

**EFEITO QUIMIOTERAPÊUTICO DO NUCLEOSÍDEO SINTÉTICO VIRAZOLE (1 -  $\beta$  - D - RIBOFURANOSYL - 1, 2, 4 - TRIAZOLE - 3 - CARBOXAMIDE) SOBRE OS VÍRUS DO MOSAICO DO FUMO (TMV), DO MOSAICO AMARELO DO FEIJOEIRO, ISOLADO PIRACICABA (VMAF-P) E DO MOSAICO DA *Uigna***

*Dablo Guzmán Vargas*

Orientador: *Darcy Martins da Silva*

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

PIRACICABA  
Estado de São Paulo - Brasil  
Novembro, 1980

Ao país que nos acolheu e deu  
uma oportunidade

BRASIL.

A aquilo que eu tenho de co-  
varde.

A minha primeira filha brasi-  
leira e seu sangue latino

MARTA HELENA.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

O autor expressa seus agradecimentos às instituições e pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho com seu apoio econômico, moral e espiritual, sua amizade seus conselhos e sua companhia, sendo todas, portanto, de igual importância:

Aos professores Drs: Ferdinando Galli, Darcy Martins da Silva, Eurípedes Malavolta, Hiroshi Kimati, Tasso Leo Krugner, Eric Balmer, Caio Cardoso, Hasime Tokeshi, Elke E. Nogueira Cardoso, Armando Bergamin Filho, Paulo Torres Campos Carvalho, Clelio Lima Salgado, Neusa Lima Nogueira, Augusto Tulmann Neto, Álvaro Santos Costa, Guillermo Edmundo Galvez, Claudio Lucio Costa.

A Irene Maria Gatti de Almeida, Ilza Maria Sittolin, Maria das Graças Ongerelli, Clarice de Oliveira, José Elias Gomes, Gilberto Lage, Lázaro A. Estoque, João Roberto Groppo, Luiz Carlos Veríssimo, Eurice Amaral Mello, Antonio Vitti, José Rodolfo Groppo, Marta Lucia Taglatti, Marta Rodolfo.

A Marta Lucia Pinzón de Guzmán, Julio Guzmán Nuñez, Helena Vargas de Guzmán, Eudoro Vargas Montoya, Hernán Ramirez, Socorro de Ramirez, Antonio Beltran, Luis Eduardo Morales, Maureen Kennedy de Morales, Gonzalo Bastidas, Gilma Daste de Bastidas, Rosa Maria Valdebenito, Marcos Almazan, Jairo Jimenez, Gladys de Jimenez, Norberto Marroquin.

A José Otávio Menten, Lindáurea Alves de Souza, Amancio Pre-  
sotto, Cecilia Danelon, Vicente Janori, Isokazu Kon, Ni-  
valdo Guirado, Walter Pereira, Jorge Luiz Diorio.

A Maria Angelica Pizzinato Geraldi, Elizabeth Aparecida Bap-  
tista e demais colegas do curso.

Ao pessoal da Secretaria de Pós-Graduação Dirce Alessi Pere-  
grino, Luzia Arana, Edilma Aparecida Bueno de Camargo Or-  
tolan, Marisa Rodrigues de Camargo e Silvia Denise de Frei-  
tas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnoló-  
gico (CNPq).

A Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ).

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA).

## ÍNDICE

	Página
RESUMO .....	xii
SUMMARY .....	xiv
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	04
2.1. Dos vírus .....	04
2.1.1. Vírus do mosaico do fumo (TMV) .....	04
2.1.2. Vírus do mosaico amarelo do feijoeiro, isolado Piracicaba (VMAF-P) .....	05
2.1.3. Vírus mosaico da <i>Vigna</i> .....	06
2.2. Dos viricidas .....	07
2.2.1. Em seres humanos .....	07
2.2.2. Em animais .....	08
2.2.3. Em sistemas bactéria-bacteriófagos ..	09
2.2.4. Em plantas .....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	13
3.1. Hospedeiro e vírus utilizado .....	13
3.2. Preparo do inóculo e inoculação .....	13
3.3. Uso do viricida .....	15
3.3.1. Efeito de diferentes concentrações do Virazole sobre o vírus .....	15
3.3.2. Efeito do Virazole sobre diferentes concentrações dos vírus .....	16
3.3.3. Efeito dos locais de pulverização do produto.	16

3.3.4. Efeito de diferentes períodos de aplicação do produto .....	Pág 16
3.3.5. Teste de meia folha .....	17
3.4. Avaliação .....	19
4. RESULTADOS .....	20
4.1. Efeito sobre o TMV .....	20
4.1.1. Inóculo proveniente de suco de folhas infectadas .....	20
4.1.2. Inóculo purificado por centrifugação.	29
4.2. Vírus do mosaico amarelo do feijoeiro, isolado do Piracicaba (VMAF-P) .....	32
4.3. Efeito sobre o mosaico da <i>Vigna</i> .....	35
5. DISCUSSÃO .....	39
6. CONCLUSÕES .....	45
7. LITERATURA CITADA .....	47
APÊNDICE .....	51

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
01. Efeito fitotóxico do Virazole aplicado em diferentes dosagens no <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (Cv. Chumbinho Opacó). (A). Vista geral do ensaio mostrando a diferença entre as plantas tratadas e não tratadas. (B). Efeito das diferentes dosagens nas folhas apicais .....	22

## LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
01 - Cultivares de feijoeiro e vírus que as infectam causando lesões locais cloróticas ou necróticas.	14
02 - Efeito de diferentes dosagens do Virazole sobre o vírus TMV inoculado em <i>P. vulgaris</i> (Cv. Chumbinho Opaco). Inóculo proveniente de suco de folhas .....	21
03 - Efeito do Virazole (0.5 mg/ml) sobre diferentes concentrações do vírus TMV inoculado em <i>P. vulgaris</i> (Cv. Chumbinho Opaco). Inóculo proveniente de suco de folhas .....	24
04 - Efeito do local de aplicação do Virazole (0.5 mg/ml) sobre o vírus TMV inoculado em <i>P. vulgaris</i> (Cv. Chumbinho Opaco). Inóculo proveniente de suco de folhas .....	25
05 - Efeito de diferentes períodos de aplicação do Virazole (0.5 mg/ml) sobre o vírus TMV inoculado em <i>P. vulgaris</i> (Cv. Chumbinho Opaco). Inóculo proveniente de suco de folhas .....	27
06 - Efeito do Virazole (0.5 mg/ml) sobre o vírus TMV inoculado em <i>P. vulgaris</i> (Cv. Chumbinho Opaco). Teste de meia folha. Inóculo proveniente de suco de folhas .....	28



Tabela	Página
07 - Efeito de diferentes dosagens do Virazole sobre o vírus TMV inoculado em <i>P. vulgaris</i> (Cv. Chumbinho Opaco). Inóculo purificado por centrifugação .....	30
08 - Efeito do local de aplicação do Virazole (0.5 mg/ml) sobre o vírus TMV inoculado em <i>P. vulgaris</i> (Cv. Chumbinho Opaco). Inóculo purificado por centrifugação .....	31
09 - Efeito do Virazole (0.5 mg/ml) sobre o vírus TMV inoculado em <i>P. vulgaris</i> (Cv. Chumbinho Opaco). Teste de meia folha. Inóculo purificado por centrifugação .....	33
10 - Efeito de diferentes períodos de aplicação do Virazole (0.5 mg/ml) sobre o vírus do mosaico amarelo do feijoeiro, isolado Piracicaba (VMAF-P) inoculado em <i>P. vulgaris</i> (Cv. Jalo) .....	34
11 - Efeito de diferentes concentrações de Virazole aplicado em períodos diferentes sobre o vírus do mosaico amarelo do feijoeiro, isolado Piracicaba (VMAF-P), inoculado em <i>P. vulgaris</i> (Cv. Jalo) ..	36
12 - Efeito do Virazole (0.5 mg/ml) sobre diferentes concentrações do vírus do mosaico da <i>Vigna</i> inoculado em <i>P. vulgaris</i> (Cv. Carioca) .....	37
13 - Efeito do Virazole (0.5 mg/ml) sobre o número de	

Tabela	Página
lesões produzidas em <i>P. vulgaris</i> (Cv. Chumbinho Opaco) inoculado com o vírus do Mosaico do fumo (TMV) .....	52
14 - Efeito do Virazole (0.5 mg/ml) sobre o diâmetro das lesões produzidas em <i>P. vulgaris</i> (Cv. Chumbinho Opaco). Inoculado com o vírus do mosaico do fumo (TMV) .....	53
15 - Efeito do Virazole (0.5 mg/ml) sobre as áreas foliares de <i>P. vulgaris</i> (Cv. Chumbinho Opaco). Inoculado com o vírus do mosaico do fumo (TMV) .....	54
16 - Efeito do Virazole (0.5 mg/ml) sobre a área afetada pelas lesões produzidas em <i>P. vulgaris</i> (Cv. Chumbinho Opaco) inoculado com o vírus do mosaico do fumo (TMV). .....	55
17 - Efeito do Virazole (0.5 mg/ml) sobre a área das lesões produzidas em <i>P. vulgaris</i> (Cv. Chumbinho Opaco) inoculado com o vírus do mosaico do fumo (TMV) .....	56
18 - Efeito do Virazole (0.5 mg/ml) sobre a densidade das lesões produzidas em <i>P. vulgaris</i> (Cv. Chumbinho Opaco) inoculado com o vírus do mosaico do fumo (TMV) .....	57

Tabela	Página
19 - Efeito do Virazole (0.5 mg/ml) sobre o valor densidade x Área das lesões produzidas em <i>P. vulgaris</i> (Cv. Chumbinho Opaco), inoculado com o vírus do mosaico do fumo (TMV).....	58

## RESUMO

No presente trabalho, foram feitos estudos visando comprovar a ação fitoviricida do nucleosídeo sintético Virazole (1- $\beta$ -D-ribofurasonyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide), utilizando plantas de diferentes cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) que reagem à inoculação com os vírus, produzindo lesões locais.

As inoculações foram feitas com o vírus do mosaico do fumo (TMV) obtido de suco de folhas doentes e preparações purificadas; com o vírus do mosaico amarelo do feijoeiro, isolado Piracicaba (VMAF-P) e com o vírus do mosaico da *Vigna*.

Os ensaios foram feitos procurando-se estabelecer:

- (a) a concentração mais adequada do viricida;
- (b) o efeito do viricida sobre diferentes concentrações do vírus;
- (c) a melhor época de aplicação do viricida;

(d) a influência do local de aplicação do viricida no controle dos vírus.

O efeito do viricida foi avaliado através da redução no número de lesões locais produzidas e o tamanho das mesmas.

Pelos resultados obtidos pode-se considerar que o produto tem ação fitoviricida pois reduziu, na maioria dos casos, o número e o diâmetro das lesões locais. Contudo, não foi possível afirmar que houve controle total na infecção causada pelos vírus.

O Virazole mostrou ação aparentemente preventiva da infecção dos vírus TMV e VMAF-P. Seu efeito não foi influenciado pelo local de aplicação. O produto foi mais eficaz quando aplicado numa área maior.

O Virazole, em concentrações acima de 0.25 mg/ml produziu efeitos fitotóxicos em plantas de feijoeiro. O sintoma característico desta fitotoxidez foi o amarelecimento das folhas apicais, que entretanto desapareceu 3 a 5 dias depois. Este efeito variou em intensidade segundo o cultivar utilizado.

Dosagens iguais ou superiores a 1.0 mg/ml afetaram o desenvolvimento das plantas de feijoeiro.

ANTIVIRAL EFFECT OF THE SYNTHETIC NUCLEOTIDE VIRAZOLE  
(1- $\beta$ -D-RIBOFURANOSYL-1,2,4-TRIAZOLE-3-CARBOXAMIDE) ON THE  
TOBACCO MOSAIC VIRUS (TMV), BEAN YELLOW MOSAIC VIRUS,  
PIRACICABAN ISOLATE (VMAF-P) AND COWPEA MOSAIC VIRUS.

By: Pablo Guzmán Vargas

Adviser: Darcy Martins da Silva

## SUMMARY

The present work was carried out to verify the antiviral action of the synthetic nucleotide Virazole (1- $\beta$ -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide), using different bean's cultivar (*Phaseolus vulgaris* L.) that react to virus inoculation forming local lesions.

The inoculation were made with the following viruses: Tobacco mosaic virus (TMV) obtained from juice of infected leaves and purified preparations; Bean yellow mosaic virus, Piracicaban isolate (VMAF-P) and Cowpea mosaic virus.

The objectives of the trials were to determine:

- (a) the best concentration of the viricide;
- (b) the viricide's effect on different concentrations of virus;
- (c) the best time for application of the viricide;
- (d) the influence of the site of the application of the viricide on the virus.

The viricide's effect was evaluated by counting the number of local lesion produced and the size of them.

The results obtained may indicate that the product has antiviral action, as in most cases it reduced local lesions numbers and the size of them. However, it was not possible to show the existence of a total control of infection caused by plant virus.

The Virazole showed a preventive effect of infection by TMV and VMAF-P virus. The effect was not influenced by the site of application. The product was more efficient when applied in a greater leave's area.

The Virazole, in concentrations above 0.25mg/ml produced phytotoxic effect to bean plant. The characteristic symptoms were yellowing of apical leaves, which disappeared 3 to 5 days after. That effect varied in intensity according to the bean's cultivar plant used.

Rates equal or greater than 1.0 mg/ml affect the growth of bean plants.

## 1. INTRODUÇÃO

"A era dos compostos antivirais está começando. Os novos compostos prometem evolucionar o tratamento das doenças virais na década 1970-1980. Pela primeira vez o homem será capaz de combater as infecções virais detendo a replicação dos vírus e prevenindo sua disseminação"(MAUGH,1976).

As doenças viróticas das plantas cultivadas são importantes na redução da qualidade e quantidade das diferentes culturas alimentícias e comerciais do mundo.

As medidas empregadas no controle das fitoviruses tem sido principalmente culturais como enxertia, "vacinação" com estirpes fracas dos vírus, "roguing", uso de semente "livre do vírus", controle do inseto vetor, bem como o uso de cultivares resistentes (quando for possível detectar genes de resistência) e em alguns casos, o emprego de aquecimento do material vegetal (termoterapia) visando a inativação do vírus.



O controle químico (quimioterapia) destas doenças torna-se difícil devido à íntima associação existente entre as células da planta e as partículas virais.

No início do desenvolvimento dos produtos quimioterapêuticos, pensou-se na impossibilidade de se encontrar compostos com capacidade para interferir no ciclo dos vírus sem também matar as células do ser vivo tratado. Entretanto, pesquisas levadas a efeito utilizando tais substâncias tem mostrado a viabilidade prática deste método de controle.

Tentativas para o controle de doenças virais por quimioterapia tem sido feitas com algum sucesso em vírus que afetam seres humanos, animais, bactérias e plantas (OXFORD, 1975; SOARES et alii, 1980; SITTOLIN et alii, 1980; DE FAZIO et alii, 1978, 1979, 1980a, 1980b)

O controle quimioterapêutico dos vírus, apesar de não ser provavelmente o mais econômico na atualidade, surge como alternativa para aqueles casos onde nenhuma das medidas tradicionais tenha tido sucesso ou para ajudar a reforçar o efeito benéfico de alguma delas.

O objetivo desta pesquisa foi estudar o efeito viricida do nucleosídeo sintético Virazole (1- $\beta$ -D-ribofuransyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) sobre três vírus representantes de diferentes grupos morfológicos (vírus do mosaico do fumo (TMV), vírus do mosaico amarelo do feijoeiro, isolado Pi

racicaba (VMAF-P) e vírus do mosaico da *Vigna*) inoculados em diferentes cultivares de feijoeiro, procurando-se estabelecer:

- a) concentração mais adequada do viricida;
- b) efeito do viricida sobre diferentes concentrações do vírus;
- c) melhor época de aplicação do viricida;
- d) influência do local de aplicação do viricida no controle dos vírus.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. DOS VIRUS

#### 2.1.1. Vírus do mosaico do fumo (TMV)

O TMV é um vírus de partículas em forma de bastonete, com aproximadamente 300 x 15nm, de grande estabilidade (COSTA, 1976b).

As partículas do vírus são encontradas principalmente no citoplasma das células e também nas organelas celulares das plantas infectadas. Essas partículas frequentemente se agregam formando inclusões (GIBBS, 1977).

O TMV pode ser transmitido mecanicamente com muita facilidade. Existem poucos relatos considerando os insetos como vetores. A raça típica do TMV não é transmissível pela semente ou pólen (COSTA, 1976b; ZAITLIN e ISRAEL, 1975).

Entre as plantas consideradas como hospedeiras aparecem: *Nicotiana tabacum* L., *N. glutinosa* L., *N. sylves-*

*tris* Spegaz e Gomez., *Phaseolus vulgaris* L. e *Chenopodium amaranticolor* Coste e Reyn. (ZAITLIN e ISRAEL, 1975).

Em *P. vulgaris*, o TMV induz a formação de lesões locais nas folhas primárias do cultivar Chumbinho Opaco, aproximadamente 3 a 4 dias após a inoculação (COSTA, 1976b).

#### 2.1.2. Vírus do mosaico amarelo do feijoeiro, isolado Piracicaba (VMAF-P)

O VMAF-P, isolado particularmente severo do mosaico amarelo do feijoeiro, é um vírus de partículas alongadas, com 750 nm de comprimento, considerado de estabilidade média (COSTA, 1976b).

O vírus produz em tecidos de plantas de feijoeiro inclusões lamelares típicas dos vírus do grupo Y da batata (KITAJIMA e COSTA, 1974; EDWARDSON et alii, 1968). As inclusões lamelares encontram-se no citoplasma das células. Duas alterações marcantes distinguem os tecidos afetados pelo VMAF-P daqueles afetados por outras estirpes do VMAF: (a) a consistente presença de formações membranosas de tamanho e forma variados, no citoplasma, ou associadas ao envólucro nuclear e; (b) a ocorrência de mitocôndrios com dimensões bastante avantajadas em relação aos que ocorrem normalmente (KITAJIMA e COSTA, 1974).

O vírus VMAF pode ser transmitido por muitas espécies de afídeos de uma forma não persistente e facilmen-

te pela inoculação mecânica com o suco de plantas infectadas. O vírus não é transmitido pela semente (BOS, 1970).

Entre as plantas consideradas hospedeiras aparecem: *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Vicia faba* L., *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* Krock, *Gomphrena globosa* L., *Nicotiana tabacum*, *Petunia hybrida* Hort. e Vilm. *Spinacia olearacea* L. e *Tetragonia expansa* Muir. e Thumb (BOS, 1970).

O VMAF-P induz lesões cloróticas no cultivar Jalo e lesões necróticas nos cultivares Carioca, Chumbinho opaco e Scotia de *P. vulgaris* (COSTA, 1976b).

### 2.1.3. Vírus do mosaico da *Vigna*

O vírus do mosaico da *Vigna* possui partículas isométricas, com 25 a 30 nm de diâmetro, sendo relativamente estável (COSTA, 1976b).

As partículas do vírus ocorrem espalhadas ou em grupos através do citoplasma das células e não formam arranjos cristalinos. Frequentemente ocorrem inclusões amorfas ao redor ou próximo do núcleo em células epidérmicas de folhas de *Vigna* infectadas (KAMMEN, 1971).

O vírus é transmitido por vários besouros. Não tem sido relatado a transmissão pela semente de *Vigna sinensis* Endl e Hassk. (KAMMEN, 1971).

Entre as plantas consideradas como hospedeiras

aparecem: *Vigna unguiculata* Walp., *Phaseolus vulgaris*, e *Chenopodium amaranticolor* (KAMMEN, 1971).

Em *P. vulgaris*, êsse vírus produz lesões necróticas no cultivar Carioca e lesões cloróticas no cultivar Manteiga (COSTA, 1976b).

## 2.2. DOS VIRICIDAS

### 2.2.1. Em seres humanos

São vários os produtos que tem provado ter propriedades viricidas no controle de certas doenças de origem viral em seres humanos.

O Idoxuridine (5-iodo-2'-deoxyrudine) é utilizado nos Estados Unidos para o controle de herpes ceratites, uma infecção dos olhos. O Methisazone (N-methylisatin-B-thio semicarbazone) é vendido na Inglaterra para o controle dos vírus "smallpox" e "vaccinia (cowpox)" (MAUGH, 1976).

Na atualidade, o mais importante no mercado norte-americano é o Amantadine hydrochloride (1-adamantine hydrochloride), que tem efeito principalmente contra o vírus influenza A e que apesar de estar sendo estudado desde 1964 (HOFFMANN *et alii*, 1965), a Administração de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos não permitiu sua comercialização (MAUGH, 1976).

Muito em breve, um bom número de compostos po-

derão chegar a ser comercializados, entre os quais aparecem: o Ribavirin (Virazole ou RTCA) (STREETER et alii 1973; SIDWELL et alii, 1972), Vidarabine e Ácido fosfonoacético. Estes produtos são compostos antivirais no sentido estrito da palavra, desde que interferem diretamente com a replicação dos vírus. Dois outros produtos, o Levamisole e o Isoprinosine, parecem atuar no sistema imuno-recipiente ("recipient's immune system"), aumentando sua atividade e vários outros estimulam a produção de interferon, um composto antiviral que ocorre naturalmente. (MAUGH, 1976).

O Virazole está sendo comercializado no México para controle de infecções virais respiratórias; no Brasil para o tratamento de hepatites e em outros países da África e América Latina. O Ribavirin parece ser efetivo no controle de três diferentes tipos de doenças: infecções por vírus herpes, hepatites e influenza (MAUGH, 1976).

#### 2.2.2. Em animais

O efeito inibitório do RTCA na replicação de um número diferente de vírus A e B da Influenza foi avaliado usando-se o sistema de pedaços de ovo em placas ("egg piece system"). Nestes experimentos, o RTCA foi adicionado aos pedaços de ovo em placas, em concentrações de 0.04 mM no momento da inoculação com o vírus. O nucleosídeo causou uma inibição muito significativa (maior de 4.0 log ID<sub>50</sub>/ml) na repli-

cação de uma ampla escala de raças do vírus influenza A, provenientes de seres humanos, eqüinos, aves e suínos. (OXFORD, 1975).

O Virazole, em dosagens menores que 2.5mg/0.1ml, mostrou-se atóxico e eficiente no controle do vírus vacínico, em experimentos feitos com embriões de galinha de 11-12 dias de idade. Os resultados mostraram que a aplicação do produto logo após a inoculação do vírus, eliminou completamente a formação de pústulas sobre a membrana cõrion alantóide (m.c.a.) atingindo 100% na dose de 1.0 mg/ml; 49% na dose de 0.5 mg/ml e 9% na dose de 0.1 mg/ml, quando comparados com o controle. A mesma dosagem que provocou 100% de inibição na formação de pústulas, quando aplicada 12 horas após a inoculação do vírus, não apresentou ação contra o mesmo. Os autores concluíram que nas condições do experimento, o Virazole só atua sobre a multiplicação do vírus quando aplicado precocemente. (SOARES et alii, 1980).

### 2.2.3. Em sistemas bactéria-bacteriófagos

O efeito do Virazole sobre um bacteriófago que ataca *Xanthomonas campestris* foi estudado por SITTOLIN et alii (1980). O viricida foi colocado em contato com uma suspensão de bactéria-bacteriófago, em meio de cultura durante dois intervalos de tempo, 20 e 60 minutos. O seu efeito foi avaliado pela capacidade de inibir a destruição das bactérias



pelô bacteriôfago, quando observadas em coloraçãõ negativa ao microscôpio eletrônico. Os resultados mostraram que o Virazole produziu um efeito controlador para os diferentes intervalos de tempo, sendo menos evidente no tratamento de 20 minutos do que no de 60 minutos. Nas amostras não tratadas com o Virazole (0.25 mg/ml) o processo de destruição (lise) das bactérias foi mais intenso.

#### 2.2.4. Em plantas

Pesquisas visando o controle de fitoviroses pelo uso de substâncias viricidas tem sido feitas utilizando-se especialmente o Virazole.

Observou-se que o Virazole inibe a replicação do vírus X da batata inoculado em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L. Cv xanthi). As plantas, logo após inoculação, foram colocadas em solução aquosa contendo 5 µg de Ribavirin/ml ( $2.05 \times 10^{-5}$  M). A solução foi trocada semanalmente. A síntese do PVX foi inibida pelo Ribavirin e essa inibição aumentou com o aumento da distância do local onde foi feita a inoculação (LERCH, 1977).

O Virazole, adicionado em soluções que promovem o enraizamento de calos de fumo na concentração de 10mg/ml, produziu ausência de infecção pelo PVX na maioria das plantas regeneradas (SHEPARD, 1977).

Em plantas de roseira, o Virazole foi usado con-

tra a Rose Ring Pattern, uma doença cujos sintomas são semelhantes aos produzidos pelo mosaico da roseira. O produto, injetado em concentração de 200 µg/ml, produziu ausência de sintomas nos brotos novos de plantas, 10-20 dias após o tratamento. Quando o Virazole foi aplicado na dosagem de 500 µg/ml mostrou-se tóxico à planta. O Virazole não controlou completamente o agente causal nos brotos sem sintomas desde que o agente infeccioso foi transmissível desses brotos para plantas saudáveis de *Multiflora* Burr, 60 dias após o tratamento (SECOR e NYLAND, 1978).

No Brasil, o Virazole tem sido testado por DE FAZIO et alii (1978, 1979, 1980a, 1980b) contra os vírus da necrose branca do tomateiro (VNBT) em plantas de tomate e contra o vírus do vira-cabeça do tomateiro (TSWV) em plantas de tomate e fumo. A aplicação do Virazole em concentrações de 500 mg/l em tomate e 100 mg/l em fumo foi capaz de prevenir a infecção sistêmica do TSWV. A pulverização de plantas do tomate com Virazole (500 mg/l) reduziu a concentração do VNBT inoculado em plantas de tomate.

A triagem de novos compostos sintetizados pelas companhias fabricantes de produtos químicos utilizados na prevenção ou cura de fitovírus, demanda um modelo experimental de fácil manipulação que permita a quantificação adequada dos resultados. O feijoeiro presta-se satisfatoriamente para esse fim pois é suscetível a numerosos vírus con-

tra os quais reage formando lesões locais facilitando a avaliação do efeito viricida pela contagem do número de lesões (COSTA, 1976b).

Nos testes realizados da Seção de Virologia do Instituto Agronômico de Campinas, em triagem de possíveis substâncias viricidas e aproveitando como modelo experimental o feijoeiro, o problema tem sido abordado sob os seguintes aspectos: (1) Determinação do efeito da substância a ser testada quando adicionada ao inóculo; (2) Quando aplicado à face superior da folha a ser inoculada na mesma face; (3) Quando aplicada à face inferior da folha para inoculação na face superior; (4) Pela adição da substância por rega das plantas em vasos em areia ou transferindo plantas jovens para tubos onde são colocadas as soluções a serem testadas; (5) Inoculação da folha primária e retirada posterior de discos foliares para testes de flutuação em solução das substâncias em triagem (COSTA, 1976b).

No estudo dos viricidas é sempre necessário estabelecer qual é a faixa de tolerância das plantas à substância a ser ensaiada e usar a concentração próxima à tóxica e diluições decrescentes da mesma. O intervalo entre o tratamento e a inoculação, o tempo para absorção da substância através das raízes, e o efeito máximo e residual, são outras variáveis que deverão ser estudadas (COSTA, 1976b).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. HOSPEDEIRO E VÍRUS UTILIZADO

Na Tabela 1 são apresentados algumas características dos vírus e as relações existentes entre eles e os diferentes cultivares de feijoeiro empregados no trabalho.

Para os cultivares de grão pequeno (Carioca e Chumbinho Opaco) foram semeadas 4 sementes/vaso. Do cultivar Jalo foi semeado 3 sementes/vaso.

Foram feitas regas diárias.

#### 3.2. PREPARO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO

Os extratos usados na inoculação foram preparados em tampão fosfato 0,1M pH 7,2.

Foram utilizadas como fontes de vírus: para o TMV, folhas de plantas de fumo infectadas e extrato purificado por centrifugação; para o VMAF-P, folhas de plantas de feijoeiro cultivar Preto, infectadas com o vírus e para o mosai

TABELA 1. Cultivares de feijoeiro e vírus que as infectam, causando lesões locais cloróticas ou necróticas (COSTA, 1976).

Cultivar de feijoeiro	Vírus	Tipo da lesão	Morfologia da partícula	Estabilidade
Jalo	Isolados do vírus do moisaco amarelo do feijoeiro	Nc.CI <sup>1</sup>	alongada 750nm	média
Chumbinho	TMV	Nc	bastonete (300x15)	muito estável
Carioca	Mosaico da <i>Vigna</i>	Nc	isométrico (25 a 30)	estável

<sup>1</sup>Nc = necrótica; CI = clorótica.

saico da *Vigna*, folhas de plantas de *Vigna* infectadas.

Antes da inoculação as folhas foram pulverizadas com carborundum (granulação de 600 malhas) e lavadas com água logo após a inoculação.

As inoculações foram feitas após as 4 horas da tarde, esfregando-se o inóculo na face superior da folha com o dedo polegar.

### 3.3. USO DO VIRICIDA

As datas para os tratamentos com o Virazole foram variáveis segundo os cultivares, pois o tempo necessário para a emergência da planta até o estado ótimo para a inoculação com o vírus foram diferentes. Carioca e Chumbinho Opaco foram inoculados 3 dias após emergência e Jalo, 10 dias após emergência.

As aplicações do Virazole foram feitas passando-se um algodão embebido em solução aquosa do produto sobre a superfície foliar estabelecida para o experimento, ficando a folha parcialmente úmida.

Os ensaios montados visaram estudar:

#### 3.3.1. Efeito de diferentes concentrações do Virazole sobre o vírus

Visando determinar uma dosagem que controlasse o vírus, foram feitas aplicações do Virazole nas seguintes concentrações: 2,0; 1,0; 0,5; 0,25 e 0,125 mg/ml.

O produto foi aplicado na face superior das folhas, um dia antes da inoculação das plantas do cultivar Chumbinho Opaco com o vírus do TMV.

### 3.3.2. Efeito do Virazole sobre diferentes concentrações dos vírus

O efeito de uma concentração do produto (0.5mg/ml) sobre diferentes concentrações dos vírus foi testado visando estabelecer uma diluição do vírus na qual fosse completamente inibido pelo viricida.

As concentrações dos vírus testados foram: 1:1 (macerado de 10 g de folhas infectadas em 10 ml de tampão fosfato), 1:10; 1:100; 1:1000 e 1:10000.

O Virazole foi aplicado um dia antes da inoculação, na face superior das folhas.

Os vírus inoculados foram o TMV, obtido de extrato de folhas, e o vírus do mosaico da *Vigna*.

### 3.3.3. Efeito dos locais de pulverização do produto

Visando estabelecer possíveis diferenças que poderiam existir segundo a face da folha em que fosse aplicado o produto, o Virazole (0,5 mg/ml) foi aplicado na face superior e inferior das mesmas. Plantas testemunhas não foram tratadas.

A aplicação do Virazole foi feita um dia antes da inoculação como vírus TMV.

### 3.3.4. Efeitos de diferentes períodos de aplicação do produto

Visando determinar o efeito preventivo e cura-

tivo do produto, foram estabelecidos diferentes períodos de aplicação, antes e depois da inoculação.

Quando se utilizou o cultivar Chumbinho Opaco os períodos foram: 2 e 1 dia antes, imediatamente após inoculação e 1 e 2 dias após inoculação.

Para o cultivar Jalo, os períodos foram: 3 e 1 dia antes, imediatamente após inoculação e 1, 3 e 5 dias após inoculação.

O Virazole foi aplicado na face superior das folhas, na dosagem de 0,5 mg/ml.

Os vírus inoculados foram o TMV para o Chumbinho Opaco e o VMAF-P para o Jalo.

Num segundo ensaio com o VMAF-P, os períodos foram: 1 dia antes, imediatamente após inoculação e 3 dias após inoculação, empregando-se duas dosagens do Virazole (0,125 e 0,5 mg/ml).

### 3.3.5. TESTE DE MEIA FOLHA

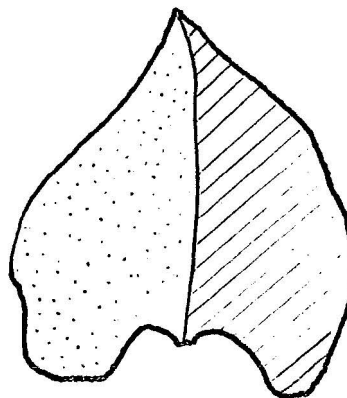
O objetivo do teste foi verificar o efeito de distribuição lateral ou sistêmica do produto.

O Virazole foi aplicado na face superior da folha, um dia antes da inoculação, na dosagem de 0,5 mg/ml, conforme esquema a seguir.

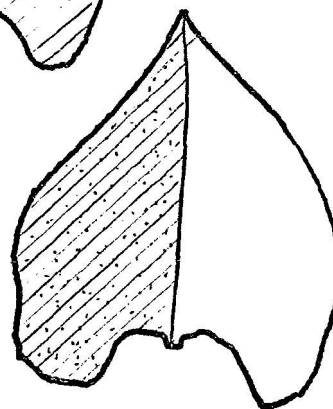
A inoculação foi feita no cultivar Chumbinho Opaco com o vírus TMV.



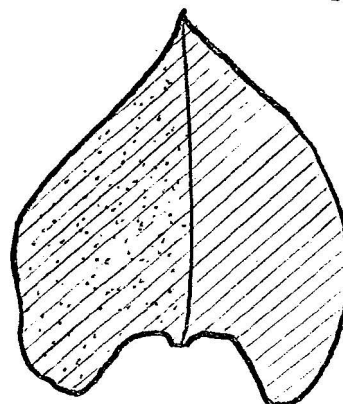
TRATAMENTO 1



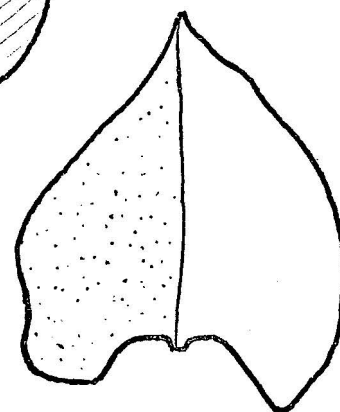
TRATAMENTO 2



TRATAMENTO 3



TRATAMENTO 4



inoculado



não inoculado



tratado com Virazole

### 3.4. AVALIAÇÃO

O efeito do Virazole foi avaliado medindo-se o diâmetro de 20 lesões por tratamento e pela contagem do número de lesões necróticas ou cloróticas de cada tratamento.

Foi determinada a área foliar pela pesagem das folhas desenhadas em papel sulfite, para o posterior cálculo dos outros parâmetros de avaliação.

As comparações entre os tratamentos foram feitas pelo teste "t".

## 4. RESULTADOS

### 4.1. EFEITO SOBRE O TMV

#### 4.1.1. Inóculo proveniente de suco de folhas infectadas

Os dados referentes ao efeito de diferentes dosagens do Virazole sobre a mesma concentração do TMV são encontrados na Tabela 2. Esses dados mostram um estímulo no parâmetro densidade x área da lesão para as dosagens de 0,125 mg/ml (0,03685) e 0,25 mg/ml (0,02617), quando comparados com a testemunha (0,02477). Para as outras dosagens estudadas (0,5; 1,0 e 2,0 mg/ml do viricida) os dados obtidos foram menores quando comparados com a testemunha, registrando-se o menor valor para a concentração de 1,0 mg/ml (0,01670). A análise estatística mostrou não haver diferenças significativas entre as médias de todos os tratamentos. Entretanto é interessante notar que os valores obtidos decresceram com o aumento da dosagem do viricida.

TABELA 2. Efeito de diferentes dosagens do Virazole sobre o vírus TMV inoculado em *P. vulgaris* (Cv. Chumbinho Opaco). Inóculo proveniente de suco de folhas.

Dosagem (mg/ml)	N.L. <sup>1</sup>	Ø L. (mm)	A.L. (mm <sup>2</sup> )	A.F. (cm <sup>2</sup> )	A.A. (mm <sup>2</sup> )	Densidade (nº lesões/cm <sup>2</sup> )	Densidade x A.L. (nº lesões x mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )
0	112,80	0,99	0,80	36,77	90,24	3,09	0,02477
0,125	141,63	1,12*	1,03*	39,61*	146,23*	3,60	0,03685*
0,250	125,50	1,13**	1,04**	43,56**	130,52	2,82	0,02617
0,5	87,04	1,06	0,94	37,97	81,82	2,44	0,02290
1,0	87,88	0,93	0,72	41,49**	63,61	2,23	0,01609
2,0	123,26	0,71**	0,41**	33,82	50,57**	3,84	0,01670

<sup>1</sup>N.L. número de lesões      A.L. área da lesão      A.A. área afetada

ØL diâmetro da lesão      A.F. área foliar



FIGURA 1. Efeito fitotóxico do Virazole aplicado em diferentes dosagens em *P. vulgaris* (Cv. Chumbinho Opaco). (A). Vista geral do ensaio mostrando a diferença entre as plantas tratadas e não tratadas; (B). Efeito das diferentes dosagens nas folhas apicais.

Observou-se um efeito fitotóxico nas folhas do ápice, as quais apresentavam uma coloração pálida que desapareceu gradualmente 3 a 5 dias após o tratamento. Este efeito foi menos evidente na dosagem de 0,125 mg/ml (Figura 1).

Na Tabela 3 encontram-se os dados referentes ao efeito do Virazole (na concentração 0,5 mg/ml) sobre diferentes concentrações do vírus. Observa-se que o Virazole reduziu o número de lesões locais para todas as concentrações de vírus, sendo que estas diferenças foram estatisticamente significativas, com exceção da concentração 1:10. Contudo para o parâmetro densidade x área da lesão, todos os valores foram significativamente diferentes.

O diâmetro das lesões foi menor em todas as concentrações quando comparados com a testemunha.

A porcentagem de inibição foi superior a 54% em todas as concentrações.

Foi observado o efeito fitotóxico do Virazole nas folhas apicais, conforme já descrito anteriormente.

Na Tabela 4 são apresentados os dados sobre o efeito do local de pulverização do Virazole. Os resultados mostram que não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

Contudo, os valores obtidos foram menores quando a aplicação foi feita na face superior da folha, refletindo possivelmente a presença de um gradiente na distribuição do Virazole dentro das folhas.

TABELA 3. Efeito do Virazole (0,5 mg/ml) sobre diferentes concentrações do vírus TMV inoculado em *P. vulgaris* (Cv. Chumbinho Opaco). Inóculo proveniente de suco de folhas.

Concentração do TMV	Tratamento <sup>1</sup> N.L. <sup>2</sup>	φ.L. (mm)	A.L. (mm <sup>2</sup> )	A.F. (cm <sup>2</sup> )	A.A. (mm <sup>2</sup> )	Densidade (nº lesões/cm <sup>2</sup> )	(Densidade x A.L.) (nº lesões x mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )	
1 : 1	c/Virazole	45,58**	0,97**	0,75**	62,21	34,19**	0,72**	0,00543**
	s/Virazole	131,58	1,29	1,31	58,84	172,10	2,20	0,02804
1 : 10	c/Virazole	148,58	0,97**	0,75**	60,52**	111,44**	2,54*	0,01902**
	s/Virazole	183,04	1,17	1,07	48,13	195,85	3,88	0,04147
1 : 100	c/Virazole	42,45**	0,87**	0,62**	61,22	26,32**	0,70**	0,00431**
	s/Virazole	120,88	1,14	1,03	57,80	124,50	2,06	0,02122
1 : 1000	c/Virazole	29,75**	0,95**	0,73**	56,85	21,72**	0,53**	0,00387**
	s/Virazole	89,92	1,17	1,10	57,73	98,91	1,67	0,01842
1 : 10000	c/Virazole	16,46**	0,96**	0,74**	62,02	12,71**	0,28**	0,00206**
	s/Virazole	48,77	1,18	1,10	57,36	53,65	0,87	0,00753

<sup>1</sup>c/Virazole : com Virazole  
s/Virazole : sem Virazole

<sup>2</sup>N.L. número de lesões  
φL. diâmetro da lesão

A.L. área da lesão  
A.F. área foliar  
A.A. área afetada

TABELA 4. Efeito do local de aplicação do Virazole (0,5 mg/ml) sobre o vírus TMV inoculado em *P. vulgaris* (Cv. Chumbinho Opaco). Inoculado proveniente de suco de folhas.

Local de Aplicação	N.L. <sup>1</sup>	Ø L. (mm)	A.L. (mm <sup>2</sup> )	A.F. (cm <sup>2</sup> )	A.A. (mm <sup>2</sup> )	Densidade (Nº lesões/cm <sup>2</sup> )	Densidade x A.L. (nº lesões x mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )
Face superior	19,04	0,92	0,68	58,01	13,01	0,31	0,00215
face inferior	20,13	0,94	0,70	59,97	14,17	0,34	0,00241
testemunha	40,29	1,20	1,13	58,16	45,89	0,70	0,00794

<sup>1</sup> N.L. número de lesões      A.L. área da lesão      A.A. área afetada

ØL. diâmetro da lesão      A.F. área foliar



Neste experimento notou-se também o efeito fitotóxico do Virazole nas folhas apicais.

Os dados referentes ao efeito do Virazole em diferentes períodos de aplicação podem ser observados na Tabela 5. Pode-se notar um marcante efeito do Virazole em todos os períodos de aplicação, sendo que os valores obtidos para o parâmetro densidade x área da lesão foram altamente significativos, com exceção do tratamento 2 dias após inoculação. Observou-se também um valor menor de inibição no número das lesões para o tratamento imediatamente após a inoculação. Este valor (57%) foi inferior ao tratamento um dia antes da inoculação (83%) e um dia após inoculação (63%). Contudo, a tendência da resposta pode-se considerar como parabólica.

Houve uma diminuição no tamanho das lesões a medida que as aplicações do Virazole se aproximaram do dia da inoculação. Porém, essas diferenças não foram significativas. Observou-se também uma redução no número de lesões locais para todos os períodos de aplicação, com exceção de 1 dia antes da inoculação.

Nã Tabela 6 observa-se o efeito do Virazole (0,5 mg/ml) sobre o vírus quando o produto foi aplicado em meia folha.

O Virazole reduziu o número de lesões na meia folha inoculada e tratada e seu efeito foi maior quando o produto foi aplicado na folha inteira (parte inoculada e parte não inoculada da mesma folha).

TABELA 5. Efeito de diferentes períodos de aplicação do Virazole (0,5 mg/ml) sobre o vírus TMV inocu-  
lado em *P. vulgaris* (Cv. Chumbinho Opaco). Inóculo proveniente de suco de folhas.





Períodos de aplicação	Tratamento <sup>1</sup>	N.L. <sup>2</sup>	φ L. (mm)	A.L. (mm <sup>2</sup> )	A.F. (cm <sup>2</sup> )	A.A. (mm <sup>2</sup> )	Densidade (nº lesões/cm <sup>2</sup> )	Densidade x A.L.
2 dias antes da inoculação	c/Virazole	37,33**	1,03	0,84	40,91	38,45*	0,86**	0,00722**
	s/Virazole	138,38	1,04	0,88	43,54	143,91	3,26	0,02800
1 dia antes da inoculação	c/Virazole	34,19**	0,99**	0,77**	44,23	33,85*	0,80**	0,00617**
	s/Virazole	128,50	1,09	0,94	43,71	194,57	4,01	0,03770
Imediatamente após inoculação	c/Virazole	53,75*	1,02	0,82	37,93	54,83*	1,43**	0,01174**
	s/Virazole	118,17	1,03	0,84	32,96	121,71	3,29	0,02760
1 dia após inoculação	c/Virazole	40,43**	0,98	0,76**	38,19*	55,93**	1,61**	0,01221**
	s/Virazole	164,83	1,13	1,01	43,48	167,32	3,31	0,03345
2 dias após inoculação	c/Virazole	53,91	1,00	0,79	40,11	54,99	1,52	0,01252
	s/Virazole	95,67	1,02	0,83	43,39	95,67	2,27	0,01791

<sup>1</sup>c/Virazole : com Virazole      <sup>2</sup>N.L. número de lesões      A.L. área da lesão      A.A. área afetada

s/Virazole : sem Virazole      φL. diâmetro da lesão      A.F. área foliar

Nº lesões c/virazole x 100/nº lesões s/virazole = x      % inibição = 100 - x

TABELA 6. Efeito do Virazole (0,5 mg/ml) sobre o vírus TMV inoculado em *P. vulgaris* (Cv. Chumbinho Opaco). Teste de meia folha. Inóculo proveniente de suco de folha.





Tratamento	N.L. <sup>2</sup>	Ø L. (mm)	A.L. (mm <sup>2</sup> )	A.F. (cm <sup>2</sup> )	A.A. (mm <sup>2</sup> )	Densidade (nº lesões/cm <sup>2</sup> )	Densidade x A.L. (nº lesões x mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )
	164,67	0,82	0,59	44,45	97,15	3,87	0,02281
	125,00	0,82	0,69	40,59	86,25	3,11	0,02278
	119,28	0,81	0,48**	46,19*	57,25**	2,62*	0,01255**
	175,94	0,86	0,72	39,37	126,70	4,57	0,03512

<sup>1</sup>  inoculado  tratado com Virazole  não tratado

<sup>2</sup> N.L. número de lesões A.L. área da lesão A.A. área afetada

Ø L. diâmetro da lesão A.F. área foliar

TABELA 6. Efeito do Virazole (0,5 mg/ml) sobre o vírus TMV inoculado em *P. vulgaris* (Cv. Chumbinho Opaco). Teste de meia folha. Inóculo proveniente de suco de folha.

Tratamento	N.L. <sup>2</sup>	Ø L. (mm)	A.L. (mm <sup>2</sup> )	A.F. (cm <sup>2</sup> )	A.A. (mm <sup>2</sup> )	Densidade (nº lesões/cm <sup>2</sup> )	Densidade x A.L. (nº lesões x mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )
	164,67	0,82	0,59	44,45	97,15	3,87	0,02281
	125,00	0,82	0,69	40,59	86,25	3,11	0,02278
	119,28	0,81	0,48**	46,19*	57,25**	2,62*	0,01255**
	175,94	0,86	0,72	39,37	126,70	4,57	0,03512

<sup>1</sup>  inoculado  tratado com Virazole  não tratado

<sup>2</sup> N.L. número de lesões A.L. área da lesão A.A. área afetada

Ø L. diâmetro da lesão A.F. área foliar

O valor do parâmetro densidade x área da lesão, acompanhou este efeito, sendo sô altamente significativo quando a folha foi inteiramente tratada.

#### 4.1.2. Inóculo purificado por centrifugação

Os dados referentes ao efeito de diferentes dosagens do Virazole sobre o TMV purificado podem ser observados na Tabela 7. Os dados mostram que os valores do parâmetro densidade x área da lesão aumentam com o aumento das dosagens de 0,125 até 0,5 mg/ml. Acima dessas dosagens houve um decréscimo nos dados obtidos. Os valores encontrados, contudo, foram sempre inferiores aos da planta testemunha.

Foi observado o efeito fitotóxico descrito anteriormente.

Na Tabela 8 observa-se o efeito do Virazole (0,5 mg/ml) sobre o vírus, segundo o local de pulverização do produto. Não houve diferenças significativas entre os locais de aplicação quando o seu efeito foi estimado pelos valores do parâmetro densidade x área da lesão.

Foi observado o efeito fitotóxico previamente descrito.

Na Tabela 9 observa-se o efeito do Virazole (0,5 mg/ml) sobre o TMV purificado quando o produto foi aplicado em meia folha. Os valores obtidos para o parâmetro densidade x área da lesão mostram a semelhança do ensaio com su

TABELA 7. Efeito de diferentes dosagens do Vírus do Mosaico do Fumo (TMV) inoculado em *P. vulgaris* (Cv. Chumbinho Opaco). Inóculo purificado por centrifugação.

Dosagem (mg/ml)	N.L. <sup>1</sup>	Ø L. (mm)	A.L. (mm <sup>2</sup> )	A.F. (cm <sup>2</sup> )	A.A. (mm <sup>2</sup> )	Densidade nº lesões/cm <sup>2</sup>	Densidade x A.L.
							(nº lesões x mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )
0	43,68	1,14	1,03	62,96	45,04	0,70	0,00720
0,125	40,96	1,07	0,92	65,58	35,68*	0,61	0,00543
0,25	58,87	0,91**	0,65**	60,03	39,45	1,00	0,00651
0,5	80,95**	1,00**	0,81*	56,35**	65,22**	1,44**	0,01169**
1,0	66,67**	0,82**	0,53**	62,61	35,44**	1,08**	0,00573
2,0	40,95	0,75**	0,45**	65,65	18,70**	0,64	0,00292**

<sup>1</sup>N.L. número de lesões      A.L. área da lesão      A.A. área afetada

Ø L. diâmetro da lesão      A.F. área foliar

TABELA 8. Efeito do local de aplicação do Vírus do Virazole (0,5 mg/ml) sobre o vírus TMV inoculado em P. vulgaris (Cv. Chumbinho Opaco). Inóculo purificado por centrifugação.

Local de aplicação	N.L. <sup>1</sup>	Ø L. (mm)	A.L. (mm <sup>2</sup> )	A.F. (cm <sup>2</sup> )	A.A. (mm <sup>2</sup> ) (nº lesões/cm <sup>2</sup> )	Densidade (nº lesões/cm <sup>2</sup> )	Densidade x A.L. (nº lesões x mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )
Face superior	31,17	1,16**	1,08**	38,49	0,33	10,39	0,1122
Face inferior	25,25	1,33	1,41	39,35	0,35	8,36	0,1178
Testemunha	14,19	1,08	0,95	36,06	0,13	4,95	0,0469

<sup>1</sup>N.L. número de lesões      A.L. área da lesão      A.A. área afetada  
 Ø L. diâmetro da lesão      A.F. área foliar

co, o efeito sistêmico e de reforço do Virazole para os tratamentos: inoculada e tratada com Virazole, tanto meia folha como folha inteira.

Foi observado o efeito fitotóxico previamente descrito.

#### 4.2. VÍRUS DO MOSAICO AMARELO DO FEIJOEIRO, ISOLADO PIRACICABA (VMAF-P)

Na Tabela 10 são apresentados os dados referentes ao efeito de diferentes períodos de aplicação do Virazole (0,5 mg/ml) sobre o VMAF-P. O efeito do Virazole foi evidente quando aplicado 3 dias antes da inoculação até 5 dias após.





Os valores do parâmetro densidade x área da lesão, apresentaram diferenças significativas quando comparados com a testemunha, com exceção do tratamento um dia e 5 dias após a inoculação.




O Virazole reduziu o número de lesões locais para todos os períodos estudados.

A porcentagem de inibição em função dos valores do parâmetro densidade x área da lesão, foi superior a 31% para todos os períodos de aplicação, com exceção do tratamento um dia após inoculação (9%). O maior efeito inibitório (66%) foi obtido quando o produto foi aplicado imediatamente após a inoculação.



TABELA 2. Efeito do Virazole (0,5 mg/ml) sobre o vírus TMV inoculado em *P. vulgaris* (Cv. Chumbinho Opaco). Teste de meia folha. Inóculo purificado por centrifugação.

Tratamento	N.L. <sup>2</sup>	φ L. (mm)	A.L. (mm <sup>2</sup> )	A.F. (cm <sup>2</sup> )	A.A. (mm <sup>2</sup> )	Densidade (nº lesões/cm <sup>2</sup> )	Densidade x A.L. (nº lesões x mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )
	28,55	0,96	0,73	66,44**	20,84	0,44	0,00321
	22,80	0,95	0,73	64,50	16,64*	0,36*	0,00264*
	28,29	0,92	0,68	60,62	19,24	0,46	0,00254**
	38,13	1,00	0,80	58,81	30,50	0,62	0,00470

<sup>1</sup>  inoculado     tratada com Virazole     não tratada com Virazole

<sup>2</sup>N.L. número de lesões    A.L. área da lesão    A.A. área afetada

φ L. diâmetro da lesão    A.F. área foliar

TABELA 10. Efeito de diferentes períodos de aplicação do Virazole (0,5 mg/ml) sobre o vírus do mosaico amarelo do feijoeiro, isolado Piracicaba (VMAF-P), inoculado em *P. vulgaris* (Cv. Jalo).

Períodos de aplicação	Tratamento <sup>1</sup>	N.L. <sup>2</sup>	Ø L. (mm)	A.L. (mm <sup>2</sup> )	A.F. (cm <sup>2</sup> )	A.A. (mm <sup>2</sup> )	Densidade (nº lesões/cm <sup>2</sup> )	Densidade x A.L.
3 dias antes da inoculação	c/Virazole	24,56*	1,10**	1,73**	80,57	42,48**	0,34	0,00605**
	s/Virazole	37,19	1,50	2,35	75,09	87,39	0,57	0,01346
1 dia antes da inoculação	c/Virazole	28,92*	1,36**	2,14**	80,56	61,88*	0,35*	0,00755**
	s/Virazole	57,67	1,68	2,65	75,88	142,22	0,72	0,01898
imediatamente após inoculação	c/Virazole	25,28**	1,39*	2,18**	74,84	55,11**	0,37**	0,00804**
	s/Virazole	69,61	1,84	2,90	83,76	201,87	0,83	0,02421
1 dia após inoculação	c/Virazole	49,06	1,63	2,57	71,95	126,07	0,69	0,01769
	s/Virazole	59,92	1,75	2,74	77,61	164,17	0,79	0,01937
3 dias após inoculação	c/Virazole	28,83**	1,47**	2,29**	66,80**	66,03**	0,43	0,00981*
	s/Virazole	62,67	1,91	2,99	106,12	187,37	0,59	0,01773
5 dias após inoculação	c/Virazole	41,00	1,63**	2,57**	82,37**	105,37	0,50	0,01297
	s/Virazole	43,14	1,93	3,03	64,27	130,72	0,62	0,01894

c/Virazole: com Virazole      <sup>2</sup>N.L. número de lesões      A.A. área afetada  
s/Virazole: sem Virazole      ØL. diâmetro da lesão      A.L. área da lesão      A.F. área foliar

Aparentemente, o efeito foi maior quando o produto foi aplicado antes da inoculação (46 e 34% para 1 e 3 dias antes da inoculação) em relação aos dados obtidos pós-inoculação (18 e 54%) para 1 e 3 dias após inoculação.

Não foi observado o efeito fitotóxico previamente descrito.

No segundo experimento, quando se utilizou duas dosagens do viricida em diversos períodos de aplicação, observou-se que o maior efeito inibitório do Virazole foi obtido quando aplicado após inoculação do vírus nas duas dosagens (Tabela 11).

O diâmetro das lesões nas duas dosagens do viricida apresentou valores maiores em relação aos das plantas-controle.

Não foi observado o efeito fitotóxico previamente descrito.

#### 4.3. EFEITO SOBRE O MOSAICO DA *Vigna*

Na Tabela 12 observa-se o efeito do Virazole (0,5 ml/mg) sobre diferentes concentrações do vírus.

Aparentemente houve um estímulo no aparecimento de lesões locais para a concentração de 1:1000, porém este valor não pode ser considerado definitivo desde que o número de lesões por folha e por área total, conforme pode ser observado no valor densidade, foi tão baixo que foi conside-

TABELA 11. Efeito de diferentes concentrações de Virazole aplicado em períodos diferentes sobre o vírus do mosaico amarelo do feijoeiro, isolado Piracicaba (VMAF-P). Inoculado em *P. vulgaris* (Cv. Jalol).

Dosagem (mg/ml)	Período de Aplicação	N.L. <sup>1</sup>	Ø L. (mm)	A.L. (mm <sup>2</sup> )	A.F. (cm <sup>2</sup> )	A.A. (mm <sup>2</sup> )	Densidade (nº lesões/cm <sup>2</sup> )	Densidade x A.L.
0,12	1 dia antes da inoculação	167,50**	1,56	1,93	116,59	320,92*	1,48	0,02857
	imediatamente após inoculação	43,16**	1,60	2,06	72,57*	87,53**	0,57**	0,01172**
	3 dias após inoculação	71,17*	1,82	2,63*	103,93	187,70	0,67	0,01754
0,5	1 dia antes da inoculação	106,91	1,82*	2,65*	99,06	278,08	1,07	0,02840
	imediatamente após inoculação	41,80**	1,80**	2,61*	91,85	106,59**	0,52**	0,01355**
	3 dias após inoculação	58,50**	1,87**	2,80**	91,76	161,50	0,56	0,01560
Testemunha		121,11	1,59	2,09	101,01	242,58	1,23	0,02573

<sup>1</sup> N.L. número de lesões Ø L. diâmetro da lesão A.L. área da lesão A.F. área foliar A.A. área afetada

TABELA 12. Efeito do Virazole (0,5 mg/ml) sobre diferentes concentrações do vírus do mosaico da Vig na Inoculado em *P. vulgaris* (Cv. Carioca).

Concentração	Tratamento <sup>1</sup>	N.L. <sup>2</sup>	Ø L. (mm)	A.L. (mm <sup>2</sup> )	A.F. (cm <sup>2</sup> )	A.A. (mm <sup>2</sup> )	Densidade (nº lesões/cm <sup>2</sup> )	Densidade x A.L.
1:1	c/Virazole	3,50**	0,5 <sup>3</sup>	0,196	57,15	0,686	0,06**	0,01764
	s/Virazole	13,16	0,5	0,196	54,05	2,679	0,23	0,04518
1:10	c/Virazole	6,20**	0,5	0,196	60,29	1,215	0,11**	0,02156
	s/Virazole	12,80	0,5	0,196	58,00	2,513	0,21	0,04116
1:100	c/Virazole	0,58**	0,5	0,196	62,42	0,114	0,02	0,00392
	s/Virazole	2,00	0,5	0,196	58,99	0,392	0,05	0,00980
1:1000	c/Virazole	0,13	0,5	0,096	61,20	0,023	0,002	0,00039
	s/Virazole	0,09	0,5	0,196	59,40	0,020	0,001	0,00020

<sup>1</sup> c/Virazole: com Virazole s/Virazole: sem Virazole

<sup>2</sup> N.L. número de lesões A.L. área da lesão A.A. área afetada

Ø L. diâmetro da lesão A.F. área foliar

<sup>3</sup> diâmetro médio estimado teoricamente

rado inexpressivo e inadequado para uma análise estatística que permitisse conclusões.

O ensaio, originalmente planejado para ser semelhante ao das concentrações do TMV, não foi possível ser levado a efeito em vista que o vírus do mosaico da *Vigna* tem um ponto final de diluição de  $10^{-3}$  (KAMMEN, 1971).

Como o diâmetro das lesões foi muito pequeno, considerou-se um valor médio de 0,5 mm.

Foi observado o efeito fitotóxico previamente descrito.

Nas Tabelas 13 a 20 (Apêndice) estão indicados como foram obtidos os dados para a elaboração das tabelas-resumo apresentadas no texto do trabalho.

## 5. DISCUSSÃO

Os sintomas fitotóxicos produzidos pela aplicação do Virazole em plantas de feijoeiro foram semelhantes a encontrados em plantas de tomate inoculadas com o vírus da necrose branca do tomateiro (VNBT) e posteriormente em plantas de tomate e fumo inoculadas com o vírus do vira-cabeça do tomateiro (TSWV), quando o Virazole foi aplicado na concentração de 0.5 mg/ml (DE FAZIO et alii 1978, 1980a).

O efeito que esta toxidez possa ter nos processos fisiológicos e conseqüentemente na produção da planta não foram estudados nesta pesquisa. Contudo, é de interesse prático seu conhecimento.

Apesar de não ter sido observada inibição completa no número de lesões locais produzidas pela infecção do TMV e do VMAF-R para as diferentes dosagens do viricida, não se pode afirmar que as folhas apicais apresentavam uma concentração do vírus muito baixa e conseqüentemente não detec-

tável em ensaios com plantas indicadoras como foi observado por DE FAZIO et alii (1980a) pois tais ensaios não foram realizados. Contudo, considerando os resultados obtidos por DE FAZIO et alii (1978, 1980a) para os vírus VNBT e TSWT nas folhas apicais de plantas de tomate ou de fumo tratadas com o Virazole (0,5 mg/ml) pode-se deduzir que as plantas inoculadas com o TMV e tratadas com o Virazole (1.0 e 2.0 mg/ml) deveriam ter uma concentração de partículas virais muito baixa e alta concentração de Virazole, permitindo completar uma boa parte do seu ciclo vegetativo sem mostrar sintomas sistêmicos e provavelmente sem afetar sua produção.

Entretanto, SECOR e NYLAND (1978) fazendo inoculação com o suco de folhas apicais em plantas indicadoras, conseguiram detectar a presença do vírus nestas plantas que foram tratadas com o Virazole e se apresentavam aparentemente saudáveis.

Estes fatos poderão ser provavelmente esclarecidos com a observação ao microscópio eletrônico de material vegetal tratado com Virazole em diferentes dosagens e inoculado com diferentes vírus.

Estas observações permitirão também estabelecer se o Virazole diminui as deformações citológicas produzidas pela infecção desses vírus.

A variação obtida nas respostas às doses crescentes do Virazole e seu efeito sobre uma concentração do TMV



inoculado em feijoeiro não permite uma conclusão definitiva que estabeleça uma resposta padrão. Por isso torna-se importante verificar, em futuros ensaios, o efeito de dosagens crescentes, pois é possível que em baixas concentrações o Virazole atue principalmente sobre o vírus e em altas concentrações atue sobre ambos: hospedeiro e vírus. Este efeito das dosagens altas sobre o hospedeiro (feijoeiro) foi evidente, pois as plantas tratadas com 1.0 e 2.0 mg/ml apresentaram tamanho e peso menores que as demais, 20 dias após o tratamento.

Se no ensaio sobre a ação do Virazole (0.5 mg/ml) em diferentes concentrações do TMV e do mosaico da *Vigna* os valores do parâmetro: densidade x área da lesão forem transformados em porcentagem de inibição, pode-se afirmar que houve inibição da replicação do TMV da ordem de 49, 19, 20 e 21% para as concentrações 1:10; 1:1; 1:100 e 1:1000 do vírus, respectivamente, e de 52, 39 e 40% para as concentrações 1:10; 1:1 e 1:100, do mosaico da *Vigna*, respectivamente. Isto faz pensar que existe uma concentração do vírus na qual o Virazole atua com maior eficiência, acima ou abaixo da qual seu efeito não é tão evidente, apesar de continuar exercendo sua ação. Esta ação maior ou menor também se dará em função do tipo do vírus e provavelmente, da planta.

Esses resultados mostram também que para os cultivares de feijoeiro que reagem rapidamente à inoculação com

o vírus (3-5 dias), a avaliação do efeito do produto aplicado durante esses períodos usando como critério o número de lesões locais estaria comprometido, visto que a maioria das lesões já se encontravam formadas. Da mesma forma explicam ainda a ação do viricida quando empregado até 5 dias após a inoculação para o controle do VAMF-P em Jalo, porque neste cultivar as lesões demoram a aparecer mais que 8 dias.

A maior inibição no número de lesões locais quando o produto foi aplicado imediatamente após a inoculação talvez esteja relacionada ao fato que o Virazole praticamente entra em contato direto com o vírus.

É provável que a redução no número de lesões formadas represente uma redução na concentração do vírus nas folhas inoculadas e também nas não inoculadas, tal como considera LERCH (1977). Para esse autor, a mencionada redução representa um caso de inibição na multiplicação do vírus, sem interferir no processo de disseminação do mesmo. Entretanto essa disseminação se processaria mais lentamente, resultando em um decréscimo no conteúdo do vírus com o aumento da distância do local de inoculação.

A distribuição e metabolização do Virazole nas plantas logo após a sua absorção poderá ser estabelecida com o uso do Virazole marcado, visto que atualmente não se conhece este aspecto.

Os resultados obtidos usando o Virazole em plan-

tas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivares Chumbinho Opaco, Jalo e Carioca, inoculadas com os diferentes vírus, mostram, sob certas restrições, a viabilidade da aplicação prática de produtos viricidas em plantas.

A não existência de diferença entre as superfícies foliares nas quais é pulverizado o produto (tabelas 4 e 8) mostra que a adoção de práticas visando o controle de fitoviroses por meio de métodos quimioterapêuticos não requer um sistema complicado de aplicação.

A maior cobertura da área foliar (teste de meia folha) pelo viricida, determinou uma maior inibição na produção de lesões locais. Isto implica que provavelmente o produto teria melhores efeitos quando as pulverizações fossem feitas em alto volume. O teste de meia folha permitiu observar ainda que o Virazole se difunde nos tecidos vegetais visando um equilíbrio.

Se os dados a serem obtidos através da microscopia eletrônica de material preparado de áreas próximas às lesões locais, obtidas em plantas de feijoeiro inoculadas com diferentes vírus e tratadas com Virazole, mostrassem relação entre o número de partículas virais e a dosagem utilizada, poder-se-ia pensar que aplicações a intervalos determinados e em dosagem econômica permitiriam manter o vírus em concentrações tão baixas que a produção da cultura não seria comprometida.

A consideração anterior sugere a continuação deste tipo de pesquisa, seja utilizando o método empregado por DE FAZIO et alii (1978; 1980a) ou através da microscopia eletrônica, a fim de determinar o que acontece com a concentração do vírus em diferentes partes da planta e nos vários períodos após a inoculação, durante o tratamento com o viricida. Isto permitiria estabelecer os pontos de máxima concentração permissível do vírus na planta para se fazer uma nova pulverização com o produto.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostram que existe uma ação viricida do Virazole sobre os vírus TMV, VMAF-P, mosaico da *Vigna* inoculados em *Phaseolus vulgaris* L. cultivares Chumbinho opaco, Jalo e Carioca.

O Virazole inibiu, porém não completamente, a formação de lesões locais em todas as dosagens utilizadas, nos diferentes períodos de aplicação e para os três vírus.

Nas dosagens (0.12 e 0.5 mg/ml) utilizadas, o maior efeito inibitório do viricida foi obtido quando aplicado imediatamente após a inoculação. A aplicação do produto um dia antes da inoculação permitiu detectar diferenças entre as dosagens.

O Virazole apresentou sintomas de toxidez quando aplicado a plantas de feijoeiro em dosagens superiores a 0.25 mg/ml. Esta toxidez variou em intensidade com o cultivar utilizado e a dosagem empregada desaparecendo 5 dias após o tratamento.

O efeito do viricida foi observado ainda 5 dias após a inoculação em cultivares que tardam mais que 8 dias para formar lesões locais.

O produto mostrou ter distribuição lateral e sistêmica pelo teste de meia folha.

O melhor parâmetro para avaliar o efeito do viricida foi densidade x área da lesão pois considera a área total afetada pelas lesões por unidade de área foliar.

A não existência de diferenças entre as superfícies foliares nas quais é pulverizado o produto, mostra que a adoção de práticas visando o controle de fitoviroses por meio de métodos quimioterapêuticos não requer um sistema complicado de aplicação.

## 7. LITERATURA CITADA

BOS, L. 1970. Bean yellow mosaic virus. *Descriptions of plant viruses* 2(40).

COSTA, A.S., 1976. Novos resultados na determinação de deficiências de micronutrientes pela técnica da meia folha. *Summa Phytopathologica*, 2: 53-56.

COSTA, A.S., 1976b. Feijoeiro como modelo experimental em testes de fitoviricidas 'in vitro'. *Summa Phytopathologica*, 2: 133-136.

DE FAZIO, G.; J. CANER e M. VICENTE, 1978. Inhibitory of Virazole (Ribavirin) on the replication of tomato white necrosis virus (VNBT). *Archives of Virology*, 58: 153-156.

DE FAZIO, G.; J. CANER e M. VICENTE, 1979. Efeito do Virazo-

le sobre a multiplicação do vírus do vira-cabeça do tomateiro. 12º Congresso da Sociedade Brasileira de Fitopatologia. Itabuna, BA, 5 a 8 de fevereiro (Resumos).

DE FAZIO, G.D.; M. KUDAMATSU; e M. VICENTE, 1980. Possível controle do vira-cabeça do tomateiro (TSWV) em plantas de fumo tratadas com Virazole (Ribavirin). *Summa Phytopathologica* 6(1,2): 32.

DE FAZIO, G.; J. CANER e M. VICENTE, 1980b. Effect of virazole (Ribavirin) on tomato spotted wilt in two systemic hosts. *Tomato and Tobacco. Archives of virology* 63: 305-309.

EDWARDSON, J.R.; D.E. PURCIFULL, e R.G. CHRISTIE, 1968. Structure of cytoplasmic inclusions in plants infected with rod-shape viruses. *Virology* 37: 498-507.

GIBBS, A.J., 1977. Tobamovirus group. *Descriptions of plant viruses* 11 (184).

HOFFMANN, C.E.; E.M. NEUMAYER; R.F. HAFF e R.A. GOLDSBY, 1965. Mode of action of the antiviral activity of Amantadine in tissue culture. *Jornal of bacteriology* 90(3): 623-628.

KAMMEN, A. van, 1971. Cowpea mosaic virus. *Descriptions of plant viruses* 3(47).

KITAJIMA, E.W. e COSTA, A.S., 1974. Alterações nas estruturas celulares associadas à infecção pelo isolado 'Pi-



racicaba' do vírus do mosaico amarelo do feijoeiro.  
*Bragantia* 33: 41-46.

LERCH, B., 1977. Inhibition of the biosynthesis of potato virus X by Ribavirin. *Phytopathology* Z. 89: 44-49.

MAUGH II, T.H., 1976. Chemotherapy: antiviral agents come of age. *Science* 192: 128-132.

OXFORD, J.S., 1975. Inhibition of the replication of influenza A and B viruses by a nucleoside analogue (Ribavirin) *Journal General virology* 28: 409-414.

SECOR, G.A. e G. NYLAND., 1978. Rose ring pattern: a component of the rose mosaic complex. *Phytopathology* 68: 1005-1010.

SHEPARD, J.F., 1977. Regeneration of plants from protoplasts of potato virus X - infected Tobacco leaves. II. Influence of virazole on the frequency of infection. *Virology* 78: 261-266.

SIDWELL, R.N.; J.H. HUFFMAN; G.P. KHARES; L.B. ALLEN; J.T. WITKOWSKI e R.K. ROBINS, 1972. Broad spectrum antiviral activity of virazole, 1-Beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science* 177: 705-706.

SITTOLIN, I.M.; P. GUZMAN V. e D.M. SILVA, 1980. Observação ao microscópio eletrônico do efeito do Virazole sobre um bacteriófago de *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson. *Summa Phytopathologica* 6(1,2): 20.

SOARES, M.A.; J.A. do PRADO e S.M. CORVINO, 1980. Ação do virazole sobre o vírus vacínico em membrana córion alantóide de embrião de galinha. 32.a Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. Rio de Janeiro, R.J. a Julho (Resumos).

STREETER, D.G.; J.T. WITKOWSKI; G.P. KHARE; R.W. SIDWELL; R. J. BAUER; R.K. ROBINS e L.N. SIMON, 1973. Mechanism of 1-Beta-D-Ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboximide. (Virazole), a new broad-spectrum antiviral agent. *Proc. Nat. Acad. Sci (USA)*. 70: 1174-1178.

ZAITLIN, M. e H.W. ISRAEL, 1975. Tobacco mosaic virus (type strain). *Descriptions of plant viruses*. 9(51).

## APÉNDICE

TABELA 13. Efeito do Virazole (0,5 mg/ml) sobre o número de lesões produzidas em *P. vulgaris* (Cv. Chumbinho Opaco) inoculado com o vírus do Mosaico do fumo (TMV).

	<u>FACE SUPERIOR</u>	<u>FACE INFERIOR</u>	<u>TESTEMUNHA</u>
27	2	25	37
5	1	3	39
47	21	22	7
39	18	13	55
3	11	23	10
11	21	9	102
13	20	27	52
10	9	40	75
22	24	38	134
40	21	24	17
13	43	13	22
13	23	22	29
	$\bar{x} = 19,04$	$\bar{x} = 20,13$	$\bar{x} = 40,29$
		$t = 0,33$	

TABELA 14. Efeito do Virazole (0,5 mg/ml) sobre o diâmetro (mm<sup>2</sup>) das lesões produzidas em *P. vulgaris* (Cv. Chumbinho Opaco) inoculado com o vírus do mosaico (TMV).

FACE SUPERIOR	FACE INFERIOR	TESTEMUNHA
0,90	0,94	1,36
0,88	0,84	1,28
1,00	1,08	1,18
1,12	1,20	1,12
0,66	0,90	1,20
1,06	0,92	1,28
0,78	0,84	1,18
0,86	0,70	1,04
0,88	0,96	0,94
0,96	1,00	1,28
		1,18
		1,12
		1,12
		1,18
$\bar{x} = 0,92$	$\bar{x} = 0,94$	$\bar{x} = 1,20$
	$t = 0,30$	

TABELA 15. Efeito do Virazole (0,5 mg/ml) sobre as áreas foliares (cm<sup>2</sup>) de *P. vulgata* (Cv. Chumbinho Opaco) inoculado com o vírus do mosaico do fumo (TMV).

	FACE SUPERIOR		FACE INFERIOR		TESTEMUNHA	
	60,35	35,23	70,90	54,77	64,05	70,90
	63,82	45,10	69,44	57,76	61,82	70,91
	68,58	47,36	65,07	51,80	61,88	60,35
	70,07	49,40	72,62	52,31	54,08	59,94
	41,92	69,86	53,41	53,78	54,87	61,27
	49,64	59,85	47,60	57,84	63,72	50,51
	47,23	54,08	57,35	70,43	54,35	49,71
	51,87	58,27	58,96	75,16	49,72	47,59
	65,44	54,53	60,95	66,46	59,91	39,30
	63,07	62,85	51,13	64,17	63,19	50,96
	64,12	67,04	48,13	69,37	75,85	
	69,17	73,46	50,03	59,90		

$\bar{x} = 58,01$

$\bar{x} = 59,97$

$\bar{x} = 58,16$

t = 0,73

TABELA 16. Efeito do Virazole (0,5 mg/ml) sobre a área afetada (mm<sup>2</sup>) pelas lesões produzidas em *P. vulgaris* (Cv. Chumbinho Opaco) inoculado com o vírus da Mosaico do fumo (TMV).

	FACE SUPERIOR	FACE INFERIOR	TESTEMUNHA
	8,44	17,60	42,14
	1,36	22,52	30,75
	0,68	11,26	44,42
	2,11	4,92	61,50
	14,34	9,15	7,97
	12,29	12,67	62,64
	7,51	13,37	11,39
	13,66	17,60	116,17
	6,14	0,70	59,22
	16,39	12,67	85,42
	14,34	26,75	152,62
	29,36	16,89	19,36
	15,70	9,15	25,05
	8,87	15,48	20,41
	$\bar{x} = 13,01$	$\bar{x} = 14,17$	$\bar{x} = 45,89$
		$t = 0,51$	

TABELA 17. Efeito do Virazole (0,5 mg/ml) sobre a área das lesões (mm<sup>2</sup>) produzidas em *P. vulgaris* (Cv. Chumbinho Opaco) inoculado com o vírus do Mosaico do fumo (TMV).

	FACE SUPERIOR	FACE INFERIOR	TESTEMUNHA
0,47	0,72	0,78	1,45
0,60	0,78	0,88	1,28
0,58	0,55	1,09	1,09
0,69	0,91	1,09	0,98
0,98	1,13	0,81	1,13
0,63	0,63	0,66	1,28
0,60	0,66	0,72	1,09
0,78	0,55	0,66	0,84
0,34	0,38	0,45	0,69
0,88	0,72	0,50	1,28
$\bar{x} = 0,68$		$\bar{x} = 0,70$	$\bar{x} = 1,13$
		$t = 0,32$	



TABELA 18. Efeito do Virazole (0,5 mg/ml) sobre a densidade das lesões. (nº lesões/cm<sup>2</sup>) produzidas em *P. vulgaris* (Cv. Chumbinho Opaco) inoculado com o vírus do Mo-saico do fumo (TMV).

	<u>FACE SUPERIOR</u>	<u>FACE INFERIOR</u>	<u>TESTEMUNHA</u>
	0,45	0,35	0,58
	0,08	0,04	0,63
	0,69	0,34	0,11
	0,56	0,18	1,00
	0,07	0,43	0,16
	0,22	0,19	1,88
	0,28	0,47	1,05
	0,19	0,68	1,25
	0,34	0,62	2,12
	0,63	0,47	0,22
	0,20	0,27	0,31
	0,19	0,44	0,48
	$\bar{x} = 0,31$	$\bar{x} = 0,34$	$\bar{x} = 0,70$
		$t = 0,55$	

TABELA 19. Efeito do Virazole (0,5 mg/ml) sobre o valor densidade x área das lesões (nº lesões x mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>) produzidas em *P. vulgaris* (Cv. Chumbinho Opaco inoculado com o vírus do Mosaico do fumo (TMV)).

	<u>FACE SUPERIOR</u>	<u>FACE INFERIOR</u>	<u>TESTEMUNHA</u>
	0,00307	0,00246	0,00661
	0,00055	0,00028	0,00718
	0,00471	0,00239	0,00125
	0,00382	0,00127	0,01162
	0,00048	0,00303	0,00182
	0,00150	0,00134	0,02141
	0,00191	0,00331	0,01196
	0,00130	0,00479	0,01424
	0,00232	0,00436	0,02415
	0,00430	0,00331	0,00251
	0,00137	0,00190	0,00353
	0,00130	0,00310	0,00338
	$\bar{x} = 0,00215$	$\bar{x} = 0,00241$	$\bar{x} = 0,00794$
		$t = 0,73$	