

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**ESTUDOS REALIZADOS COM O VÍRUS DO MOSAICO
DOURADO DO FEIJOEIRO DO BRASIL VISANDO SUA
TRANSMISSÃO POR MÉTODOS MECÂNICOS**

ANTONIA DOS REIS FIGUEIRA

Orientador: Dr. Alvaro Santos Costa

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular na Área de Bioquímica.

CAMPINAS - 1980

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**

À minha mãe e irmãos

pelo incentivo carinhoso que nunca me faltou

Ao meu esposo JOSÉ ROBERTO

Pelo amor, apoio e compreensão que sempre de
monstrou quando negligenciado em prol deste
trabalho

À minha filha MARIANE

O oásis de minha vida

À memória de meu pai

que sempre ensinou-me a amar o trabalho, di
nificando-o com a honestidade

D E D I C O

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

- Ao Prof. Dr. Álvaro Santos Costa, mestre incansável, pelo apoio e orientação constante durante todo o período de realização deste trabalho;
- Ao Instituto Agronômico de Campinas, através da Seção de Virologia Fitotécnica, pela oportunidade oferecida para o desenvolvimento deste trabalho;
- Ao Prof. Dr. Plínio Alves de Moraes, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas e ao Prof. Dr. Walter August Hadler, Diretor do Instituto de Biologia, pelo apoio às pesquisas realizadas neste Departamento;
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão de Bolsa de Estudos na categoria de Mestrado I e II;
- À Prof.^a Dr.^a Lucia P. S. Airoidi, pelo apoio, orientação de programa e sugestões apresentadas a este trabalho;
- Ao Prof. Dr. Avelino R. de Oliveira, nosso agradecimento particular e sincero pelo incentivo e apoio que recebemos durante todo o período do curso, e pelas correções e sugestões apresentadas a esse trabalho;
- Aos Professores: Dr. Hiroshi Aoyama e Dr. Irineu B. Camargo, pelas correções e sugestões apresentados a esse trabalho;

- Aos Demais Professores do Departamento de Bioquímica, que nos instruíram durante o curso, e sempre incentivaram nosso trabalho;
- Aos Amigos da Seção de Virologia, particularmente à Elizabeth Aparecida Baptista e ao José Osmar Gaspar, pelo incentivo e calor humano que sempre recebemos;
- Aos funcionários e aos colegas do Departamento de Bioquímica, em especial à Ana Marly , Jorge , Sérgio , Neusa , Luisa, Amora , Maria Regina e Arita, pelo apoio e incentivo durante nosso curso;
- Ao Prof. Dr. Maro H. Sohndal, pela cessão de algumas substâncias e pelas contribuições recebidas na realização deste trabalho;
- À todos os funcionários da seção de Virologia, que contribuíram de diversas maneiras, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho.

Í N D I C E

	Página
1 - RESUMO	1
2 - INTRODUÇÃO	4
3 - REVISÃO DE LITERATURA	7
4 - MATERIAL E MÉTODOS	9
5 - RESULTADOS EXPERIMENTAIS	12
5.1 - Tentativas de transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro com o inóculo ex- traído sob diferentes condições	12
5.1.1 - Na presença de diferentes combinações de so- luções tampões com diferentes pHs, contendo vários aditivos químicos comumente usados na transmissão mecânica dos fitovírus	12
5.1.1.1 - Inoculação por fricção com carborundum na face superior da folha	13
5.1.1.2 - Inoculação por meio de diferentes técnicas: fricção com carborundum na face superior da folha, fricção com carborundum na face in- ferior da folha e por picadas de alfinete	15
5.1.2 - Usando inibidores de nucleases	17
5.1.2.1 - Extração do inóculo na presença de inibido- res de nucleases	17
5.1.2.2 - Extração do inóculo a partir de folhas infe- tadas pré-tratadas por imersão do pecíolo em soluções contendo inibidores de nucleases ..	18
5.1.3 - Usando substâncias que poderiam impedir a ação das proteases sobre a capa proteica viral	20
5.1.3.1 - Empregando substâncias químicas descritas co- mo inibidoras ou inativadoras de proteases	20

	Página
5.1.3.1.1 - Extração do inóculo na presença de inibidores ou inativadores de proteases	22
5.1.3.1.2 - Extração do inóculo a partir de folhas infetadas pré-tratadas por imersão do pecíolo em soluções contendo inibidores de proteases	22
5.1.3.2 - Empregando macromoléculas proteicas numa tentativa de saturação do sistema e indução de inibição competitiva das proteases	24
5.1.3.2.1 - Extração do inóculo na presença de caseína, hemoglobina humana e soro albumina bovina diluídos em tampão fosfato	24
5.1.3.2.2 - Extração do inóculo na presença de caseína, combinada ou não com aditivos químicos, diluídas em diversos tampões	27
5.1.4 - Extração do inóculo na presença de substância fixadora de tecidos	27
5.1.5 - Extração do inóculo a partir de folhas infetadas pré-congeladas por meio de CO ₂ sólido	29
5.1.6 - Empregando quatro diferentes métodos, três dos quais foram usados com sucesso na transmissão mecânica de vírus semelhante por investigadores de outros países	32
5.2 - Verificação de possível estabilidade diferencial de componentes do vírus	35
5.2.1 - Duas inoculações seguidas sobre as mesmas folhas empregando inóculo extraído em soluções de diferentes pHs	35
5.2.2 - Duas inoculações sobre as mesmas folhas com intervalo de três dias entre a primeira e segunda inoculação, usando inóculo extraído em soluções de diferentes pHs e empregando diferentes métodos de inoculação	37
5.3 - Verificação de possível efeito sinérgico do vírus do mosaico dourado do tomateiro sobre a transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro	39

5.4 - Tentativas de indução de mutantes transmissíveis mecanicamente através do uso de substâncias mutagênicas	41
5.4.1 - Extração do inóculo na presença de substâncias mutagênicas	41
5.4.2 - Extração do inóculo a partir de folhas infetadas pré-tratadas por imersão do pecíolo em soluções contendo substâncias mutagênicas	42
5.4.3 - Extração do inóculo a partir de plantas infetadas pré-tratadas por imersão das raízes em soluções contendo substâncias mutagênicas	45
6 - DISCUSSÃO	47
7 - CONCLUSÃO	53
8 - SUMMARY	54
9 - LITERATURA CITADA	57

1 - RESUMO

O problema da transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro (VMDF) no Brasil foi abordado sob vários aspectos, tanto em relação às plantas-testes doadoras e receptoras do inóculo, como em relação ao vírus.

O inóculo empregado na realização dos testes, sofreu variações quanto a: a) origem - inóculo coletado em Campinas, SP e região, bem como de outras regiões do Estado de São Paulo e Paraná ; b) idade - as folhas infetadas que serviram como fonte de inóculo foram empregadas em vários estágios, desde aqueles na fase inicial de crescimento, até as que já haviam atingido aproximadamente seu tamanho máximo de expansão ; c) época de coleta após infecção da planta - o inóculo foi coletado tanto na época em que apareceram os primeiros sintomas da doença (cerca de 20 dias após inoculação com mosca branca virulífera), como em fases mais adiantadas, quando a planta já estava em início de florescimento ; d) concentração - a quantidade de folha (em gramas) por volume de solução

extratora (em ml) foi variável, para se conseguir diversas concentrações do vírus em solução.

Na extração e preparação do inóculo foram empregadas muitas das substâncias químicas normalmente usadas na transmissão mecânica dos fitovírus, e muitas outras com propriedades de inibir a ação de nucleases e proteases, visando preservar a integridade e conseqüentemente a infetividade da partícula viral. Foi tentado também o uso de outras substâncias como o glutaraldeído, na solução extratora, e o CO₂ sólido para congelamento de folhas que foram posteriormente trituradas para extração do inóculo.

Em outros testes foi feita a extração do vírus em duas soluções de diferentes pHs e posteriormente duas inoculações seguidas sobre as mesmas folhas para verificação de possível diferença de estabilidade em componentes do vírus. Outro vírus do mesmo grupo morfológico, o do mosaico dourado do tomateiro, foi empregado em mistura com o inóculo em tentativas de se descobrir possível efeito sinérgico deste, sobre a transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro.

Além da metodologia usual de inoculação que é a de fricção com carborundum na face superior da folha, foram empregados também outros métodos: o de fricção com carborundum na face inferior da folha e o de picadas de alfinete.

As plantas-teste doadoras e receptoras do inóculo empregadas variaram quanto à idade, variedade e mesmo espécie de *Phaseolus*. As condições ambientais de laboratório e estufa, em relação à luz, temperatura e umidade, também foram variadas.

Os métodos de transmissão mecânica utilizados com sucesso pelos outros investigadores para transmitir o vírus do mosaico dourado do feijoeiro de Porto Rico , Colômbia , El Salvador, foram meticulosamente repetidos, tanto com algumas variedades por eles empregadas, como com diversas outras variedades.

Entretanto, apesar de se ter trabalhado por um período de mais de dois anos, empregando o maior número de variáveis possíveis nos testes realizados, não se conseguiu nenhum resultado positivo de transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro.

Tentativas de indução de mutantes transmissíveis mecanicamente a partir do complexo normal do vírus do mosaico dourado do feijoeiro através do uso de substâncias químicas, apresentaram resultados negativos.

Todas as tentativas feitas até o presente para transmitir o vírus do mosaico dourado do feijoeiro no Brasil por métodos mecânicos tem falhado. Isso é considerado como evidência de que é um vírus diferente daquele existente em outros países onde ocorre doenças semelhantes. Provavelmente possui características que o tornam mais instável *in vitro*, o que não tem permitido sua transmissão mecânica até o momento.

O problema da não transmissibilidade do vírus não é considerado definitivo. É possível que variações de técnica não tentadas ou o isolamento de um variante ou mutante do complexo, de maior estabilidade, possa vir a permitir sua transmissão mecânica com relativa facilidade.

2 - INTRODUÇÃO

O mosaico dourado do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) foi encontrado primeiramente no Brasil em 1961 no Estado de São Paulo, tendo sido descrito alguns anos depois como uma doença de menor importância (COSTA, 1965). Em anos mais recentes, entretanto, o mosaico dourado já passou a ser considerado uma das principais doenças em culturas de feijão da seca feitas em certas áreas do sul do Brasil (COSTA, 1975). Atualmente, sabe-se que ocorre praticamente em todas as principais áreas onde se cultiva o feijão no país: Minas Gerais, São Paulo e também na região ao longo do Vale do Rio São Francisco, nas proximidades de Petrolina (Pernambuco).

Uma moléstia do mesmo grupo e que provoca em plantas de feijoeiro por ela afetadas uma sintomatologia extremamente semelhante à do mosaico dourado existente no Brasil, ocorre também em várias outras partes da América Latina, como: El Salvador, Jamaica, Costa Rica, Guatemala, Nicaragua, Porto Rico, etc. (GAMEZ, 1977).

O vetor do vírus do Brasil e dos outros países acima citados, a mosca branca *Bemisia tabaci* Genn., é uma espécie polífaga que ocupa um papel de destaque como inseto vetor de várias doenças causadas por vírus e possui ampla distribuição geográfica, abrangendo principalmente as áreas tropicais (COSTA, 1976).

Nos últimos anos, com a expansão da cultura de soja no Brasil, tem ocorrido um grande aumento populacional da mosca branca em São Paulo, Paraná e outras localidades do país, tornando bastante intenso o ataque do mosaico dourado em feijoads comerciais de suas áreas produtoras (COSTA, 1975). Pesquisas efetuadas em condições de campo por investigadores tanto do Brasil como de outros países (PIERRE, 1974 ; ALMEIDA *et alii*, 1979; MENTEN *et alii*, 1979) demonstraram que feijoeiros infetados pelos vírus do mosaico dourado nos primeiros 30 dias após sua germinação podem sofrer uma diminuição de mais de 70% em sua produção e, se atacados em uma fase mais tardia, uma diminuição de mais de 40%. Portanto, o mosaico dourado tem se tornado uma doença particularmente importante para o Brasil, onde o consumo de feijão é de 70 gramas ao dia, o que o coloca entre os principais consumidores desse produto (MEDINA, 1972).

A grande semelhança entre os sintomas apresentados pelo feijoeiro infetado pelo vírus do mosaico dourado no Brasil e nos outros países da América Latina, levou os primeiros investigadores que trabalharam com essa doença a acreditar que os agentes causais fossem proximamente relacionados e tivessem propriedades bem semelhantes ou mesmo iguais. Entretanto, nos outros países tem-se conseguido transmitir mecanicamente e mesmo purificar o vírus do mosaico dourado do feijoeiro com relativa faci

lidade (MEINERS *et alii*, 1973 ; GALVEZ e CASTAÑO, 1976 ; GOODMAN *et alii* 1976 ; BIRD *et alii*, 1977) o que não tem acontecido no Brasil com relação à transmissão mecânica (COSTA, 1965 ; FLORES e SILBERSCHMIDT, 1966 ; COSTA, 1976 e outros dados não publicados) nem com a purificação desse vírus (MATYIS *et alii*, 1975 ; SILVA, dados não publicados).

No presente trabalho, são relatados os resultados de testes nos quais foi investigado o efeito de inúmeras substâncias químicas, bem como o efeito de alguns tratamentos físicos sobre a infetividade do inóculo durante as várias fases das tentativas de transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado o feijoeiro.

3 - REVISÃO DE LITERATURA

Desde que foram iniciados os primeiros estudos com o vírus do mosaico dourado do feijoeiro no Brasil, sua transmissão mecânica não tem sido conseguida (COSTA, 1965 ; FLORES e SILBERSCHMIDT, 1966 ; COSTA, 1976 e outros dados não publicados). Os testes que tem sido feitos com a purificação desse vírus, também não tem dado bons resultados (MATYIS *et alii* 1975 ; SILVA, dados não publicados). Nos outros países onde ocorre doença semelhante causada por um vírus do mesmo grupo, na maioria dos casos a transmissão mecânica desse agente causal sō foi conseguida depois de vencidas algumas dificuldades iniciais, havendo mesmo aqueles que, a exemplo do que tem acontecido no Brasil, não puderam ser transmitidos pelos métodos mecânicos utilizados.

Em Porto Rico, quando esse patógeno começou a ser estudado , foi considerado por BIRD *et alii* (1972) como não transmissível mecanicamente quando o inóculo foi extraído na presença de água. Continuando seus estudos, BIRD *et alii* (1975), em uma fase posterior, conseguiram al-

guma transmissão mecânica utilizando adjuvantes na solução extratora. E, finalmente conseguiram 100% de transmissão mecânica empregando como solução extratora tampão fosfato 0,1 M , pH 7,0 (BIRD *et alii*, 1977).

Alguns pesquisadores como GAMEZ, em Costa Rica (comunicação verbal), PIERRE (1974), na Jamaica e WILLIAMS (1976), na Nigéria, não conseguiram a transmissão mecânica do VMDF. Outros conseguiram essa transmissão com relativa facilidade como MEINERS *et alii* (1973), que transmitiram mecanicamente o VMDF de El Salvador, empregando como solução extratora tampão fosfato 0,1 M , pH 6,8. Porém não conseguiram purificá-lo em suas tentativas iniciais, não tendo logrado reproduzir nenhuma infecção quando utilizou como inóculo o precipitado obtido por ultracentrifugação ou as frações resultantes da centrifugação em gradiente de sacarose.

GALVEZ e CASTAÑO (1976), trabalhando também com VMDF de El Salvador, conseguiram transmiti-lo mecanicamente empregando tampão fosfato 0,1 M , pH 7,0 contendo β -mercaptoetanol a 1% como solução extratora. Conseguiram também purificá-lo empregando o procedimento convencional. GOODMAN *et alii* (1976) quando estudaram o vírus do mosaico dourado do feijoeiro existente em Porto Rico, conseguiram transmiti-lo mecanicamente usando tampão fosfato 0,1 M , pH 7,8 contendo 0,1 M de EDTA e 0,001 M de cisteína como solução extratora, purificando-o com relativa facilidade. GOODMAN (1977) foi ainda mais longe quando fez a análise do ácido nucleico viral, constatando tratar-se de DNA de fita simples.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

O inóculo utilizado na maioria dos testes efetuados foi extraído de plantas de feijoeiro infetadas com o vírus do mosaico dourado por meio de seu vetor, a mosca branca *Bemisia tabaci*. Essas plantas foram mantidas em estufas para que servissem como fonte de inóculo. Eventualmente, foram utilizadas plantas naturalmente infetadas em campo procedentes de culturas de feijão situadas tanto na região de Campinas, como em outras regiões do Estado de São Paulo e Paraná. No decorrer dos inúmeros testes realizados, foram empregadas diversas variedades de *Phaseolus vulgaris* e três outras espécies do g nero: *P. lunatus* L. , *P. acutifolius* A. Gray e *P. longepedunculatus* Mart. como plantas-teste doadoras.

As folhas infetadas da planta-teste doadora foram escolhidas com cuidado no sentido de se selecionar aquelas que exibiam sintomas mais marcantes, de preferência as folhas mais jovens. Tais folhas foram coletadas aproximadamente 20 dias após terem sido inoculadas com a mosca bran

ca virulífera. Além destas, em alguns testes foram usadas folhas médias ou velhas, de tal modo que se empregou inóculo de várias idades no decorrer do trabalho.

Como plantas-teste receptoras do inóculo foram usadas também diversas variedades de *Phaseolus vulgaris* e as três outras espécies já citadas anteriormente. As plantas-teste receptoras do inóculo foram obtidas por plantio de sementes em vasos de alumínio de 15 cm de diâmetro por 16 cm de altura. Cada vaso continha duas plantas que no momento da inoculação possuíam somente as duas folhas primárias com aproximadamente 2/3 do seu tamanho máximo de expansão. Em alguns casos, porém, foram usadas também plantas num estágio mais avançado de crescimento, quando já apresentavam suas primeiras trifoliadas.

Na fase de extração do inóculo, as folhas infetadas, após terem sido coletadas da planta-teste doadora, foram trituradas com o auxílio de um pistilo em um almofariz contendo a solução extratora empregada para cada experimento. Nos testes em que foi usado gelo seco (CO_2 sólido) empregou-se o seguinte procedimento: as folhas infetadas foram colocadas em um almofariz e sobre elas espalhou-se CO_2 em forma de neve carbônica. Depois de congeladas as folhas foram trituradas e reduzidas a pó. e esse pó resultante foi transferido para um segundo almofariz contendo a solução extratora.

Os tampões empregados no preparo das soluções extratoras foram HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico) e fosfato em concentrações e pHs variados. Em alguns casos, foi investigado o efeito comparativo destes tampões com dois outros: sacarose tamponada e NaCl-EDTA. Na ocasião em que as soluções extratoras foram preparadas os

adjuvantes (aditivos químicos) foram adicionados às soluções tamponantes, em proporção adequada para obtenção das concentrações finais indicadas nas tabelas, sempre antes do acerto final do pH. Somente no caso da solução preparada com alguns cátions (Mg^{++} , Zn^{++} e Fe^{+++}), nos testes realizados com o objetivo de inibir nucleases, a concentração final destes deve ter sido menor que a indicada na tabela (0,02 M), pois houve precipitação de sais indicando ter ocorrido reações entre os componentes da mistura.

O método de inoculação mais empregado durante a realização dos vários testes foi o de fricção com carborundum: polvilhou-se uma fina camada de carborundum (carbeto de silício) de malha 320, na superfície da folha a ser inoculada e friccionou-se sobre ela a solução extratora contendo o inóculo, com o auxílio do dedo médio. Um outro método de inoculação empregado foi o de picadas de alfinete. Nesse caso foram mergulhados pequenos alfinetes entomológicos de número 0 (zero), fixados em um suporte de madeira, na solução contendo o inóculo e em seguida foram feitas várias picadas no pecíolo, nervuras e limbo foliar da planta-teste receptora.

As inoculações foram feitas em condições de laboratório, cuja temperatura ambiente média variou de 20 a 30°C. As que foram feitas a 4°C contaram com material previamente resfriado e durante toda a extração e inoculação o almofariz contendo a solução extratora e posteriormente o inóculo foi mantido em recipiente contendo gelo moído.

Depois de inoculadas, as plantas-teste foram levadas para estufa apropriada, onde a temperatura ambiente média variou de 20 a 35°C ao longo do ano.

5 - RESULTADOS EXPERIMENTAIS

5.1 - TENTATIVAS DE TRANSMISSÃO MECÂNICA DO VÍRUS DO MOSAICO DOURADO DO FEIJOEIRO COM O INÓCULO EXTRAÍDO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES

Nesta série de experimentos foram investigadas várias hipóteses, através de experimentos nos quais foi tentada a transmissão mecânica do VMDF empregando diferentes métodos de extração e inoculação, além das variações de inóculo e plantas-teste doadora e receptoras do vírus.

5.1.1 - NA PRESENÇA DE DIFERENTES COMBINAÇÕES DE SOLUÇÕES TAMPÕES COM DIFERENTES PHs, CONTENDO VÁRIOS ADITIVOS QUÍMICOS COMUMENTE USADOS NA TRANSMISSÃO MECÂNICA DOS FITOVÍRUS

Na primeira fase o inóculo foi extraído em soluções que variaram em sua composição quanto a tipo de tampão, concentração, pH e adi-

tivos químicos empregados, em tentativas de preservar a infetividade do vírus durante os processos de extração e inoculação mecânica, tanto por inibição de reações indesejáveis que normalmente ocorrem como por ativação de outras reações necessárias para infecção e estabelecimento da partícula viral. Esta fase foi subdividida segundo as metodologias de inoculação.

5.1.1.1 - Inoculação por fricção com carborundum na face superior da folha

As soluções extratoras empregadas nestes experimentos foram preparadas com dois tipos de solução tamponantes em duas concentrações e com pHs em faixa ácida, neutra e básica. Os aditivos químicos constaram de: a) ativadores de inóculo (alguns íons metálicos (Mg^{++} , Fe^{+++} e Ca^{++}) e também cafeína); b) quelantes (EDTA e dietilditiocarbamato de sódio); c) redutores, inibidores da fenoloxidase e capazes também de se combinar com quinonas (cloridrato de cisteína, tioglicolato de sódio); etc.

Foram realizados 87 testes, nos quais 870 plantas receberam o inóculo pelo método de fricção com carborundum na face superior da folha. Os resultados desses testes se encontram na Tabela 1, sendo que, não foi observado nenhum caso positivo de transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro.

TABELA 1 - Resultados obtidos em testes de transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro utilizando diferentes soluções extratoras preparadas com os aditivos químicos comumente usados na transmissão mecânica dos fitovírus

Aditivos químicos e respectivas concentrações	pH da solução extratora	Número de testes (Nº T), de plantas inoculadas (INO) e infetadas (INF) utilizando inóculo extraído na presença dos tampões nas concentrações e pHs indicados											
		Tampão fosfato						Tampão hepes					
		0,1 M			0,01 M			0,1 M			0,01 M		
		Nº T	INO	INF	Nº T	INO	INF	Nº T	INO	INF	Nº T	INO	INF
FeCl ₃ 0,1 M	5	2	20	0	2	20	0	2	20	0	2	20	0
Idem	8	2	20	0	2	20	0	2	20	0	2	20	0
CaCl ₂ 0,01 M	5	2	20	0	2	20	0	2	20	0	2	20	0
Idem	8	2	20	0	2	20	0	2	20	0	2	20	0
Mistura de tioglicol 0,001 M e dietilditiocarbamato de sódio 0,01 M	5	2	20	0	2	20	0	2	20	0	2	20	0
Idem	8	2	20	0	2	20	0	2	20	0	2	20	0
Mistura de MgCl ₂ 0,01 M e cisteína 0,001 M	7	2	20	0	2	20	0	-	-	-	-	-	-
Idem	6	-	-	-	-	-	-	1	10	0	1	10	0
Idem	8	1	10	0	1	10	0	1	10	0	-	-	-
Mistura de MgCl ₂ 0,01 M e cloridrato de cisteína 0,001 M	7	2	20	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mistura de EDTA 0,01 M e cloridrato de cisteína 0,001 M	8	1	10	0	-	-	-	1	10	0	-	-	-
Mistura de EDTA 0,01 M e cisteína 0,001 M	8	1	10	0	-	-	-	1	10	0	-	-	-
Mistura de MgCl ₂ 0,01 M e β-mercaptoetanol a 1%	7	4	40	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Idem	8	-	-	-	-	-	-	4	40	0	-	-	-
Mistura de tioglicolato de sódio 0,01 M, EDTA 0,01 M e cafeína a 1%	8	2	20	0	-	-	-	2	20	0	-	-	-
Mistura de MgCl ₂ 0,01 M, cloridrato de cisteína 0,001 M e cafeína a 1%	7	1	10	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Idem	6	-	-	-	-	-	-	1	10	0	-	-	-
Mistura de tioglicolato de sódio 0,01 M e cafeína a 1%	8	2	20	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Idem	6	-	-	-	-	-	-	2	20	0	-	-	-

- 5.1.1.2 - Inoculação por meio de diferentes técnicas: fricção com carborundum na face superior da folha, inoculação por fricção com carborundum na face inferior da folha e por picadas de alfinete

Após as primeiras tentativas de transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro, sem obtenção de resultados positivos, mesmo utilizando diversos aditivos químicos que normalmente são empregados com sucesso na transmissão mecânica da maioria dos fitovírus, tentou-se variar a metodologia de inoculação, supondo que a empregada até então vinha sendo inadequada para o patógeno, com o qual se estava trabalhando.

Foram realizados 25 testes, nos quais um total de 250 plantas foram inoculadas. A metodologia empregada para aplicação do inóculo nas 10 plantas que foram utilizadas em cada teste seguiu o seguinte esquema: nas quatro primeiras o inóculo foi aplicado pelo método de fricção com carborundum na face superior da folha ; nas quatro seguintes por fricção com carborundum na face inferior da folha, e, nas duas últimas, por picadas de alfinete, conforme técnica descrita anteriormente.

Os resultados estão expressos na Tabela 2 , não tendo aparecido nenhuma planta infetada entre as que foram inoculadas.

TABELA 2 - Resultados obtidos em testes de transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro variando a metodologia de inoculação e usando diferentes soluções extratoras

		Número de testes (Nº T), de plantas inoculadas (INO) e infetadas (INF) utilizando inóculo extraído na presença dos aditivos químicos dissolvidos em soluções tampões de diferentes pHs nas concentrações abaixo														
Aditivos e respectivas concentrações	Tampão	pH	0,1 M						0,01 M							
			Nº T	Fricção com carborundum na face da folha		Picadas de alfinete		Nº T	Fricção com carborundum na face da folha		Picadas de alfinete					
				Superior	Inferior	INO	INF		INO	INF	INO	INF				
				INO	INF	INO	INF		INO	INF	INO	INF				
Mistura de sulfato de sódio 0,1 M e EDTA 0,01 M	fosfato	5	2	8	0	8	0	4	0	2	8	0	8	0	4	0
Idem	fosfato	8	1	4	0	4	0	2	0	1	4	0	4	0	2	0
Mistura de cisteína 0,001 M e EDTA 0,001 M	fosfato	5	2	8	0	8	0	4	0	1	4	0	4	0	2	0
Idem	fosfato	8	2	8	0	8	0	4	0	2	8	0	8	0	4	0
Mistura de sulfato de sódio 0,1 M e EDTA 0,01 M	Hepes	5	2	8	0	8	0	4	0	1	4	0	4	0	2	0
Idem	Hepes	8	2	8	0	8	0	4	0	1	4	0	4	0	2	0
Mistura de cisteína 0,001 M e EDTA 0,01 M	Hepes	5	2	8	0	8	0	4	0	1	4	0	4	0	2	0
Idem	Hepes	8	2	8	0	8	0	4	0	1	4	0	4	0	2	0

5.1.2 - USANDO INIBIDORES DE NUCLEASES

Como os resultados negativos nos testes de transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro vinham sugerindo uma grande instabilidade "in vitro" desse patógeno, foi tentado o uso de substâncias químicas que pudessem de alguma maneira preservar a integridade da partícula viral, e conseqüentemente, sua infetividade. Foram então usadas substâncias inibidoras de nucleases objetivando impedir o ataque das diversas nucleases que normalmente são liberadas no momento da trituração das folhas para extração do inóculo, ao ácido nucleico viral. Essa poderia ser uma forma de manter a sua infetividade.

Nestes experimentos foram feitos dois tipos de tentativas de se preservar o ácido nucleico viral através do uso de inibidores de nucleases: fazendo-se a extração do inóculo por trituração das folhas diretamente em soluções contendo tais inibidores, e submetendo-se as folhas infetadas a um tratamento prévio com essas soluções.

5.1.2.1 - Extração do inóculo na presença de inibidores de nucleases

As substâncias inibidoras de nucleases usadas foram: polivimilsulfato, dietilpirocarbonato, bentonite, β -mercaptoetanol, alguns cátions (Fe^{+++} , Zn^{++} e Mg^{++}), ânions (fluoreto e citrato) e cloreto de potássio.

Nos testes realizados o inóculo foi extraído em soluções tamponantes contendo inibidores de nucleases e em seguida inoculado por fricção com carborundum. As 527 plantas inoculadas no decorrer dos 41 testes

realizados, pertenciam às seguintes variedades de feijoeiro: Preto , Carioca , Moruna , Aroana , Bico-de-Ouro , Piratã , Rosinha (G-2 e G-2/69), Jalo , Roxinho Precoce , Wisconsin HBR : 40 , Aetê 1/37 e 1/40.

Os resultados expressos na Tabela 3 , foram todos negativos.

5.1.2.2 - Extração do inóculo a partir de folhas infetadas pré-tratadas por imersão do pecíolo em soluções contendo inibidores de nucleases

Nessa fase que representa uma continuação dos experimentos anteriores, foi realizado um tratamento prévio das folhas de feijoeiro infetadas com mosaico dourado (fonte do inóculo) com a finalidade de se conseguir maior eficiência na ação dos inibidores de nucleases. No referido tratamento, as soluções contendo os mesmos inibidores de nucleases do teste anterior foram introduzidas nos tecidos das folhas que serviram como fonte de inóculo, via xilema, pela seguinte técnica: as trifoliadas infetadas, cuidadosamente destacadas da planta doadora de inóculo para que não houvesse danificação do pecíolo, foram imediatamente mergulhadas na solução contendo os inibidores de nucleases ; em seguida a ponta inferior do pecíolo foi cortada abaixo da superfície da solução, para impedir a entrada de ar no xilema e conseqüentemente, permitir o fluxo normal para os tecidos foliares. O tempo em que essas trifoliadas permaneceram com o pecíolo mergulhado na solução-teste, variou de 24 a 30 horas. Depois desse período de tratamento as folhas foram trituradas em almofariz na presença da mesma solução-teste e o inóculo foi aplicado na planta-teste receptora pelo método de fricção com carborundum.

TABELA 3 - Resultados dos testes de transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro com o inóculo extraído na presença de inibidores de nucleases

Inibidores de nucleases e respectivas concentrações	Número de testes	Número de plantas inoculadas (INO) e infetadas (INF) empregando inóculo extraído em tampão fosfato 0,05 M, pH 8,5, contendo os inibidores de nucleases	
		INO	INF
Mistura de inibidores de nucleases	26	260	0
Mistura de cátions: Zn^{++} , Mg^{++} , e Fe^{+++} 0,02 M	3	50	0
Mistura de ânions: citrato e fluoreto 0,02 M	3	49	0
β -Mercaptoetanol 0,005 M	3	50	0
KCl 0,1 M	3	48	0
Mistura de bentonite - 2 g/l, PVS - 10 mg/l e DEP - 1 mg/l	3	50	0

Obs.: - Na mistura de inibidores de nucleases foram usados todos os inibidores de nucleases e respectivas concentrações descritas na Tabela acima.

PVS = polivinilsulfato ;

DEP = dietilpirocarbonato.

Foram realizados treze testes, tendo sido inoculadas 130 plantas. Os resultados, representados na Tabela 4, não mostraram nenhuma planta infetada entre as que foram inoculadas.

5.1.3 - USANDO SUBSTÂNCIAS QUE PODERIAM IMPEDIR A AÇÃO DAS PROTEASES SOBRE A CAPA PROTEICA VIRAL

Considerando que a instabilidade "in vitro" do vírus do mosaico dourado do feijoeiro pudesse ser devida à susceptibilidade da sua capa proteica ao ataque das proteases que são liberadas no momento da trituração das folhas para extração do inóculo, foi tentado o uso de substâncias que poderiam impedir a ação dessas enzimas através dos seguintes mecanismos: por inibição ou inativação das mesmas; por saturação do sistema e competição pelos seus sítios ativos com consequente indução de inibição competitiva.

5.1.3.1 - Empregando substâncias químicas descritas como inibidoras ou inativadoras de proteases

A exemplo do que foi feito em testes anteriores nos quais foram usadas substâncias inibidoras de nucleases, nesta série de testes tentou-se preservar a capa proteica viral tanto por extração do inóculo na presença de inibidores de proteases como por extração a partir de folhas que haviam sido previamente tratadas com esses inibidores.

TABELA 4 - Resultados dos testes de transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro nos quais o inóculo foi extraído de folhas pré-tratadas por imersão do pecíolo em solução contendo inibidores de nucleases

Inibidores de nucleases e respectivas concentrações	Número de testes	Número de plantas inoculadas (INO) e infetadas (INF) empregando inóculo extraído em tampão fosfato 0,05 M, pH 8,5, contendo os inibidores de nucleases	
		INO	INF
Mistura de cátions: Zn^{++} , Mg^{++} e Fe^{+++} 0,02 M	2	20	0
Mistura de ânions: citrato e fluoreto 0,02 M	2	20	0
β -Mercaptoetanol 0,05 M	3	30	0
KCl 0,1 M	2	20	0
Mistura de bentonite - 2 g/l, PVS - 10 mg/l e DEP - 1 mg/l	3	30	0
Mistura de todos os inibidores de nucleases acima	3	30	0

Obs.: - Na mistura de inibidores de nucleases foram usadas as mesmas concentrações descritas acima para cada inibidor.

5.1.3.1.1 - Extração do inóculo na presença de inibidores ou inativadores de proteases

As substâncias usadas durante os testes realizados, foram: heparina, fluoreto de sódio e bissulfito de sódio, tidas como inibidoras de proteases e ácido iódico, um inativador dessas enzimas.

Nesses testes o inóculo foi extraído em solução tampão contendo as referidas substâncias e em seguida inoculado pelo método de fricção com carborundum já descrito.

Foram realizados 31 testes com um total de 310 plantas inoculadas. Os resultados estão representados na Tabela 5, e novamente não se pode observar nenhum resultado positivo na transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro.

5.1.3.1.2 - Extração do inóculo a partir de folhas infetadas pré-tratadas por imersão do pecíolo em soluções contendo inibidores de proteases

Continuando os experimentos realizados com o objetivo de impedir a ação das proteases sobre o VMDF durante o processo de transmissão mecânica, foram usadas as mesmas substâncias com propriedade de inibir ou inativar proteases empregadas anteriormente, com a diferença de que as trifoliadas infetadas que serviram como fonte do inóculo, sofreram um tratamento prévio no qual as referidas substâncias foram introduzidas nos tecidos foliares via xilema, conforme técnica já descrita.

TABELA 5 - Resultados obtidos em testes de transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro extraído-se o inóculo na presença de substâncias descritas como inibidoras ou inativadoras de proteases

Inibidores de proteases e respectivas concentrações, diluídos em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0	Número de testes	Número de plantas inoculadas (INO) e infetadas (INF)	
		INO	INF
Ácido iódico 0,005 M	8	80	0
Fluoreto de sódio 0,01 M	5	50	0
Bissulfito de sódio 0,05 M	7	70	0
Heparina a 1%	5	50	0
Mistura de todos os inibidores de proteases acima	6	60	0

Obs.: - Na mistura de inibidores de proteases foram usadas as mesmas concentrações descritas acima para cada inibidor.

Nessa fase dos experimentos foram realizados treze testes, nos quais 130 plantas receberam o inóculo pelo método de fricção com carborundum. Os resultados, discriminados na Tabela 6, foram todos negativos.

5.1.3.2 - Empregando macromoléculas proteicas numa tentativa de saturação do sistema e indução de inibição competitiva das proteases

Estes experimentos foram subdivididos em duas fases, de acordo com a composição da solução extratora.

5.1.3.2.1 - Extração do inóculo na presença de caseína, soro albumina bovina e hemoglobina, diluídas em tampão fosfato

Nas primeiras tentativas com o uso de macromoléculas proteicas foram utilizadas as seguintes substâncias: hemoglobina humana (cedida por Laboratório de Análises Clínicas de Campinas; concentração: 90g%); soro albumina bovina (comercial) e Caseína (Merck). Essas três proteínas foram diluídas em tampão fosfato para três concentrações finais. O método de inoculação usado também foi o de fricção com carborundum.

Nesta fase foram realizados 34 testes, nos quais foram inoculadas 327 plantas. Os resultados, discriminados na Tabela 7, não mostraram nenhuma planta infetada entre as que foram inoculadas.

TABELA 6 - Resultados obtidos em testes de transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro utilizando inóculo extraído de folhas pré-tratadas por imersão do pecíolo em solução contendo inibidores ou inativadores de proteases

Inibidores de proteases e respectivas concentrações, diluídos em tampão posfato 0,1 M, pH 7	Número de testes	Número de plantas inoculadas (INO) e infetadas (INF)	
		INO	INF
Ácido iódico 0,005 M	3	30	0
Fluoreto de sódio 0,01 M	2	20	0
Bissulfito de sódio 0,05 M	3	30	0
Heparina a 1%	2	20	0
Mistura de todos os inibidores de proteases acima	3	30	0

Obs.: - Na mistura de inibidores de proteases foram usadas as mesmas concentrações descritas acima para cada inibidor.

TABELA 7 - Resultados obtidos em testes de transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro extraíndo-se o inóculo na presença de hemoglobina humana, caseína e soro albumina bovina diluídas em tampão fosfato

Macroproteínas e respectivas concentrações diluídas em tampão fosfato 0,1 M , pH 7	Número de testes	Número de plantas inoculadas (INO) e infetadas (INF)	
		INO	INF
Hemoglobina humana 0,5%	3	28	0
Idem 1,0%	3	30	0
Idem 1,5%	3	29	0
Soro albumina bovina 0,5%	4	36	0
Idem 1,0%	3	30	0
Idem 1,5%	4	40	0
Caseína 0,5%	4	38	0
Idem 1,0%	3	30	0
Idem 1,5%	3	26	0
Mistura de todas as proteínas acima	4	40	0

Obs.: - Proporção das proteínas na mistura acima: Hemoglobina - 0,1% , soro albumina bovina - 0,1% e caseína 0,1% .

5.1.3.2.2 - Extração do inóculo na presença de caseína combinada ou não com outro aditivo químico, diluídos em diversos tampões

Nessa fase seguinte houve uma tentativa de combinar a ação de uma proteína com outros aditivos químicos com a função de redutores, quelantes, inibidores de nucleases, etc., a fim de anular efeitos múltiplos que pudessem estar interagindo no sentido de provocar a perda da infectividade da partícula viral. Foram inoculadas 603 plantas em 62 testes realizados. Os resultados estão representados na Tabela 8, não tendo aparecido nenhum caso de transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro.

5.1.4 - EXTRAÇÃO DO INOCULO NA PRESENÇA DE SUBSTÂNCIA FIXADORA DE TECIDOS

O glutaraldeído é uma substância bastante usada em microscopia eletrônica para fixação de tecidos, devido à sua propriedade de formar pontes de metileno, interligando polipeptídeos através de seus sítios ativos, tanto inter como intracelularmente. Isso possibilita a manutenção de certas estruturas como os sistemas intracelulares de microtubulos lâbeis e muitas outras, como partículas elementares ligadas às membranas mitocondriais.

Nesses experimentos, foram feitas tentativas de se explorar essas propriedades do glutaraldeído no sentido ou de preservar a estrutura da partícula viral, ou ainda de manter intactas certas organelas ou

TABELA 8 - Resultados obtidos em testes de transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro extraído-se o inóculo na presença de caseína combinada ou não com outro aditivo químico, diluídos em diversos tampões

Solução extratora contendo caseína 10^{-5} M				Número de testes	Número de plantas inoculadas (INO) e infetadas (INF)	
Tampão	Concentração (M)	Aditivo químico e respectiva concentração	pH		INO	INF
Fosfato	0,01	Mistura de EDTA 0,01 M e cisteína 0,001 M	5,0	2	20	0
Idem	"	Idem	8,0	2	20	0
Idem	0,02	Mercaptoetanol 0,005 M	8,5	3	30	0
Idem	"	Mistura de bentonite 2 g/l, PVS - 10 mg/l, DEP - 1 mg/l	8,5	6	56	0
Idem	"	Mistura de cátions: Zn^{++} , Mg^{++} e Fe^{+++} 0,02 M	8,5	4	40	0
Idem	"	Mistura de ânions: citrato e fluoreto 0,02 M	8,5	2	20	0
Idem	"	KCl 0,1 M	8,5	2	20	0
Idem	"	Mistura de inibidores de nucleases	8,5	3	30	0
Idem	0,1	Sem aditivo químico	5,0	3	30	0
Idem	0,01	Idem	5,0	7	68	0
Idem	"	Idem	8,0	8	76	0
Sacarose tamponada	0,3	Idem	8,0	3	30	0
NaCl-EDTA	"	Idem	8,0	3	29	0
Hepes	0,1	Idem	5,0	3	30	0
Idem	"	Idem	8,0	5	50	0
Idem	0,01	Idem	5,0	3	26	0
Idem	"	Idem	8,0	3	28	0

mesmo vesículas existentes nas células das folhas infetadas, que foram trituradas para extração do inóculo. Assim sendo, se o vírus estivesse localizado dentro de uma dessas organelas ou vesículas, poderia manter sua integridade estrutural e vir a ser infectivo quando fosse inoculado.

O inóculo, extraído na presença de soluções tamponantes de fosfato 0,1 M, pH 7, contendo glutaraldeído em cinco concentrações, foi inoculado pelo método de fricção com carborundum.

Foram feitos 15 testes, tendo sido inoculadas 150 plantas. Os resultados, representados na Tabela 9, foram todos negativos.

5.1.5 - EXTRAÇÃO DO INÓCULO A PARTIR DE FOLHAS INFETADAS PRÉ-CONGELADAS POR MEIO DE CO₂ SÓLIDO

O objetivo principal desses testes foi o de tentar preservar a integridade da partícula viral e portanto sua infetividade, por redução da temperatura e inibição de possíveis reações termolábeis que poderiam ocorrer no momento da extração, por ocasião da trituração dos tecidos foliares e liberação do suco intracelular. Pelo congelamento da folha antes da trituração, as reações que dependessem de temperaturas mais elevadas que a da folha congelada, seriam automaticamente inibidas. Depois de congeladas as folhas infetadas foram transformadas em pó, esse pó foi diluído na solução extratora, após o que o inóculo foi aplicado pelo método de fricção com carborundum.

Os resultados desses testes, se encontram na Tabela 10, no qual se pode observar que dentre as 320 plantas inoculadas nos 32 experimentos realizados, não houve nenhum resultado positivo de transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro.

TABELA 9 - Resultados obtidos em testes de transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro fazendo-se a extração do inóculo na presença de substâncias fixadoras de tecidos

Concentração de glutaraldeído (%) diluído em tampão fosfato 0,1 M , pH 7	Número de testes	Número de plantas inoculadas (INO) e infetadas (INF)	
		INO	INF
9,0	2	20	0
3,0	2	20	0
1,0	5	50	0
0,3	3	30	0
0,1	3	30	0

TABELA 10 - Resultados obtidos em testes de transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro utilizando inóculo extraído de folhas pré-congeladas com CO₂ sólido (gelo seco)

Aditivos químicos e respectivas concentrações	pH da solução extraída	Número de testes (Nº T), de plantas inoculadas (INO) e infetadas (INF) utilizando inóculo extraído em soluções preparadas com os tampões nas concentrações e pHs indicados, contendo os aditivos químicos relacionados											
		Tampão fosfato				Tampão hepes							
		0,1 M		0,01 M		0,1 M		0,01 M					
		Nº T	INO	INF	Nº T	INO	INF	Nº T	INO	INF	Nº T	INO	INF
MgCl ₂ 0,01 M	5	2	20	0	1	10	0	2	20	0	1	10	0
Idem	8	1	10	0	2	20	0	1	10	0	2	20	0
FeCl ₃ 0,01 M	5	2	20	0	1	10	0	2	20	0	1	10	0
Idem	8	1	10	0	2	20	0	1	10	0	2	20	0
Sem aditivo	5	1	10	0	1	10	0	1	10	0	1	10	0
Idem	8	1	10	0	1	10	0	1	10	0	1	10	0

5.1.6 - EMPREGANDO QUATRO DIFERENTES MÉTODOS, TRÊS DOS QUAIS FORAM USADOS COM SUCESSO NA TRANSMISSÃO MECÂNICA DE VÍRUS SEMELHANTE POR INVESTIGADORES DE OUTROS PAÍSES

Como já se sabe, o vírus do mesmo grupo que ocorre em outros países da América Latina, tem sido transmitido mecanicamente com bons resultados, através de métodos de extração e inoculação relativamente simples. Nos testes aqui descrito foram feitas tentativas de transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro existente nos estados de São Paulo e Paraná - Brasil, empregando os métodos de extração e inoculação usados com sucesso para transmissão mecânica do vírus semelhantes de Porto Rico, Colômbia e El Salvador. Foi usado também um quarto método, que tem sido empregado com bons resultados na transmissão mecânica de outros fitovírus na Seção de Virologia do Instituto Agronômico de Campinas, o qual foi designado como método "4".

Nos quatro métodos empregados, a inoculação foi feita por fricção com carborundum e a solução tampão utilizada em todos eles foi a de fosfato 0,1 M. O que diferenciou um método do outro foi o pH e aditivo químico de cada solução extratora como segue: a) MEINERS *et alii* (1973) - somente solução tampão com pH 6,8 ; b) GALVEZ e CASTAÑO (1976) - β -mercaptoetanol a 1% e pH 7 ; c) GOODMAN *et alii* (1976) - 0,1 M de EDTA, 0,001 M de cisteína e pH 7,8 ; d) método "4" - 0,1 M de sulfito de sódio e pH 8 .

Paralelamente, foram feitos outros testes seguindo os mesmos detalhes de metodologia, utilizando os mesmos aditivos químicos, porém, mudando as concentrações das soluções tampões de 0,1 para 0,01 M.

As variedades de feijoeiro empregadas nesses testes foram em número de 15: Floresta , Roxoti , Roseli , Moruna , Roxão lustroso , Arroana , Carioca , F. R. S. Luiz , Rouxinho Catiara , Manteiga , Red Kidney , três cultivares de Rosinha (G-2 , G-3 e G-4) e Preto. Em adição foram usadas três outras espécies de *Phaseolus*: *P. longepedunculatus*, *P. acutifolius* e *P. lunatus*. Em cada teste as plantas de feijoeiro ou outras que serviriam como receptoras do inóculo foram inoculadas em dois tamanhos: a) o que foi designado como tamanho 1 correspondeu a plantas contendo somente as duas folhas primárias com aproximadamente 2/3 do seu tamanho definitivo ; b) o tamanho 2 às plantas mais velhas, ou seja , àquelas contendo as primeiras trifoliadas.

Foram inoculadas 4.768 plantas nos 120 testes realizados, distribuídos segundo concentração da solução tampão utilizada e tamanho de planta-teste receptora conforme discriminado na Tabela 11 . Os dados obtidos, expressos na referida Tabela, não mostraram nenhum resultado positivo.

TABELA 11 - Resultados obtidos em testes de transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro, utilizando-se diferentes métodos em diferentes variedades de plantas-teste

Métodos empregados	Tamanho * das plantas-teste recepto - ras	Número de plantas inoculadas (INO) e infectadas (INF) nos 120 testes realizados com as diversas variedades e cultivares de feijoeiro, usando tampão fosfato nas concentrações indicadas			
		0,1 M		0,01 M	
		INO	INF	INO	INF
MEINERS	1	300	0	300	0
Idem	2	300	0	300	0
GOODMAN	1	290	0	296	0
Idem	2	300	0	294	0
GALVEZ e CASTAÑO	1	300	0	298	0
Idem	2	296	0	300	0
Método "4"	1	296	0	298	0
Idem	2	300	0	300	0

(*) O tamanho 1 correspondeu a plantas portando somente as duas folhas primárias com aproximadamente 2/3 do seu tamanho definitivo.

O tamanho 2 correspondeu a plantas num estágio mais avançado de crescimento, apresentando já as primeiras trifoliadas.

5.2 - VERIFICAÇÃO DE POSSÍVEL ESTABILIDADE DIFERENCIAL DE COMPONENTES DO VÍRUS

Apesar do insucesso nos testes de purificação do vírus do mosaico dourado do feijoeiro existente no Brasil, até o momento, alguns resultados preliminares parecem indicar ser ele constituído por duas partículas formando um dímero (MATYIS *et alii*, 1975), a exemplo do que ocorre com o vírus do mesmo grupo em outros países da América.

Considerando então esse vírus de morfologia dîmera, foi testado nesses experimentos a hipótese de terem essas partículas estabilidades diferentes em relação ao pH da solução extratora. A abordagem dessa hipótese foi feita através de experimentos nos quais foram feitas duas extrações em soluções de diferentes pHs e duas inoculações que variaram em metodologia e intervalo entre uma e outra.

5.2.1 - DUAS INOCULAÇÕES SEGUIDAS SOBRE AS MESMAS FOLHAS EMPREGANDO O INÓCULO EXTRAÍDO EM SOLUÇÕES DE DIFERENTES PHs

Na execução destes testes, o inóculo foi dividido em duas partes iguais e triturado em duas soluções extratoras que diferiam entre si somente em relação ao pH, ácido ou básico (pH 5 e pH 8). O inóculo, extraído em solução ácida, foi inoculado em primeiro lugar e o outro logo em seguida, sobre as mesmas folhas. O método de inoculação foi o de fricção com carborundum.

Foram realizados 34 testes, nos quais 340 plantas receberam o inóculo. Os resultados se encontram na Tabela 12, sendo que foram todos negativos.

5.2.2 - DUAS INOCULAÇÕES SOBRE AS MESMAS FOLHAS COM INTERVALO DE TRÊS DIAS ENTRE A PRIMEIRA E A SEGUNDA INOCULAÇÃO, USANDO INÓCULO EXTRAÍDO EM SOLUÇÕES DE DIFERENTES PHs E EMPREGANDO DIFERENTES MÉTODOS DE INOCULAÇÃO

Continuando a verificação de possível diferença de estabilidade entre componentes do dímero que constitui a partícula viral, foram inseridas algumas variáveis: diferentes métodos de inoculação e intervalo de três dias entre a primeira e a segunda inoculação. O objetivo foi testar se a primeira partícula necessitava de um certo período para se estabelecer na planta antes que a segunda fosse inoculada, além de procurar encontrar um método de inoculação mais adequado.

A exemplo dos testes anteriores, após a trituração do inóculo em solução extratora com pH 5, foi efetuada a primeira inoculação. Nas dez plantas usadas em cada teste, o inóculo foi aplicado do seguinte modo: nas quatro primeiras plantas por fricção com carborundum na face superior da folha, nas quatro seguintes por fricção com carborundum na face inferior da folha e nas duas últimas, por picadas de alfinete, conforme técnica já descrita anteriormente. Depois essas plantas foram para estufas apropriadas, onde permaneceram por três dias. Após esse período receberam novamente o inóculo, desta vez extraído em solução extratora com pH 8, que foi inoculado pelas mesmas técnicas usadas na primeira inoculação para cada planta-teste receptora.

Foram inoculadas 200 plantas nos 20 testes realizados. Os resultados, discriminados na Tabela 13, foram todos negativos.

TABELA 13 - Resultados dos testes em que o inóculo preparado com soluções extratoras em dois diferentes pHs (5 e 8) foi inoculado sobre as mesmas folhas com intervalo de tempo igual a três dias entre a 1ª e a 2ª inoculação, usando diferentes métodos

Inoculação	Aditivos e respectivas concentrações	Tampão	pH	Número de testes (Nº T), de plantas inoculadas (INO) e infetadas (INF) utilizando inóculo extraído em soluções preparadas em dois diferentes pHs nas concentrações abaixo, e empregando diferentes métodos de inoculação												
				0,1 M						0,01 M						
				Fricção com carborundum na face da folha			Picadas de alfinete			Fricção com carborundum na face da folha			Picadas de alfinete			
				Nº T	Superior	Inferior	INO	INF	INO	INF	Superior	Inferior	INO	INF		
1ª	Mistura de cisteína na 0,001 M e EDTA 0,01 M	Fosfato	5	3	12	0	12	0	6	0	12	0	12	0	6	0
2ª	Idem	Idem	8													
1ª	Sem Aditivo	Idem	5	3	12	0	12	0	6	0	12	0	12	0	6	0
2ª	Idem	Idem	8													
1ª	Mistura de cisteína na 0,001 M e EDTA 0,01 M	Hepes	5	2	8	0	8	0	4	0	8	0	8	0	4	0
2ª	Idem	Idem	8													
1ª	Sem aditivo	Idem	5	2	8	0	8	0	4	0	8	0	8	0	4	0
2ª	Idem	Idem	8													

5.3 - VERIFICAÇÃO DE POSSÍVEL EFEITO SINÉRGICO DO VÍRUS DO MOSAICO DOURADO DO TOMATEIRO SOBRE A TRANSMISSÃO MECÂNICA DO VÍRUS DO MOSAICO DOURADO DO FEIJOEIRO

Nestes testes foi tentado o uso de um vírus do mesmo grupo morfológico do mosaico dourado, portanto também constituído por um díme-ro, e que tem sido transmitido mecanicamente com certa facilidade, para testar se não haveria um efeito sinérgico quando em conjunto com o vírus do mosaico dourado do feijoeiro, facilitando ou promovendo de alguma maneira a transmissão mecânica do mesmo.

A hospedeira do vírus do mosaico dourado do tomateiro empregada foi a planta de fumo TNN (*Nicotiana tabacum* L.). Para execução dos testes, foram coletadas quantidades iguais de folhas de fumo e de feijoeiro infetadas com os vírus do mosaico dourado do tomateiro e do mosaico dourado do feijoeiro respectivamente, e trituradas em almofariz contendo solução extratora na proporção de 2/5 (gramas de folha/ml de solução). Em cada teste, foram inoculadas oito plantas de feijoeiro e três plantas de fumo, perfazendo 128 e 48 plantas respectivamente, nos 16 testes realizados.

Nos resultados, discriminados na Tabela 14, pode-se observar pelo número de plantas de fumo infetadas, que o vírus do mosaico dourado do tomateiro, como de costume, apresentou bons resultados de transmissão mecânica, o que não ocorreu com o vírus do mosaico dourado do feijoeiro, cujos resultados foram todos negativos.

QUADRO 14 - Resultados dos testes em que se procurou verificar possível efeito sinérgico do vírus do mosaico dourado do tomateiro sobre a transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro

pH da solução extratora	Tampão fosfato			Tampão hepes		
	0,1 M	0,01 M	0,1 M	0,1 M	0,01 M	0,01 M
	Feijão	Fumo	Feijão	Fumo	Feijão	Fumo
5	16	0	6	4	16	0
	INO	INF	INO	INF	INO	INF
8	16	0	6	3	16	0
	INO	INF	INO	INF	INO	INF

5.4 - TENTATIVAS DE INDUÇÃO DE MUTANTES TRANSMISSÍVEIS MECANICAMENTE ATRAVÉS DO USO DE SUBSTÂNCIAS MUTAGÊNICAS

Após todos os experimentos iniciais visando obter transmissão do VMDF por métodos mecânicos sem nenhum indício de resultado positivo, tentou-se induzir mutação no complexo normal desse vírus encontrado aqui no Brasil, objetivando com isso conseguir uma estirpe resultante do mesmo que fosse transmissível mecanicamente. Quatro foram as substâncias empregadas nesses testes: hidroxilamina, 5-bromouracil, ester etílico do ácido metanosulfônico e azida sódica. Essas substâncias foram diluídas em tampão fosfato com pH na faixa ácida (6,2) e neutra (7) para duas concentrações finais: 10^{-3} e 10^{-6} M.

As tentativas de indução de mutantes através do uso das substâncias mutagênicas acima citadas foram efetuadas de diferentes modos: fazendo-se a extração do inóculo por trituração das folhas diretamente na presença dos mutagênicos e extraíndo-se o inóculo de folhas ou plantas infetadas previamente tratadas com mutagênicos.

5.4.1 - EXTRAÇÃO DO INÓCULO NA PRESENÇA DE SUBSTÂNCIAS MUTAGÊNICAS

Inicialmente foi tentado indução de mutação somente pela extração do inóculo na presença de mutagênicos. Portanto as folhas infetadas foram trituradas na solução extratora contendo o mutagênico e o extrato foliar foi inoculado pelo método de fricção com carborundum.

Foram efetuados 22 testes, nos quais foram inoculadas 200 plantas. Nos resultados, expressos na Tabela 15, não apareceu nenhum mu tante que fosse transmissível mecanicamente.

5.4.2 - EXTRAÇÃO DO INÓCULO A PARTIR DE FOLHAS INFETADAS PRÉ-TRATADAS POR IMERSÃO DO PECÍOLO EM SOLUÇÃO CONTENDO SUBSTÂNCIA MUTAGÊNICA

Continuando as tentativas de indução de mutantes transmissíveis mecanicamente, nessa segunda fase foi feito um tratamento prévio das folhas que serviram como fonte de inóculo. A solução contendo mutagênico foi introduzida nos tecidos foliares via xilema através do pecíolo, segundo a mesma técnica já descrita anteriormente. Depois de um período de 24 a 30 horas em que as folhas ficaram com pecíolo mergulhado na solução contendo os mutagênicos, elas foram trituradas na presença da mesma solução-teste e o extrato foliar foi inoculado por fricção com carborundum.

Foram efetuados 22 testes, nos quais 220 plantas foram inoculadas. Os resultados, representados na Tabela 16, não mostraram nenhum caso positivo de transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro.

TABELA 15 - Resultados dos testes em que se tentou a indução de mutantes do vírus do mosaico dourado do feijoeiro extraíndo-se o inóculo na presença de substâncias mutagênicas

Substâncias mutagênicas	Concentração (M)	Número de testes (Nº T), de plantas inoculadas (INO) e infetadas (INF) com o inóculo extraído em tampão fosfato 0,1 M nos pHs indicados, contendo os mutagênicos					
		6.2			7		
		Nº T	INO	INF	Nº T	INO	INF
Hidroxilamina	10^{-6}	2	20	0	3	30	0
Idem	10^{-3}	3	30	0	2	20	0
5-bromouracil	10^{-6}	2	20	0	3	30	0
Idem	10^{-3}	2	20	0	3	30	0
Ester etílico do ácido metanosulfônico	10^{-6}	2	20	0	3	30	0
Idem	10^{-3}	3	30	0	2	20	0
Azida sódica	10^{-6}	2	20	0	3	30	0
Idem	10^{-3}	3	30	0	3	30	0
Controle (sem substância mutagênica)	---	3	30	0	3	30	0

TABELA 16 - Resultados dos testes em que se tentou a indução de mutantes do vírus do mosaico dourado do feijoeiro fazendo-se a extração do inóculo de folhas infetadas pré-tratadas por imersão do pecíolo em solução contendo mutagênico

Substâncias mutagênicas	Concentração (M)	Número de testes (Nº T), de plantas inoculadas (INO) e infetadas (INF) usando inóculo de folhas infetadas pré-tratadas por imersão do pecíolo em tampão fosfato 0,1 M nos pHs indicados, contendo as substâncias mutagênicas					
		6,2			7		
		Nº T	INO	INF	Nº T	INO	INF
Hidroxilamina	10^{-6}	3	30	0	3	30	0
Idem	10^{-3}	2	20	0	3	30	0
5-bromouracil	10^{-6}	2	20	0	2	20	0
Idem	10^{-3}	2	20	0	3	30	0
Ester etílico do ácido do metanosulfônico	10^{-6}	2	18	0	3	30	0
Idem	10^{-3}	3	30	0	3	30	0
Azida sódica	10^{-6}	2	20	0	2	20	0
Idem	10^{-3}	3	30	0	3	30	0
Controle (sem substância mutagênica)	---	3	30	0	3	30	0

5.4.3 - EXTRAÇÃO DO INÓCULO A PARTIR DE PLANTAS PRÉ-TRATADAS POR IMERSÃO DAS RAÍZES EM SOLUÇÕES CONTENDO MUTAGÊNICOS

Nesta terceira fase dos experimentos em que se tentou indução de mutação no complexo normal do vírus do mosaico dourado do feijoeiro, novamente foi introduzida a solução mutagênica nos tecidos foliares, só que desta vez toda a planta infetada foi tratada por imersão das raízes na referida solução. Nestes testes as plantas foram especialmente inoculadas com o auxílio da mosca branca para esse fim, e usadas quando apareceram os primeiros sintomas de mosaico dourado, ou seja, cerca de 20 dias após a inoculação. Nessa época as plantas foram cuidadosamente arrancadas dos vasos para que suas raízes não fossem danificadas, essas foram lavadas em água corrente para retirada do excesso de solo aderido em suas superfícies, e mergulhadas num recipiente contendo a solução com mutagênico. Após um período de 24 a 72 horas que essas raízes ficaram mergulhadas na solução - teste, as folhas mais viçosas e que apresentavam sintomas mais visíveis foram destacadas da planta e trituradas em almofariz na presença da mesma solução contendo mutagênico. O extrato foliar foi inoculado por fricção com carborundum.

Foram inoculadas 360 plantas nos 36 testes realizados, e os resultados se encontram na Tabela 17. Também nessa série de testes não houve aparecimento de resultados positivos.

TABELA 17 - Resultados dos testes em que se tentou a indução de mutantes do vírus do mosaico do feijoeiro fazendo-se a extração do inóculo de plantas infetadas pré-tratadas por imersão das raízes em soluções contendo substâncias mutagênicas

Substância mutagênica	Concentração (M)	Número de testes (Nº T), de plantas inoculadas (INO) e infetadas (INF) utilizando do inóculo de plantas infetadas pré-tratadas por imersão das raízes em tampão fosfato 0,1 M nos pHs indicados, contendo substâncias mutagênicas					
		6,2			7		
		Nº T	INO	INF	Nº T	INO	INF
Hidroxilamina	10^{-6}	4	40	0	3	30	0
Idem	10^{-3}	4	40	0	3	30	0
5-bromouracil	10^{-6}	3	30	0	2	20	0
Idem	10^{-3}	4	40	0	3	30	0
Azida sódica	10^{-6}	3	30	0	3	30	0
Idem	10^{-3}	4	40	0	2	20	0
Ester etílico do ácido do metanosulfônico	10^{-6}	4	40	0	2	20	0
Idem	10^{-3}	5	50	0	5	50	0
Controle (sem substância mutagênica)	---	5	50	0	3	30	0

6 - DISCUSSÃO

A transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro no Brasil é problema cuja solução tem sido exaustivamente procurada por vários investigadores (COSTA, 1965 ; FLORES e SILBERSCHMIDT, 1966 ; COSTA, 1976 ; COSTA, dados não publicados), mas que até o momento não pode ser encontrada. No presente trabalho realizou-se um grande número de experimentos, nos quais a transmissão mecânica do VMDF foi tentada através de diferentes maneiras de abordagem, variando: origem do inóculo, métodos de extração e inoculação, plantas-teste doadoras e receptoras do vírus, etc.

As várias amostras de plantas infetadas, empregadas para extração do inóculo, tanto foram coletadas daquelas mantidas em estufas, como de plantas de campo, vindas de diversos locais de Campinas e região, e de outras regiões do Estado de São Paulo e Paraná. Embora tenham sido testados inóculos de muitas origens, nenhum resultado positivo de transmissão mecânica foi conseguido. Portanto, a não transmissibilidade do

vírus por métodos mecânicos é um fato que se estende a todos os complexos normais testados e, se realmente existe algum outro que seja transmissível mecanicamente, ainda não pode ser encontrado.

A idéia de que a dificuldade na transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro pudesse estar ligada à baixa concentração deste na preparação inoculada, fez com que o problema fosse abordado sob dois aspectos: a) utilização de folhas infetadas de diferentes tamanhos, coletadas de plantas em diferentes estágios da doença ; b) variação na quantidade de folhas infetadas para o volume de solução extratora empregada. No primeiro caso foi dada uma cobertura tão ampla quanto possível, utilizando para extração do inóculo folhas infetadas de várias idades, desde aquelas bem jovens até as que já possuíam aproximadamente seu tamanho máximo de expansão, coletadas de plantas em vários estágios da doença, ou seja, desde as recém infetadas (cerca de 20 dias após inoculação com mosca branca virulífera) na ocasião do aparecimento dos primeiros sintomas, até aquelas em início de florescimento, quando a moléstia se encontrava num estágio bem mais avançado. No segundo caso, foram empregadas quantidades crescentes de folhas infetadas na solução extratora, até um ponto máximo, no qual se inoculou somente o pó resultante das folhas pré-congeladas trituradas. Os resultados negativos dos experimentos realizados, considerando todos esses parâmetros, não deixaram nenhuma dúvida quanto ao fato de não ter sido a concentração o fator limitante na transmissão mecânica.

Quanto à hipótese de as plantas - teste doadoras e receptoras do inóculo poderem ser responsabilidades pela dificuldade de se conseguir a transmissão mecânica do VMDF, é considerada pouco provável, desde que

no presente trabalho foram empregadas, tanto para doar como para receber o vírus, plantas de diferentes idades representando diversas variedades de *Phaseolus vulgaris* e três outras espécies do gênero.

Ênfase especial foi dada aos métodos de extração, com o auxílio dos quais foram investigadas muitas hipóteses formuladas no decorrer deste trabalho. Na primeira fase foi feita uma triagem de diversas soluções extratoras, preparadas com tampões de concentrações e pHs variados, aos quais, haviam ou não, sido adicionadas substâncias consideradas capazes de preservar a infetividade do inóculo, por agirem como quelantes, reduzoras, ativadoras de inóculo, etc. (MATTHEWS, 1970). Entretanto, apesar de as soluções extratoras empregadas nesses experimentos serem eficientes para a transmissão mecânica da maioria dos fitovírus, o uso destas não conduziu a nenhum resultado positivo com o vírus do mosaico dourado do feijoeiro, indicando a necessidade de novas investigações para o problema.

Os resultados de experimentos posteriores, estudando a possibilidade de o vírus estar sendo degradado por enzimas como nucleases, que sabidamente podem inibir a infetividade viral (LORING, 1942 ; FRANCKI, 1968 ; MATTHEWS, 1970), também foram negativos. Nova possibilidade seria a de que outras enzimas como as proteases, cuja ação também é conhecida como capaz de diminuir a infetividade viral (BAWDEN e PIRIE, 1932 ; STANLEY, 1934), estivessem provocando a degradação da capa proteica viral e expondo seu ácido nucleico à ação de substâncias que causariam a sua inativação. Entretanto, tanto o uso de inibidores de proteases como o de macroproteínas visando impedir a ação dessas enzimas sobre o vírus foram

totalmente sem efeito, não tendo induzido o aparecimento de nenhum caso de transmissão mecânica do VMDF.

Com o emprego de glutaraldeído, pensou-se que a possível manutenção de alguma estrutura celular como organela ou vesícula, poderia oferecer a chance de se preservar dentro delas partículas intactas do vírus que pudessem ser infectivas quando inoculadas. Mas foram frustradas todas as esperanças nesse sentido, pois em nenhuma das concentrações empregadas, o glutaraldeído pode contribuir para a obtenção de resultados positivos. O congelamento da folha infetada com CO₂ sólido antes da trituração para extração do inóculo objetivando impedir reações termolábeis, também com nada contribuiu para mudança dos resultados até então obtidos.

As investigações realizadas na fase em que se empregou os métodos que têm sido utilizados para transmissão mecânica (embora não difiram muito dos de rotina) do vírus semelhante existente na Colômbia, Porto Rico e El Salvador (MEINERS *et alli*, 1973 ; GALVEZ e CASTAÑO, 1976 ; GOODMAN *et alii*, 1976) novamente a nada conduziram apesar de terem sido inoculadas milhares de plantas de feijoeiro de muitas variedades como doadoras e receptoras de inóculo, inclusive aquelas que foram usadas com sucesso naqueles países, e mesmo de se ter tentado variar essas soluções extratoras, mostrando possuir o vírus do mosaico dourado do feijoeiro existente no Brasil, características peculiares que não o identificam como o existente nos outros países da América Latina.

Uma outra hipótese testada foi a possibilidade de haver diferença de estabilidade em componentes da partícula viral. Mas não houve confirmação dela quando o vírus extraído em duas soluções de diferentes

pHs foi inoculado duas vezes seguidas sobre as mesmas folhas, ou duas vezes com intervalo entre a primeira e a segunda inoculação. Em outros experimentos onde foi utilizado outro vírus do mesmo grupo morfológico, o vírus do mosaico dourado do tomateiro, em mistura com o inóculo, para averiguar se não haveria um efeito sinérgico ou complementar entre os dois vírus, que permitisse a transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro, também não se conseguiu resultados positivos.

No decorrer dos experimentos realizados foram empregadas também algumas variações na metodologia de inoculação, sem nenhum resultado positivo, de modo que provavelmente a causa da não transmissibilidade do VMDF por métodos mecânicos não deve estar ligada a essa metodologia. E, uma vez que se trabalhou sob condições ambientes bem variadas em relação à temperatura, umidade, etc, certamente não serão esses parâmetros os fatores decisivos na resolução desse problema.

Não se considera que a transmissão mecânica do VMDF seja impossível, apesar do número de resultados negativos existentes. Neste trabalho foram mostrados os dados preliminares obtidos em experimentos nos quais se tentou induzir mutantes do complexo normal desses vírus, transmissíveis mecanicamente. Esses resultados são ainda negativos, mas outros testes deverão ser feitos com a mesma finalidade. Acredita-se na possibilidade de aparecer uma estirpe que seja capaz de manter sua infetividade durante o processo de transmissão mecânica.

Os numerosos testes realizados, visando a transmissão mecânica do VMDF no Brasil com resultados negativos, indicam ser esse vírus de

muito baixa estabilidade *in vitro*. Apoiando essa afirmativa existem os resultados das tentativas de purificação com ele realizadas (MATYIS *et alii*, 1975 ; SILVA, dados não publicados), que embora estejam sendo feitas repetindo os mesmos métodos usados com sucesso na purificação do vírus semelhante existente nos outros países, não têm sido satisfatórios, pois as partículas purificadas não são infectivas quando inoculadas mecanicamente na planta de feijoeiro e a estrutura morfológica visualizada ao microscópio eletrônico não confirma com precisão o dímero que deve constituir a partícula viral.

Todas essas evidências experimentais obtidas mostram claramente que o vírus do mosaico dourado do feijoeiro no Brasil deve ser diferente daquele existente nos outros países da América Latina, que é considerado como sendo relativamente estável *in vitro* (GALVEZ, comunicação pessoal), além de ser facilmente transmissível por métodos mecânicos. Não seria admissível, caso o vírus do Brasil fosse idêntico ao daqueles países, que os resultados dos experimentos aqui relatados, nos quais mais de 10.000 plantas foram inoculadas, inclusive com utilização dos mesmos métodos empregados com sucesso para transmissão mecânica daquele vírus, fossem todos negativos.

7 - CONCLUSÕES

O vírus do mosaico dourado do feijoeiro não foi transmissível por inoculação mecânica através de técnicas de rotina. Também não foi transmitido quando foram feitas inúmeras modificações nos diversos fatores que poderiam influenciar a estabilidade da preparação viral ou o processo de infecção.

As evidências experimentais obtidas indicam que o vírus do mosaico dourado do feijoeiro existente no Brasil deve possuir características peculiares que o tornam bastante instável *in vitro*, provocando a perda de sua infetividade durante o processo de preparação do inóculo para transmissão mecânica.

Apesar de o vírus do Brasil e o dos outros países da América Latina terem a mesma morfologia, induzirem os mesmos sintomas em feijoeiro, serem transmitidos pela mesma mosca branca vetora e terem o mesmo círculo de hospedeiras, são diferentes em alguma particularidade que determina sua divergência de comportamento *in vitro*.

8 - SUMMARY

Bean golden mosaic virus in Brazil has not been transmitted mechanically by investigators that have tried it. Other related viruses associated with similar diseases present in Central America, Porto Rico, and Colombia have been transmitted by routine methods of mechanical inoculation without great difficulty. This apparent discrepancy led the writer to start a series of tests aiming at developing a technique that would permit mechanical transmission of the Brazilian virus. Several approaches were tried - (1) *Variations in the source of inoculum* : (a) samples collected from several regions in the State of São Paulo and from other parts of Brazil ; (b) inocula collected from different donor plant species ; (c) inocula collected from recently infected plants and at various intervals thereafter ; (d) inocula prepared at different concentrations. (2) *Different methods of extraction and use of various extracting solutions*: (a) use of virus activators ; (b) use of inhibitors of nucleases and proteases or of

other substances employed to preserve the integrity of the viral particles; (c) extraction of the inoculum in different solutions and combination at inoculation time or through two successive inoculation ; (d) extration after freezing the samples. (3) *Different methods of inoculations:* (a) rubbing on both sides of the leaves ; (b) pin pricks on leaves and stems ; (c) repeated inoculation of same leaves with same or different preparations. (4) *Use of different tests plants to receive the inoculum:* a) different species of *Phaseolus* or other susceptible species ; (b) differerent varieties of beans, including those used successfully by other investigators ; (c) inocula applied to plants of different ages ; (d) inoculation on primary leaves or on the trifoliate ones.

In another series of tests , the three methods used successfully by other investigators in the transmission of the bean golden mosaic viruses from other countries were compared with the standard procedure used at the Seção de Virologia , Instituto Agronômico. The four methods of preparing the inocula and applying them to the test plants were tried on a number of bean varieties.

All the variations in techniques as described above were tried over a period of two years without positive results. Also, attempts were made to induce mutants from the normal bean golden mosaic virus complex that would pass mechanically. The results were also negative.

The experimental evidence obtained so far indicate that the isolates of the Brazilian bean golden mosaic virus that were tried do not pass mechanically by methods that transmitted the bean golden mosaic viruses

present in other countries. This fact is considered as evidence that in spite of the similarity between the disease found in Brazil and elsewhere, the causal viruses must be different and the Brazilian isolates less stable *in vitro*.

The lack mechanical transmission of the Brazilian virus as experienced so far is not considered final. It is possible that a variation of technique not tried yet, the finding of a more stable isolate or of a more adequate test plant will lead to success obtaining mechanical transmission of the Brazilian bean golden mosaic virus.

9 - LITERATURA CITADA

- ALMEIDA, L. D.; PEREIRA, J. C. V. N. A.; RONZELI, P. J. e COSTA, A. S., 1979. Avaliação das perdas causadas pelo mosaico dourado do feijoeiro em condições de campo. *In: II Congresso Paulista de Fitopatologia*, Campinas, mimeografado
- BAWDEN, F. C.; e PIRIE, N. W., 1936. Experiments on the chemical behaviour of potato virus X. *But. J. Exptl. Pathol.*, 17: 64 - 74.
- BIRD, J.; PEREZ, E.; ALCONERO, R.; VAKILI, N. G. e MELENDEZ, L., 1972. A whitefly-transmitted golden yellow mosaic virus of *Phaseolus lunatus* in Puerto Rico. *Journ. Agric. Un. Puerto Rico*, 56(1): 64 - 74.
- BIRD, J.; RODRIGUES, R.; MONLLOR, A.C. e SANCHEZ, J., 1977. Transmission del mosaico dorado de la habichuela (*Phaseolus vulgaris*) en Puerto Rico por medios mecanicos. *Fitopatología*, 12(1): 28 - 30.

- BIRD, J.; SANCHEZ, J.; RODRIGUEZ, R. L. e JULIÁ, F. J., 1975. Rugaceous (whitefly- transmitted) viruses in Puerto Rico. In: BIRD, J. e MARAMOROSCH, K., eds. *Tropical diseases of legumes*, New York, - San Francisco - London. Academic Press. Inc. pp. 3 - 25.
- COSTA, A.S., 1965. Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brasil. *FAO Plant Protection Bull.*, 13(6): 121 - 130.
- COSTA, A. S., 1975. Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat of widespread virus infection of legumes crops in Brazil. In: BIRD, J. e MARAMOROSCH, K., eds. *Tropical diseases of legumes*. New York - San Francisco - London. Ac. Press, Inc. pp. 27 - 49.
- COSTA, A. S. 1976. Whitefly-transmitted plant diseases. *Ann.Rev. of Phitopathol.*, 16:429 - 449.
- FLORES, E., SILBERSCHMIDT, K., 1966. Studies on a new virus diseases of *Phaseolus longepedunculatus*. *An. Acad. Brasileira Cienc.*, 38(2) : 327 - 334.
- FRANCKI, R.I.B., 1968. Inactivation of cucumber mosaic virus (Q strain) nucleoprotein by pancreatic ribonuclease. *Virology*, 34:694 - 700.
- GALVEZ, G. E., CASTAÑO, M., 1976. Purification of whitted bean golden yellow mosaic virus. *Turrialba*, 26(2): 205 - 207.
- GAMEZ, R., 1977. Las enfermedades virales como factores limitantes en la producción del frijol (*Phaseolus vulgaris*) em America Latina, - *Turrialba*, 12(1): 24 - 27.

- GOODMAN, R. M., 1977. Single stranded DNA genome in a whitefly-transmitted plant virus. *Virology*, 83: 171 - 179.
- GOODMAN, R. M.; BIRD, J.; e THONGMEEARKOM, P., 1976. An unusual virus-like particle associated with golden yellow mosaic of beans. *Phitopathology*, 67: 37 - 42.
- LORING, H. S., 1942. The reversible inactivation of tobacco mosaic virus by crystalline ribonuclease. *Journ. Gen. Physio.*, 25:497 - 505.
- MATTHEWS. R. E. F., 1970. *Plant Virology*. New York - San Francisco - London. Academic Press, Inc. 778pp.
- MATYIS, J. C.; SILVA, D. M., OLIVEIRA, A. R. e COSTA, A. S., 1975. Purificação e morfologia do v̄irus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica*, 1:267 - 274.
- MEDINA, J. C., 1972. O feij̄o no Brasil. *Anais do I Simp̄sio Brasileiro - do Feij̄o*. Campinas, SP. Brasil, pp. 3 - 106.
- MEINERS, J. P.; LAWSON, R. H.; SMITH, F. F. e DIAZ, A. J., 1973. Mechanical transmission or a whitefly-borne disease agent of beans in El Salvador. *Phytopathology*, 63: 803 - 804.
- MENTEN, J. O. M.; TULMAN, A. N. e ANDO, A., 1979. Avaliaç̄o de danos causados pelo v̄irus do mosaico dourado do feijoeiro . In: *II Congresso - Paulista de Fitopatologia*. Campinas, Mimeografado.
- PIERRE, R. E., 1975. Observations on the golden mosaic of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Jamaica. In: BIRD, J. e MARAMOROSCH, K. eds. *Tropical diseases of legumes*. New York - San Francisco - London. Ac. Press, Inc. pp. 55 - 59.

STANLEY, W. M., 1934. Chemical studies on the virus of tobacco mosaic.

I. Some effects of trypsin. *Phytopathology*, 24: 1055 - 1085.

WILLIAMS, R. J., 1976. A whitefly-transmitted golden yellow mosaic of

lima beans in Nigeria. *Plant.Dis.Rep.*, 60(10): 853 - 857.