-chemical properties of three species of one group of viruses transmitted by *Bemisia tabaci* (Whitefly).

The studied viruses were: Tomato golden mosaic virus (VMDT) and one strain (VMDT-N), Euphorbia mosaic virus (VME) and the bean golden mosaic virus (VMDF), each one with large distribution and economic importance in some cultivated areas.

In this work were used several virus hosts: *Nicotiana glutinosa* L. , *Nicotiana tabacum* L. , *Datura stramonium* L. and *Physalis floridana* Rydberg infected with VMDT and

VMDT-N . *Nicotiana glutinosa* L. , *Datura stramonium* L. and *Euphorbia prunifolia* Jacq infected with VME. *Phaseolus vulgaris* L. infected with VMDF.

The leaves of healthy and diseased plants were treated with liquid nitrogen and the powder obtained was suspended in sodium phosphate buffer at pH 7.0 , 0,01 M and 2 mercapto - ethanol at 1% . The clarification of the plant extract was made with n-butanol at 7% and the virus purification was achieved by previous treatment with PEG-NaCl (6 and 1%) followed by differential and by sucrose gradient ultracentrifugations.

The morphology of the studied viruses is the same for the three species, exhibiting siamese twin , isometric particles, the individual components being 13 - 15 nm in diameter.

Several EDTA concentrations and pH were not able to cause separation of the siamese twin particles but provoked alterations in the particles diameter.

The purified preparations reacted positively with orcinol.

## 9 - LITERATURA CITADA

- ALONSO, M. R. C., 1977. Estudios sobre el virus del mosaico dorado del frisol. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia, 80 p. (Tesis de grado-magister scientiae).
- BEST, R. J. e B. A. PALK, 1964. Electron microscopy of strain E of tomato spotted wilt virus and coments on its provable biosynthesis. Virology, 23: 445-460.
- BIRD, J., 1975. Mosaico de *Euphorbia prunifolia* Jac. en Puerto Rico, Transmission, hospedera y etiologia. In: XXI Reunion Anual del PCCMCA, San Salvador, p. 233-234.
- BOCK, K. R. ; E. J. GUTHRIER e R. D. WOOD, 1974. Purification of maize streak virus and its relationship to viruses associated with streak disease of sugar cana and *Panicum maximum*. Ann. Appl. Biol., 77: 289-296.



- BOCK, K. R. ; E. J. GUTHRIER e R. D. WOOD, 1975. Maize streak, cassava latent and similar viruses. In: III Intl. Congress Virology Abstracts, Madrid, p. 93.
- BOCK, K. R. ; E. J. GUTHRIER ; G. MEREDITH e H. BAKER, 1977. RNA and protein components of maize streak and cassava latent viruses. Ann. Appl. Biol., 85: 305-308.
- BRASSE, M. K., 1960. Density gradient centrifugation and its application to plant viruses. In: Advances in Virus Research., Vol. 7. Academic Press, New York. 193-222.
- BRENNER, S. e R. W. HORNER, 1958. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. Bioch. Bioph. Acta., 34: 103-110.
- BRITTEN, R. J. e R. B. ROBERTS, 1960. High resolution density gradient sedimentation analysis. Science, 131: 32-33.
- COSTA, A. S. e C. W. BENNETT, 1950. Whitefly transmitted mosaic of *Euphorbia prunifolia*. Phytopathology, 40: 266-283.
- COSTA, A. S., 1965. Three whitefly-transmitted virus disease of beans in São Paulo, Brasil. FAO Plant Protection Bull. 13: 1-12.
- COSTA, A. S., 1969. White flies as virus vectors. In: MARA MOROSCH, K. Coord. Viruses Vectors and Vegetation. Intercience, New York, p. 95-119.

- COSTA, A. S., 1974. Molestias do tomateiro no Brasil transmitidas pela mosca-branca *Bemisia tabaci*. In: VII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, Brasília (Sumário mimeografado).
- COSTA, A. S., 1975. Increase in populational density of *Bemisia tabaci* a threat of widespread virus infection of legumes crops in Brazil. In: BIRD, J. e K. MARAMORCH, Coord. Tropical Diseases of Legumes, New York, San Francisco & London: Academic. p. 27-50.
- DAVIS, R. E. e J. F. WORLEY, 1973. Spiroplasma: motile, helical microorganism associated whit corn stunt disease. Phytopathology, 63: 403-408.
- DIENER, T. O., 1974. Viroids: The smallest known agents of infestions disease. An. Rev. Microb., 28: 23-39.
- DOI, Y. ; M. TERANAKA ; K. YORA e H. HASUYAMA, 1967. Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phldem elements of plants infected whit mulberry dwarf, potato withches'broom. Ann. Phytopathology. Soc. Japan, 33: 259-266.
- FREIDMANN, T. M. H., 1970. Rapid concentration and purification of polyoma virus and SV 40 with polyethylene glycol. Virology, 42: 248-250.
- GALVEZ, G. E. e M. CASTAÑO, 1975. Purification of the white-fly-transmitted bean golden mosaic virus. Turrialba, 26 (2): 205-207.

GILLASPIE, Jr. A. G. ; R. E. DAVIS e J. F. WORLEY, 1973.

Diagnosis of ratton stunting disease based on the presence of a specific microorganism. Plant Disease Reporter, 57: 987-990.

GOODING, G. V. e T. T. HEBERT Jr., 1967. A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities. Phytopathology, 57: 1.285.

GOODMAN, R. M., 1977. Single-stranded DNA genome in a whitefly-transmitted plant virus. Virology, 83: 171-179.

GOODMAN, R. M., 1977. Infections DNA from a whitefly-transmitted virus of *Phaseolus vulgaris*. Nature, 266: 54-55.

GOODMAN, R. M. ; J. BIRD e P. THONGMEEARKOM, 1977. An unusual virus-like particle associated with golden yellow mosaic of bean. Phytopathology, 67: 37-42.

HALL, C. E. ; M. E. JAKUS e E. O. SCHMITT, 1945. The structure of certain muscle fibrils as revealed by the use of electron stain. J. Appl. Phys., 16: 459-465.

HSU, H. T. e L. M. BLACK, 1973. Polyethyleng glycol for purification of potato yellow dwarf virus. Phytopathology, 63: 692.

KITAJIMA, E. W. e A. S. COSTA, 1974. Microscopia eletrônica de tecidos foliares de plantas afetadas por virus transmitidos por mosca-branca. In: VII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Fitopatologia (Sumário mimeografado).

- MARAMOROSCH, K. ; B. PLAVIC-BAJAC ; J. BIRD e L. J. LIU, 1972. Electron microscopy of ratoon stunted sugar cane: microorganisms in xylem. Phytopathology Z., 77: 270-273.
- MATYIS, J. C. ; D. M. SILVA ; A. R. OLIVEIRA e A. S. COSTA, 1975. Purificação e morfologia dos virus do mosaico dourado do tomateiro. Summa Phytopathologica, 1(4): 267-274.
- NOORDAN, D., 1973. Identification of plant viruses. Methods & Experiments. Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen. Netherlands. 207 p.
- PLAVIC-BAJAC, B. e K. MARAMOROSCH, 1972. Electron microscopy and Africa maize streak (Abstract). Phytopathology, 62: 671.
- SANTANDER, R. G., 1969. Técnicas de microscopia eletrônica em biologia. Madri. Aguilar S. A. Ediciones. 666 p.
- SHARP, D. G. e F. A. WOLF, 1949. The virus of tobacco leaf curl I. Phytopathology, 39: 225-230.
- SHARP, D. G. e F. A. WOLF, 1951. The virus of tobacco leaf curl II. Phytopathology, 41: 94-98.
- SILVESTER, E. S. ; J. RICHARDSON e J. L. NICKEL, 1973. An additional note on viruslike particles associated with maize streak disease. Plant Disease Reporter, 54: 414-416.
- SUN, C. N., 1964. Das auftreten von viruspartikeln in abutilon chloroplasten. Experientia, 20: 497.

TSAU, P. W., 1963. Intranuclear inclusions bodies in the leaves of cotton plants infected with leaf crumple virus. Phytopathology, 53: 243-244.

VARMA, P. M., 1963. Transmission of plant viruses by white - flies. Nat. Inst. Sci. India Bull., 24: 11-23.