

**ALUISIO PAIVA DE CARVALHO ALBA**

Engenheiro Agrônomo  
Bioquímica Fitopatológica  
Instituto Biológico - São Paulo  
Bolsista do CNPq

**" ESTUDOS SOROLÓGICOS DE VÍRUS DO GRUPO  
DO VÍRUS Y DA BATATA , QUE OCORREM  
NO ESTADO DE SÃO PAULO "**

*Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadu-  
al de Campinas, para a obtenção  
do título de Doutor em Ciências.*

Orientador:

Prof. Dr. AVELINO RODRIGUES DE OLIVEIRA

Campinas  
- são paulo -  
1 9 7 5

BIBLIOTECA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
UNICAMP

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

*A meus pais e a minha mulher,  
dedico*

## AGRADECIMENTOS

Nossos sinceros agradecimentos aos Doutores, Professores, Técnicos, Auxiliares e aos amigos, os quais, quer pela orientação, incentivo, fornecimento de material, auxílio, sugestões ou revisão dos originais, concorreram efetivamente para a execução e apresentação desta Tese.

Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira

Universidade Estadual de Campinas

Dra. Walkyria Bueno de Camargo Moraes Figueiredo

Instituto Biológico

Prof. Dr. Darcy Martins da Silva

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Dr. Alvaro Santos Costa

Instituto Agrônômico

Dr. Mario Barreto Figueiredo

Instituto Biológico

Dr. José Reis July

Instituto Biológico

Dr. Takao Namekata

Instituto Biológico

Prof. Dr. Humberto de Araujo Rangel

Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro

Universidade Estadual de Campinas

Eng<sup>a</sup>. Agr<sup>a</sup>. Rosa Maria Gayoso Cardoso

Instituto Biológico

Bibliotecária Chefe Cecilia Tamandaré Uchôa Gomes

Instituto Biológico

Sra. Cecilia Abeid Teixeira

Instituto Biológico

Srta. Ana Lucia Leite Rodrigues Alves

Instituto Biológico

**Sr. João Batista Tibiriçá**  
**Instituto Biológico**

**Sra. Edith Mackrodt**

**Colegas e funcionários da Secção de Bioquímica Fitopatológica**  
**do Instituto Biológico**

**Secção de Virologia Fitopatológica e Fisiopatologia**  
**do Instituto Biológico**

**Secção de Virologia Fitotécnica**  
**do Instituto Agrônômico**

**Secção de Desenho**  
**do Instituto Biológico**

**Secção de Fotomicrografia**  
**do Instituto Biológico**

## Í N D I C E

	pág.
I. Siglas e abreviações.....	I
II. Relação das tabelas.....	III
III. Relação das figuras.....	VI
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	2
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	11
3.1. Fonte dos vírus.....	11
3.2. Processo de purificação dos vírus.....	12
3.3. Preparo de anti-soros.....	15
3.4. Testes sorológicos.....	15
3.5. Padronização das preparações com vírus, ensaiadas em teste sorológico de precipitina em tubos.....	20
4. RESULTADOS .....	21
4.1. Purificação dos vírus.....	21
4.2. Padronização das preparações com vírus, ensaiadas em testes de precipitina em tubos.....	21
4.3. Títulos homólogos e heterólogos dos anti-soros para PVY, LMV, BCMV e BYMV.....	27
4.3.1. Testes de dupla-difusão em ágar.....	27
4.3.2. Testes de precipitina em tubos.....	31
5. DISCUSSÃO .....	43
5.1. Purificação do PVY, LMV, BCMV e BYMV.....	43
5.2. Padronização da concentração das preparações com vírus.....	45
5.3. Testes de dupla-difusão em ágar.....	47
5.4. Testes de precipitina em tubos.....	48
5.5. Considerações gerais.....	54
6. CONCLUSÕES .....	57
7. RESUMO .....	59

8.	SUMMARY .....	60
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62
10.	APÊNDICE 1 .....	VII

## I. SIGLAS E ABREVIACES

- PVY - "potato virus Y" - vírus Y da batata
- LMV - "lettuce mosaic virus" - vírus do mosaico da alface
- BCMV - "bean common mosaic virus" - vírus do mosaico comum do feijoeiro
- BYMV - "bean yellow mosaic virus" - vírus do mosaico amarelo do feijoeiro
- BMV - "beet mosaic virus" - vírus do mosaico da beterraba
- WMV - "watermelon mosaic virus" - vírus do mosaico da melancia
- AS-PVY-8-1 - anti-soro para PVY, obtido do coelho 8, série da sangria n 1
- AS-LMV-5-1 - anti-soro para LMV, obtido do coelho 5, série da sangria n 1
- AS-BCMV-14-1 - anti-soro para BCMV, obtido do coelho 14, série da sangria n 1
- AS-BYMV-27-1 - anti-soro para BYMV, obtido do coelho 27, série da sangria n 1
- SN - soro normal
- FCRC - folhas e caules recém-colhidos
- R 30 - rotor 30
- TFa - solução tampão de fosfato de sódio 0,1M - pH 7,0 + Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> a 0,5%
- TFb - solução tampão de fosfato de sódio 0,01M - pH 7,0
- NaCl a 0,85% - solução de cloreto de sódio a 0,85%
- FA-1 - fase aquosa - 1
- FA-2 - fase aquosa - 2
- FE - fase etérica
- FCCl<sub>4</sub> - fase com tetracloreto de carbono
- CCl<sub>4</sub> - tetracloreto de carbono
- LS-1 - líquido sobrenadante - 1
- LS-2 - líquido sobrenadante - 2
- S<sub>1</sub> - sedimento - 1
- S<sub>2</sub> - sedimento - 2
- S<sub>3</sub> - sedimento - 3
- P<sub>1</sub> - "pellet" - 1
- iv - injeção intravenosa
- imac - injeção intramuscular
- pi - período de imunização (dias)
- pr - período de repouso (dias)

dd - teste de dupla-difusão em ágar

pp - teste de precipitina em tubos

DO<sub>260</sub> - densidade ótica em um comprimento de onda de 260 nm

f.s. - preparação purificada à partir de plantas de fumo não infectadas

q.s. - preparação purificada à partir de plantas de quenopódio não infectadas

fj.s. - preparação purificada à partir de plantas de feijoeiro não infectadas

nm - nanômetro

Å - ângstron

rpm - rotações por minuto

x g - número de gravidades

v/v - volume por volume



## II. Relação das tabelas

Tabelas		pág.
1	Esquema geral de imunização dos coelhos com PVY.....	16
2	Esquema geral de imunização dos coelhos com LMV.....	17
3	Esquema geral de imunização dos coelhos com BCMV.....	18
4	Esquema geral de imunização dos coelhos com BYMV.....	19
5	Esquema dos resultados de teste sorológico de precipitina em tubos, em que se ensaiou um anti-soro para PVY contra uma preparação com PVY, com densidade ótica, em 260 nm, igual a 28.....	23
6	Esquema dos resultados de teste sorológico de precipitina em tubos, em que se ensaiou um anti-soro para LMV contra uma preparação com LMV, com densidade ótica, em 260 nm, igual a 36.....	24
7	Esquema dos resultados de teste sorológico de precipitina em tubos, em que se ensaiou um anti-soro para BCMV contra uma preparação com BCMV, com densidade ótica, em 260 nm, igual a 80.....	25
8	Esquema dos resultados de teste sorológico de precipitina em tubos, em que se ensaiou um anti-soro para BYMV contra uma preparação com BYMV, com densidade ótica, em 260 nm, igual a 56.....	26
9	Títulos dos anti-soros para PVY, LMV, BCMV e BYMV, ensaiados em combinações homólogas e heterólogas, determinados através de testes de dupla-difusão em ágar....	29
10	Comparação dos valores dos títulos dos anti-soros para PVY, LMV, BCMV e BYMV, ensaiados em combinações homólogas e heterólogas, determinados através de testes de dupla-difusão em ágar e de precipitina em tubos.....	30

11	Títulos dos anti-soros para PVY, obtidas dos coelhos 8, 13 e 15, ensaiados em combinações homólogas e heterólogas, determinados através de testes de precipitina em tubos.....	32
12	Títulos dos anti-soros para LMV, obtidos dos coelhos 5 e 19, ensaiados em combinações homólogas e heterólogas, determinados através de testes de precipitina em tubos.....	33
13	Títulos dos anti-soros para BCMV, obtidos dos coelhos 6, 10, 12, 14, 20, 21 e 35, ensaiados em combinações homólogas e heterólogas, determinados através de testes de precipitina em tubos.....	35
14	Títulos dos anti-soros para BYMV, obtidos dos coelhos 27, 28 e 31, ensaiados em combinações homólogas e heterólogas, determinados através de testes de precipitina em tubos.....	36
15	Títulos de anti-soros para PVY, obtidos dos coelhos 8, 13 e 15, ensaiados em combinação com preparações purificadas à partir de plantas de fumo, quenopódio e feijoeiro não infectadas, em testes de precipitina em tubos.....	38
16	Títulos de anti-soros para LMV, obtidos dos coelhos 5 e 19, ensaiados em combinação com preparações purificadas à partir de plantas de fumo, quenopódio e feijoeiro não infectadas, em testes de precipitina em tubos..	39
17	Títulos de anti-soros para BCMV, obtidos dos coelhos 6, 10, 12, 14, 20, 21 e 35, ensaiados em combinação com preparações purificadas à partir de plantas de fumo, quenopódio e feijoeiro não infectadas, em testes de precipitina em tubos.....	41

- V
- 18      Títulos de anti-soros para BYMV, obtidos dos coelhos  
27, 28 e 31, ensaiados em combinação com preparações  
purificadas à partir de plantas de quenopódio e feijoeir  
ro não infectadas, em testes de precipitina em tubos..      42

## III. Relação das figuras

Figura		pág.
	A - Micrografia eletrônica de preparação com PVY.....	22
1	B - Micrografia eletrônica de preparação com LMV.....	22
	C - Micrografia eletrônica de preparação com BCMV.....	22
	D - Micrografia eletrônica de preparação com BYMV.....	22
2	Lâmina de testes de dupla-difusão em ágar.....	28

"ESTUDOS SOROLÓGICOS DE VÍRUS DO GRUPO DO VÍRUS Y DA BATATA, QUE OCORREM NO ESTADO DE SÃO PAULO"

1. INTRODUÇÃO

Os vírus de plantas, considerados como membros do grupo do vírus Y da batata (PVY) (Apêndice 1), caracterizam-se por apresentar determinadas propriedades em comum: partículas filamentosas, de forma a longada e de aspecto flexível, com um comprimento de 720 a 800 nm, sime tria helicoidal e um passo de 34<sup>0</sup>; ponto de inativação térmica de 50° a 60°C; concentração em suco entre 5-25mg/l; longevidade "in vitro" de poucos dias. São transmitidos por inoculação mecânica; por insetos veto res (afídeos), de forma não-persistente; e, alguns, pela semente ( como os vírus do mosaico comum do feijoeiro, do mosaico da alface, do mosaico da soja e do mosaico do amendoim). Exames ao microscópio eletrônico de tecidos de plantas, infectadas por diferentes vírus deste grupo, têm revelado certas características em comum. A mais notável é a ocorrência de inclusões lamelares, citoplasmáticas, que podem adquirir configurações variáveis em secção, como linhas paralelas, catavento, anéis con cêntricos, etc. Além disso, alguns vírus do grupo do PVY induzem cris tais intranucleares (vírus "etch" do fumo, mosaico amarelo do feijoeiro e duas estirpes brasileiras do PVY). Também, inclusões intranucleares fibrosas têm sido observadas em tecidos de plantas infectadas por vírus do mosaico amarelo do salsão e vírus do mosaico da beterraba. Diversos trabalhos têm demonstrado que muitos vírus do grupo do PVY têm relações sorológicas, entre si, em diferentes graus de afinidade, tendo alguns autores aventado a possibilidade de se utilizar o conhecimento destas relações sorológicas na classificação filogenética dos vírus de plantas.

Considerando-se que, até o presente momento, não houve qualquer estudo sobre a determinação de relações sorológicas entre vírus, pertencentes ao grupo do PVY, isolados no Estado de São Paulo, a presente tese visa contribuir, pelo menos em parte, para preencher esta lacuna, com o propósito de fornecer subsídios ao sistema de classifica-

ção de vírus de plantas, proposto por BRANDES & BERCKS (1965). Tendo em vista este objetivo, foram escolhidos quatro vírus - vírus do mosaico da alface (LMV), vírus do mosaico comum do feijoeiro (BCMV), vírus do mosaico amarelo do feijoeiro (BYMV) e vírus Y da batata (PVY) - considerados como membros do citado grupo, isolados e identificados pela Seção de Virologia Fitotécnica do Instituto Agronômico de Campinas e pela Seção de Virologia Fitopatológica e Fisiopatologia do Instituto Biológico de São Paulo. Estes isolados foram purificados e concentrados, à partir de plantas infectadas, de forma sistêmica, por inoculação mecânica. As preparações, assim obtidas, foram submetidas a análise espectrofotométrica e a exames ao microscópio eletrônico, com o fito, de se avaliar o seu grau de pureza e a sua concentração. Essas preparações foram utilizadas na imunização de coelhos, para a produção de anti-soros, e em testes sorológicos contra estes anti-soros, em combinações homólogas e heterólogas, para a detecção de relações entre os vírus estudados.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

Desde os primórdios da sorologia de vírus de plantas, alguns autores (BIRKELAND, 1934; BEALE, 1933, 1934; CHESTER, 1935a, 1935b, 1937) já preconizavam o emprego desta técnica na classificação deste tipo de patógenos. O desenvolvimento de métodos, que permitiram a purificação de vírus de plantas, e, conseqüentemente, a obtenção de anti-soros mais específicos, além do aperfeiçoamento de técnicas mais sensíveis na detecção de reações sorológicas, possibilitou a muitos autores, verificar que certos vírus, até então considerados distintos, são sorologicamente relacionados.

À partir de 1940, com a evolução da técnica de microscopia eletrônica, foi possível determinar as dimensões e a morfologia das partículas de muitos vírus de plantas, o que permitiu a muitos autores considerar que vírus, com círculo de hospedeiras bem diverso, apresentavam semelhanças na morfologia e dimensões de suas partículas.

BRANDES & WETTER (1959), tomando como critério a morfologia e dimensões das partículas de vírus de planta, propuseram um siste-

ma de classificação de vírus alongados, em que não se considerou como características principais a sintomatologia ou o meio de transmissão. BRANDES & BERCKS (1965) estabeleceram, como critérios principais na classificação de vírus de plantas, a morfologia da partícula e suas relações sorológicas. Assim, os vírus de partícula alongada foram divididos, em seis grupos. Por convenção, foi usado o nome do vírus mais representativo, para caracterizar cada grupo (grupo do vírus "rattle" do fumo - 130 a 210 nm, grupo do vírus do mosaico comum do fumo - 300 a 315 nm, grupo do vírus X da batata - 480 a 580 nm, grupo do vírus S da batata - 620 a 700 nm, grupo do vírus Y da batata - 730 a 790 nm, grupo do vírus do amarelo da beterraba - 1250 a 2000 nm).

Segundo BOS (1970), o primeiro trabalho sobre a determinação de relações sorológicas entre dois vírus do grupo PVY, foi o de BEEMSTER & VAN DER WANT (1951), em que os autores, por meio de testes de microprecipitina, observaram que isolados de BCMV e BYMV apresentavam reações cruzadas. Posteriormente, outros autores (BERCKS, 1960 a ; ZAUMEYER & GOTH, 1964; BOS, 1970; UYEMOTO et alii, 1972) confirmaram este resultado, utilizando outros isolados. Estes dois vírus são considerados, pelas características de aspecto e dimensões de suas partículas, com membros típicos do grupo do PVY. Assim, as partículas do BCMV, segundo BRANDES & QUANTZ (1955), apresentam um aspecto filiforme e têm um comprimento de ca. 750 nm e um diâmetro de ca. 15 nm. Igualmente, as partículas de BYMV têm um comprimento de 750 nm e um diâmetro de 14 nm, apresentando também um aspecto filiforme (BRANDES & QUANTZ, 1955; BRANDES, 1964). Por outro lado, vários autores têm observado que, tanto o BCMV, como o BYMV, têm relações sorológicas com outros membros do grupo. Assim, o BCMV tem afinidade sorológica com os seguintes vírus do grupo PVY: "cowpea aphid-borne mosaic virus" (LOVISOLO & CONTI, 1966; BOCK, 1973a), vírus do mosaico da soja (QUANTZ, 1961), vírus do mosaico da ervilha (BERCKS, 1960a), "clover yellow vein virus" (GIBBS et alii, 1966), "cowpea seed-borne virus" (UYEMOTO et alii, 1973), "Wisteria vein mosaic virus", "pea necrosis virus" (BOS, 1970), LMV, "pokeweed mosaic virus", "maize dwarf mosaic virus", "celery mosaic virus", vírus "etch" do fumo, estirpes normal, necrótica e C de PVY, "turnip mosaic virus", "watermelon mos

aic virus", "onion yellow dwarf virus", "Nothoscordum mosaic virus" , "dasheen mosaic virus", "papaya ringspot virus", "bidens mottle virus" e "blackeye cowpea mosaic virus" (SHEPARD et alii, 1974). Os vírus do grupo PVY, que não têm relações sorológicas com o BCMV, são : "passion fruit woodiness virus" (TAYLOR & KIMBLE, 1964; TEAKLE & WILDERMUTH, 1967), vírus de *Voandzeia subterranea* Thou (BOCK, 1973b) e "peanut mottle virus" (BEHNCKEN, 1970; BOCK, 1973b). Segundo BOS (1971), alguns vírus de Leguminosas, cuja descrição foi incompleta, seriam relacionados com o BCMV: "azuki-bean (*Phaseolus radiatus* L var. *aurea*) mosaic virus" (MATSUMOTO, 1922), "asparagus bean (*Vigna sesquipedalis*(L) Fruw) mosaic virus" (SNYDER, 1942; INOUE, 1969) e "mung bean (*Phaseolus lunatus* L) mosaic virus" (KAISER et alii, 1968).

Vários autores têm determinado que o BYMV tem relações sorológicas com vários vírus, membros do grupo do PVY, a saber : vírus do mosaico da beterraba (BERCKS, 1960b, 1961), PVY (BERCKS, 1960b, 1961 ; VAN REGENMORTEL et alii, 1962), vírus do mosaico da ervilha (GOODCHILD, 1956; BERCKS, 1960a; TAYLOR & SMITH, 1968), vírus do mosaico da soja (QUANTZ, 1961); "Wisteria vein mosaic virus", "pea necrosis virus" (CONTI & LOVI SOLO, 1969; BOS, 1970), "Eucharis mosaic virus" (BRANDES, 1964), "carnation yellow mottle virus" (HOLLINGS & STONE, 1971), "clover yellow vein virus" (GIBBS et alii, 1966), "lupin mottle virus" (HULL, 1968), "red clover necrosis virus" (ZAUMEYER & GOTH, 1963) e "blackeye cowpea mosaic virus" (CORBETT, 1957). Dos vírus do grupo PVY, existem alguns, os quais não se constatou relacionamento sorológico com BYMV: "parsnip mosaic virus" (MURANT et alii, 1970), "Narcissus yellow stripe virus" (VAN SLOGTEREN, 1955; BRUNT, 1971), "pepper veinal mottle virus" (BRUNT & KENTEN, 1971) , "peanut mottle virus" (BEHNCKEN, 1970; PAGHIO & KUHN, 1973; BOCK, 1973b) , "coropea aphid-borne mosaic virus" (BOCK, 1973a), vírus de *Voandzeia subterranea* (BOCK, 1973b) e "passion fruit woodiness virus" (TAYLOR & KIMBLE , 1964; TEAKLE & WILDERMUTH, 1967).

O LMV caracteriza-se, como o BCMV e o BYMV, por ser um típico membro do grupo do PVY, pois suas partículas são filiformes de ca. 750 x 13 nm (TOMLINSON, 1964). Tem relações sorológicas com os seguintes membros do grupo: vírus do mosaico da cana-de-açúcar (BRANDES & BER



CKS,1965), PVY (BRANDES,1964; SHEPARD et alii,1974), "turnip mosaic virus" (BRANDES & BERCKS,1965; SHEPARD et alii,1974), BCMV, "pokeweed mosaic virus", "maize dwarf mosaic virus", "celery mosaic virus", vírus "etch" do fumo, "watermelon mosaic virus", "onion yellow dwarf virus", "Nothoscordum mosaic virus", "dasheen mosaic virus", "papaya ringspot virus" e "blackeye cowpea mosaic virus" (SHEPARD et alii,1974).\*

As partículas do PVY, o vírus representativo do grupo, são filiformes como as dos demais, com um comprimento de ca.730 nm e com um diâmetro de 11 nm (DELGADO-SANCHEZ & GROGAN,1970). Suas estirpes: normal e necróticas (BODE & PAUL,1956; SILBERSCHMIDT et alii,1954; BAWDEN & KASSANIS,1951; KLINKOWSKI & SCHMELZER,1957), têm relações sorológicas entre si, em diferentes graus de afinidade (BARTELS,1957,1958), bem como a estirpe C (BAWDEN & KASSANIS,1951).

Os vírus do grupo, relacionados sorologicamente com o PVY, são: vírus do mosaico da beterraba (BERCKS,1960b,1961), BYMV (BERCKS,1960b,1961; VAN REGENMORTEL et alii,1962), "watermelon mosaic virus" (VAN REGENMORTEL et alii,1962; SHEPARD et alii,1974), vírus A da batata (BARTELS,1964; FRIBOURG & DE ZOETEN,1970), vírus "etch" do fumo (BARTELS, 1964; PURCIFULL & GOODING Jr., 1970; SHEPARD et alii, 1974), "henbane mosaic virus" (BARTELS, 1964; GOVIER & PLUMB, 1972), "pokeweed mosaic virus" (SHEPHERD et alii, 1969; SHEPARD et alii, 1974), vírus SB29 (BAGNALL, 1963; BRANDES & BERCKS, 1965), "Eucharis mosaic virus" (BRANDES, 1964), BCMV, "maize dwarf mosaic virus", "celery mosaic virus", "turnip mosaic virus", "onion yellow dwarf virus", "Nothoscordum mosaic virus", "dasheen mosaic virus", "papaya ringspot virus", "bidens mottle virus", "blackeye cowpea mosaic virus" (SHEPARD et alii, 1974) e "pepper mottle virus" (ZITTER & COOK, 1973; PURCIFULL et alii, 1973).

O PVY não tem relações sorológicas com: "peanut mottle virus" (SUN & HEBERT, 1972; BOCK, 1973b), "parsnip mosaic virus" (MURANT et alii, 1970), "Narcissus yellow stripe virus" (VAN SLOGTEREN, 1955; BRUNT, 1971), "tobacco vein mottling virus" (GOODING Jr. & SUN, 1972; PIRONE et alii, 1973), "Peru tomato virus" (RAYMER et alii, 1972), "pepper veinal mottle virus" (BRUNT & KENTEN, 1971), "Arizona pepper

---

\*Quanto ao LMV, não se tem referências, na literatura consultada, sobre trabalhos que o distingam sorologicamente de outros vírus do grupo PVY.

virus" (NELSON & WHEELER, 1972), "cowpea aphid-borne mosaic virus" (BOCK, 1973a) e vírus de *Voandzeia subterranea* (BOCK, 1973b).

Como foi mencionado anteriormente, o trabalho de BEEMSTER & VAN DER WANT (1951) foi o primeiro a relatar a detecção de relações sorológicas entre dois vírus do grupo PVY - o vírus do mosaico comum do feijoeiro (BCMV) e o vírus do mosaico amarelo do feijoeiro (BYMV). Para a obtenção de anti-soro para os dois vírus, os autores imunizaram coelhos, pela via intravenosa, com o suco extraído de plantas infectadas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L var. *Beka*) com BCMV e, de fava (*Vicia faba* L var. *Driemaal Wit*) com BYMV. Essas plantas foram trituradas em almofariz, o suco extraído manualmente e passado através de papel de filtro. Em seguida, o suco foi dialisado em celofane contra água corrente, durante 3 a 4 horas. Os coelhos receberam 12 injeções intravenosas durante 3 semanas. Após este período, estes animais ficaram em repouso durante 7 dias, sendo-lhes, em seguida, coletado o sangue, do qual se obteve o anti-soro. Este anti-soro foi submetido a uma absorção com suco não centrifugado de plantas saudáveis, pertencentes às variedades acima mencionadas. Os anti-soros, assim preparados, foram ensaiados em testes de microprecipitina contra suco de plantas saudáveis e infectadas, centrifugado a 12000 rpm-20 min. Por meio destes testes, foram titulados os anti-soros para BCMV e os valores obtidos variaram de 1/256 a 1/512, enquanto que os valores dos títulos dos anti-soros para BYMV foram da ordem de 1/800. Os autores observaram que, em combinações heterólogas, ocorriam nítidas reações de aglutinação entre os componentes sólidos do suco de fava infectada com BYMV e anti-soro para BCMV. Igualmente, o anti-soro para BYMV reagiu com suco de feijoeiro infectado com BCMV. BEEMSTER & VAN DER WANT (1951), em vista destes resultados, concluíram que os dois vírus são sorologicamente relacionados. Observaram, também, que o BCMV tem a tendência de se associar com certos componentes sólidos do suco, pois, quando se submete este suco a uma centrifugação, a baixa rotação, o sobrenadante obtido perde a sua infectividade, o mesmo não ocorrendo em relação ao sedimento.

BERCKS (1960a), trabalhando com quatro estirpes de BYMV e uma de BCMV, determinou que, confirmando o trabalho anterior, os dois

vírus têm afinidade sorológica. Os anti-soros, para estas estirpes foram obtidos à partir de coelhos imunizados com preparações semi-purificadas, aplicadas pelas vias intravenosa e intramuscular, sendo que por esta última via, a preparação foi injetada em emulsão com adjuvante de Freund. As preparações com vírus foram obtidas à partir do suco extraído de plantas infectadas. Este suco foi submetido, primeiramente, a um ciclo de centrifugação diferencial, seguido por uma centrifugação a baixa rotação, clarificação com éter, outra centrifugação a baixa rotação e, finalmente a uma diálise contra solução de NaCl a 0,85%. O autor observou que extratos brutos de plantas infectadas, ou aqueles que foram submetidos somente a uma centrifugação a baixa rotação, foram inviáveis na sua utilização nos testes sorológicos, pois a concentração do vírus era variável, sendo frequentemente muito baixa. No decurso do trabalho, quando o autor observava que um anti-soro estava com um título baixo, promovia o aumento da concentração dos anticorpos, pelo tratamento do anti-soro com solução de sulfato de amônio a 40% seguido de diálise, do precipitado dissolvido, contra solução de NaCl a 0,85%. O maior valor, obtido por BERCKS (1960a), na titulação de anti-soros para BCMV foi de 1/3500, em combinações homólogas; enquanto que, na titulação de anti-soro para BYMV, o maior valor foi de 1/48000, no mesmo tipo de combinação. De um modo geral, os testes de precipitina revelaram que os anti-soros para BCMV produziam nítidas reações heterólogas quando em combinação com preparações com BYMV, e que os anti-soros para BYMV produziam reações heterólogas menos nítidas, quando em combinação com BCMV.

ZAUMEYER & GOTH (1964), ao estudar uma nova estirpe do BCMV, isolada na Flórida (E.U.A.), confirmaram os resultados de BEEMSTER & VAN DER WANT (1951) e de BERCKS (1960a). Por meio de testes de micro-precipitina, ZAUMEYER & GOTH (1964) determinaram que os anti-soros para esta estirpe de BCMV apresentaram títulos homólogos da ordem de 1/2048, e que, os anti-soros para BCMV e BYMV, enviados por BERCKS, apresentaram títulos de 1/2048 e 1/256, respectivamente, quando em combinação com a estirpe americana do BCMV.

BOS (1970), estudando três vírus isolados de ervilha (*Pisum sativum* L) e de wistaria (*Wistaria floribunda* DC e *W. sinensis* DC);

determinou, por meio de testes de micro-precipitina que, além dos três vírus se relacionarem sorologicamente, o isolado de BYMV, utilizado como controle, apresentou fraca reação sorológica com anti-soro para BCMV.

UYEMOTO et alii (1972), determinaram, por meio de testes de microprecipitina, uma relação sorológica distante entre BCMV e BYMV. Os autores observaram que os títulos homólogos dos anti-soros para os dois vírus variaram de 1/2048 a 1/4096, e que nas combinações heterólogas os títulos variaram de 1/16 a 1/128. Porém, em testes de dupla difusão em ágar não conseguiram observar reações cruzadas entre anti-soros e as preparações com BCMV e BYMV, quando tais preparações eram tratadas com pirrolidina. Além disso, também não detectaram qualquer reação sorológica entre os anti-soros e as preparações, ensaiados em testes de dupla-difusão em ágar contendo sulfato de dodecil-sódio.

As relações sorológicas entre o vírus Y da batata (PVY) e o vírus do mosaico amarelo do feijoeiro (BYMV), foram determinadas por BERCKS (1960b, 1961). O autor, trabalhando com isolados de PVY, BYMV e vírus do mosaico da beterraba (BMV) observou, por meio de teste de microprecipitina, que os anti-soros, obtidos contra PVY, BYMV e BMV, apresentavam reações sorológicas em combinações homólogas e alguns, em heterólogas. O valor dos títulos homólogos obtidos em microprecipitina foram de 1/128000 para anti-soro contra BYMV, de 1/16.000 para anti-soro contra PVY e 1/600 para anti-soro contra BMV. Os títulos heterólogos do anti-soro para BYMV foram de 1/128 em reação com PVY e, 1/32 com BMV. E, os títulos heterólogos do anti-soro para PVY foram de 1/128 em reação com BMV e 1/8 com BYMV. O anti-soro para BMV não reagiu em combinações heterólogas com PVY e com BYMV. O autor utilizou como controle, um anti-soro para vírus X da batata, com título homólogo de 1/128000, e não observou reação deste anti-soro contra preparações com PVY, BYMV e BMV. Os anti-soros foram obtidos à partir de coelhos imunizados com preparações com vírus, utilizando-se uma combinação de injeções intra-venosas e intramusculares com adjuvante completo. Para a purificação do PVY e do vírus X da batata, o autor utilizou o método de PFANKUCH & KAUSCHE (1938) - BARTELS (1957) e para BYMV e BMV, o método de WETTER (1960). O primeiro método utiliza clorofórmio para clarificação do suco extraído das

plantas infectadas e, para a concentração do vírus, solução saturada de sulfato de amônio e centrifugação a 15.000 rpm, por 3 horas. O sulfato de amônio residual na preparação é eliminado através de diálise contra água corrente. O segundo método (WETTER, 1960) utiliza a mistura difásica éter-tetracloro de carbono para clarificação do suco; para concentração do vírus, ultracentrifugação (33.000 x g e 105.400 x g); e, para purificação da preparação com vírus, foi utilizada a técnica do gradiente de densidade e de diálise contra solução de NaCl a 0,8% - pH 7,0.

VAN REGENMORTEL et alii (1962), trabalhando com isolados de PVY, BYMV e vírus do mosaico da melancia (WMV), confirmaram os resultados obtidos por BERCKS (1960b, 1961) quanto à determinação de relações sorológicas entre PVY e BYMV. Os anti-soros foram obtidos de coelhos imunizados por injeções intravenosas e intramusculares com adjuvante completo, com preparações parcialmente purificadas deste três vírus. As preparações com WMV foram purificadas de acordo com o método descrito por WETTER (1960). Nos testes sorológicos de micro-precipitina, foram utilizados, como antígenos, tanto o suco de plantas infectadas, clarificado por centrifugação a baixa rotação, como preparações parcialmente purificadas. O valor do título do anti-soro para BYMV, em combinações homólogas, foi de 1/256000 e, em combinações heterólogas, 1/512 para PVY e 1/8 para WMV. Quanto ao anti-soro para PVY, o título homólogo foi de 1/8192, enquanto que os heterólogos foram de 1/32 para WMV e de zero para BYMV. O anti-soro para WMV, titulado em combinações homólogas, apresentou um valor de 1/16000, e, em combinações heterólogas, os valores foram de 1/64 para PVY e 1/8 para BYMV. A falha na reação do anti-soro para PVY com a preparação purificada de BYMV foi interpretada pelos autores como sendo uma baixa concentração em vírus na preparação ensaiada.

SHEPARD et alii (1974), estudando 14 vírus do grupo do PVY, quanto à capacidade de reação sorológica cruzada das proteínas dissociadas de seus capsídeos, em testes de dupla-difusão em ágar, determinaram que BCMV, LMV e PVY \* são relacionados sorologicamente. Os autores imunizaram coelhos com preparações purificadas, com vírus "etch" do fumo e com PVY, tratadas com pirrolidina e formaldeído, segundo método descrito por SHEPARD (1970, 1972). Os anti-soros obtidos foram ensaiados,

---

\*- BRANDES (1964) ao descrever as principais características do LMV, faz referência a uma comunicação pessoal de BARTELS, sobre a detecção de relações sorológicas entre o LMV e o PVY, sem, contudo, apresentar mais detalhes. Apenas menciona que o segundo autor observou uma fraca reação sorológica entre preparações com LMV e anti-soros para PVY de título alto.

em testes de dupla-difusão em ágar, contra preparações, tratadas com pirrolidina-formaldeído, com 14 vírus do grupo do PVY, e, também, contra alguns membros de outros grupos. Os autores observaram que, nestes testes, as linhas de precipitação das reações sorológicas fundiam-se completamente quando estavam em combinações diferentes vírus do grupo do PVY e os anti-soros obtidos. Contudo, os autores não observaram qualquer reação entre estes anti-soros e as preparações com vírus pertencentes a outros grupos de vírus de partículas alongadas. Os autores concluíram, com base nos resultados obtidos, que dos 14 vírus estudados, 13 são relacionados sorologicamente entre si - entre estes, BCMV, LMV e PVY - exceto o "celery mosaic virus", que estaria relacionado parcialmente com estes outros vírus. Na discussão dos resultados obtidos, SHEPARD et alii (1974) observaram que, as proteínas dos capsídeos dissociados das partículas dos vírus estudados, parecem estar mais relacionadas, ao nível imunoquímico, do que, o são as partículas intactas. E aventam que as possíveis razões, para este fato, poderiam estar correlacionadas com a aparente denaturação da proteína do vírus quando dissociada, tanto por pirrolidina, como por sulfato de dodecil sódio. SHEPARD et alii (1974) lembram que outros autores ( FURTH, 1925; SELA, 1969; SCHECHTER et alii, 1971; CONWAY-JACOBS et alii, 1971) observaram que o grau de denaturação de antígenos proteicos, interrelacionados, pode promover o aumento do grau de reatividade cruzada entre eles. Estes autores estabeleceram que, no caso dos polipeptídeos sintéticos, onde não existe estrutura terciária, ou no caso de moléculas proteicas denaturadas, onde a referida estrutura é abolida, a seqüência dos amino-ácidos pode se tornar diretamente envolvida na definição da especificidade da molécula. Além disso, SHEPARD et alii (1974) comentam que, tomando como base o trabalho de SCHECHTER et alii (1971), os determinantes antigênicos de proteínas, com uma estrutura terciária definida, são compostos de amino-ácidos de regiões separadas da cadeia polipeptídica que são mantidos em justaposição por uma intrincada dobra molecular. Assim, de acordo com MARGOLIASH et alii (1970) e NELSONOFF et alii (1970), uma homologia na seqüência dos amino-ácidos em duas proteínas distintas pode ou não ser revelada, ao nível imunoquímico, dependendo de vários fatores estruturais e imunogêni-

cos. Porém, quando as proteínas são denaturadas, segundo SCHECHTER et alii (1971), as homologias da seqüência são melhor expressas com os anticorpos, que são reativos com uma determinada seqüência de amino-ácidos, sendo também reativos com uma seqüência idêntica de uma outra diferente molécula proteica. Assim, SHEPARD et alii (1974) aventam uma possível explicação para a convergência na especificidade antigênica, quando as proteínas, dos vírus do grupo do PVY são dissociadas - de que a homologia da seqüência está presente.

SHEPARD et alii (1974) apresentam outra explicação, partindo da premissa de que não haveria idênticos determinantes antigênicos comuns entre as proteínas denaturadas dos vírus estudados do grupo do PVY, mas sim, muito poucos sítios, relativamente semelhantes, reativos do anticorpo. Estas regiões da molécula do anticorpo tornar-se-iam reativas nos anti-soros heterólogos, somente quando a afinidade do anticorpo atinge um nível tal, suficientemente alto, para permitir uma ligação quase estável com uma seqüência de amino-ácidos substituída, isto é, quando é reduzida a especificidade do anticorpo. SHEPARD et alii (1974) observam que uma vez que, no caso dos anti-soros para proteínas denaturadas, a reatividade cruzada frequentemente aparece com o tempo, e em concordância com EISEN & SISKIND (1964), a possibilidade aventada não está fora de cogitação. Todavia, por outro lado, há casos na literatura onde uma imunização prolongada pode revelar, também, determinantes antigênicos com u'a menor potência imunogênica, como foi reportado por FURTHMAYR & TIMPL (1972), ou então uma especificidade mais restrita (HENNEY, 1970).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Fontes dos vírus

As plantas utilizadas para purificação dos vírus, foram mantidas em estufa e, inoculadas mecanicamente. A infecção induzida pelos vírus nestas plantas, foi do tipo sistêmico.

O isolado de PVY \* foi inoculado em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L var. "Turkish" - com os fatores NN, que localizam o ví

\* - Isolado de planta de batata (*Solanum tuberosum* L), fornecido pela Seção de Virologia Fitopatológica e Fisiopatologia do Instituto Biológico (São Paulo)

rus do mosaico comum do fumo), quando tinham de 4 a 5 folhas completamente desenvolvidas. Após 30 dias, da inoculação, as folhas e os caules foram colhidos e utilizados no processo de purificação (folhas e caules recém-colhidos-FCRC).

O isolado de LMV \*\* foi inoculado em plantas de quenopódio (*Chenopodium quinoa* Willd), quando tinham 5 pares de folhas completamente desenvolvidas. Após 15 dias da inoculação, as folhas e os caules foram colhidos e utilizados no processo de purificação (folhas e caules recém-colhidos-FCRC).

O isolado de BCMV \*\*\* foi inoculado em plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L) das variedades rosinha, preto e manteiga. O isolado de BYMV \*\*\* foi inoculado em plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L) das variedades rosinha, preto, manteiga e "Scotia". Estas plantas de feijoeiro foram inoculadas com BCMV e BYMV quando apresentavam o primeiro par de folhas definitivas completamente desenvolvidas. Após 30 dias da inoculação, as folhas e os caules foram colhidos e utilizados no processo de purificação (folhas e caules recém-colhidos-FCRC).

### 3.2. Processo de purificação dos vírus

O processo adotado na purificação \*\*\*\* dos vírus, constituiu-se numa adaptação do descrito por WETTER (1960).

As centrifugações, a baixa rotação, foram feitas em centrífuga Tominaga Works Ltda (modelo TD-65) e as ultra-centrifugações em ultracentrífuga Spinco (modelo L), utilizando-se o rotor 30 (R30).

Ao final de cada purificação, uma alíquota da preparação obtida foi examinada ao microscópio eletrônico Philips (modelo EM 300), pela técnica de contrastação negativa (BRENNER & HORNE, 1959), e outra alíquota foi analisada em espectrofotômetro Pye Unicam (modelo SP 1800), na região do ultravioleta (200 a 300 nm).

Todas as etapas da purificação foram conduzidas a baixa temperatura (4°C), obedecendo o seguinte procedimento:

Folhas e caules recém-colhidos (FCRC) de plantas infectadas (100 a 500 g. de peso fresco) foram homogeneizados num liquidifica-

---

\*\* - Isolado de planta de alface (*Lactuca sativa* L), fornecido pela Seção de Virologia Fitopatológica e Fisiopatologia do Instituto Biológico (São Paulo).

\*\*\* - Isolados de planta de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L), fornecidos pela Seção de Virologia Fitotécnica do Instituto Agronômico (Campinas).

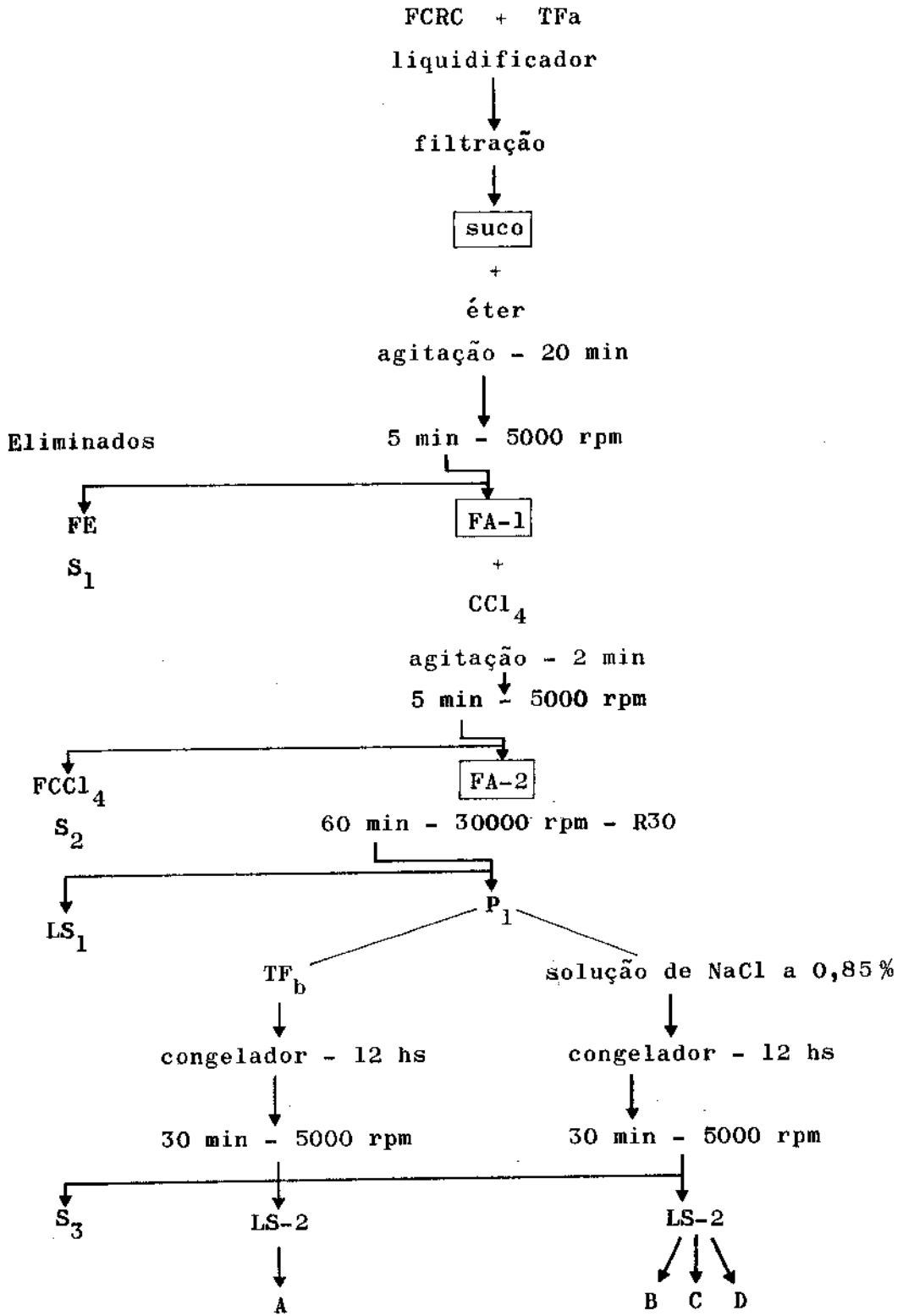
\*\*\*\* - Foram também obtidas preparações purificadas a partir de plantas não infectadas de fumo, feijoeiro e quenopódio, que foram utilizadas como controle nos testes serológicos.



durante 2 min., em presença de uma solução tampão de fosfato de sódio 0,1 M-pH 7,0, contendo sulfito de sódio a 0,5% (TFa), numa proporção de 2 ml de TFa por g. de peso fresco. O material, assim homogeneizado, foi filtrado em pano duplo de morim e submetido ao processo de purificação.

Adicionou-se ao suco filtrado éter etílico, livre de peróxidos, (v/v) e deixou-se o material em agitação constante por 20 min. Posteriormente, centrifugou-se a 5000 rpm, por 5 min. Eliminou-se a fase etérica (FE), com auxílio de uma pipeta acoplada a uma bomba de vácuo, e adicionou-se à fase aquosa (FA-1), tetracloreto de carbono, na proporção de 0,8 ml de tetracloreto para 1 ml de FA-1. O material após ter sido agitado por 2 min, foi centrifugado a 5000 rpm por 5 min. Eliminou-se a fase contendo tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) e submeteu-se a fase aquosa (FA-2) a uma ultracentrifugação, durante 60 min, a 30000 rpm. Descartou-se o líquido sobrenadante (LS-1) e os "pellets" (P-1) foram dissolvidos em solução tampão de fosfato de sódio 0,01M-pH 7,0 (TFb), quando a preparação se destinava a exames ao microscópio eletrônico (A), e dissolvidos em solução de NaCl a 0,85%, quando se destinava a: análise em espectrofotômetro (B), imunização (C) e testes sorológicos (D). Os "pellets" foram dissolvidos, tanto em TFb, como em solução de NaCl a 0,85%, obedecendo-se a uma relação de 1 ml de TFb ou de solução de NaCl a 0,85% para 50 ml de FA-1. As preparações, assim obtidas, foram colocadas em congelador ( $-20^\circ\text{C}$ ) por 12 hs, e, após este período descongeladas à temperatura ambiente e centrifugadas por 30 min a 5000 rpm. O sedimento resultante ( $S_3$ ) foi eliminado e o sobrenadante (LS-2) foi destinado a A, B, C e D conforme a conveniência do momento. Quando do procedimento C, a preparação foi dividida em alíquotas de 2 ml e guardadas em congelador ( $-20^\circ\text{C}$ ), até o momento de sua utilização. Nos outros casos (A, B e D), o material foi imediatamente utilizado (Esquema 1).

ESQUEMA 1: Fases da purificação dos vírus.



### 3.3. Preparo de anti-soros

Para o preparo de anti-soros, foram utilizados 15 coelhos, pesando em média 2000 g. Destes 15 coelhos, 3 foram imunizados com PVY, 2 com LMV, 7 com BGMV e 3 com BYMV. Os animais foram submetidos a uma série de injeções, tanto por via intravenosa como por via intramuscular, de preparações purificadas com vírus e sangrados periodicamente (Tabelas 1, 2, 3, e 4). As preparações, injetadas por via intramuscular, foram previamente emulsionadas, em partes iguais (v/v), com adjuvante completo de Freund. Antes de cada animal ter sido submetido ao esquema de imunização, coletou-se 20 ml do seu sangue que, separado do coágulo, foi distribuído em ampolas e conservado em congelador (-20°C), até sua utilização nos testes sorológicos, preparação esta, usada como controle (soro normal-SN).

As sangrias dos animais foram feitas através de um pequeno corte longitudinal, na veia lateral da orelha. O sangue (40 ml) foi recolhido em um pequeno frasco de vidro com boca larga e deixado coagular por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, o coágulo foi destacado da parede do recipiente, com auxílio de um bastão fino de vidro, e, a mistura soro e coágulo, deixada em refrigerador (4°C), por 24 horas. Após este período, o soro foi separado do coágulo por decantação e submetido a uma centrifugação de 3000 rpm, por 10 min. O sobrenadante obtido, foi distribuído em ampolas de vidro (2 a 3 ml/ampola), sendo-lhe adicionado Thimerosal (a uma concentração final de 1:10.000). As ampolas foram seladas e guardadas em congelador (-20°C) até sua utilização.

### 3.4. Testes sorológicos

Foram utilizados testes sorológicos de precipitina em tubos e dupla-difusão em ágar, na determinação do título dos anti-soros preparados. Para este fim, os anti-soros foram diluídos, em série, seguindo-se uma progressão geométrica de razão 2, com solução de NaCl a 0,85%.

TABELA 1 - Esquema geral de imunização dos coelhos nºs 8, 13, 15, com PVY.

coelho nº 8					
série	iv	imac	pi	pr	sigla dos AS
1	7	-	57	10	AS-PVY-8-1
2	-	1	1	110	AS-PVY-8-2
3	5	-	8	56	AS-PVY-8-3
4	1	-	1	51	AS-PVY-8-4
5	8	-	17	69	AS-PVY-8-5
6	-	1	1	36	AS-PVY-8-6
7	8	-	27	74	AS-PVY-8-7
8	-	1	1	41	AS-PVY-8-8
9	12	-	13	66	AS-PVY-8-9
10	6	-	13	21	AS-PVY-8-10
11	10	-	41	31	AS-PVY-8-11

coelho nº 15					
série	iv	imac	pi	pr	sigla dos AS
1	8	-	27	13	AS-PVY-15-1
2	-	1	1	40	AS-PVY-15-2
3	13	-	35	64	AS-PVY-15-3
4	6	-	13	21	AS-PVY-15-4

coelho nº 13					
série	iv	imac	pi	pr	sigla dos AS
1	13	-	28	13	AS-PVY-13-1
2	8	-	40	59	AS-PVY-13-2
3	-	1	1	40	AS-PVY-13-3
4	13	-	35	64	AS-PVY-13-4
5	6	-	13	21	AS-PVY-13-5

iv - número de injeções intravenosas

imac - nº de injeções intramusculares com adjuvante completo

p.i. - período de imunização (dias)

p.r. - período de repouso (dias)

TABELA 2 - Esquema geral de imunização dos coelhos 5 e 19, com LMV.

coelho nº 5					
série	iv	imac	pi	pr	sigla dos AS
1	6	-	21	13	AS-LMV-5-1
2	-	1	1	10	AS-LMV-5-2
3	-	1	1	100	AS-LMV-5-3
4	-	-	-	25	AS-LMV-5-4
5	-	1	1	93	AS-LMV-5-5
6	1	-	1	37	AS-LMV-5-6
7	8	-	24	71	AS-LMV-5-7
8	-	1	1	45	AS-LMV-5-8
9	8	-	19	23	AS-LMV-5-9
10	4	-	7	66	AS-LMV-5-10
11	13	-	43	83	AS-LMV-5-11
12	10	-	32	12	AS-LMV-5-12
13	10	-	46	18	AS-LMV-5-13

coelho nº 19					
série	iv	imac	pi	pr	sigla dos AS
1	4	-	8	13	AS-LMV-19-1
2	12	-	43	83	AS-LMV-19-2
3	10	-	32	12	AS-LMV-19-3
4	10	-	46	18	AS-LMV-19-4

iv - número de injeções intravenosas

imac - número de injeções intramusculares com adjuvante completo

p.i. - período de imunização (dias)

p.r. - período de repouso (dias)

coelho nº 6					
série	iv	imac	pi	pr	sigla dos AS
-	6	-	22	56	AS-BCMV-6

coelho nº 10					
série	iv	imac	pi	pr	sigla dos AS
1	6	-	43	12	AS-BCMV-10-1
2	-	1	1	34	AS-BCMV-10-2
3	5	-	11	32	AS-BCMV-10-3
4	1	-	1	100	AS-BCMV-10-4

coelho nº 12					
série	iv	imac	pi	pr	sigla dos AS
-	13	-	28	21	AS-BCMV-12

coelho nº 35					
série	iv	imac	pi	pr	sigla dos AS
1	8	-	23	11	AS-BCMV-35-1
2	6	-	16	12	AS-BCMV-35-2

coelho nº 14					
série	iv	imac	pi	pr	sigla dos AS
1	7	-	11	78	AS-BCMV-14-1
2	19	-	49	77	AS-BCMV-14-2
3	8	-	21	21	AS-BCMV-14-3
4	8	-	24	11	AS-BCMV-14-4
5	1	-	1	3	AS-BCMV-14-5
6	5	-	14	10	AS-BCMV-14-6

coelho nº 20					
série	iv	imac	pi	pr	sigla dos AS
1	4	-	7	28	AS-BCMV-20-1
2	19	-	58	68	AS-BCMV-20-2

coelho nº 21					
série	iv	imac	pi	pr	sigla dos AS
1	4	-	7	28	AS-BCMV-21-1
2	19	-	58	68	AS-BCMV-21-2
3	8	-	21	21	AS-BCMV-21-3
4	8	-	24	11	AS-BCMV-21-4
5	6	-	18	10	AS-BCMV-21-5

TABELA 3 - Esquema geral de imunização dos coelhos 6, 10, 12, 14, 20, 21 e 35, com BCMV.

iv - número de injeções intravenosas  
imac - número de injeções intramusculares com adjuvante completo  
pi - período de imunização (dias)  
pr - período de repouso (dias)

TABELA 4 - Esquema de imunização dos coelhos nº 27, 28 e 31 com BYMV.

coelho nº 27					
série	iv	imac	pi	pr	sigla dos AS
1	4	-	7	28	AS-BYMV-27-1
2	17	-	52	74	AS-BYMV-27-2
3	6	-	13	22	AS-BYMV-27-3

coelho nº 28					
série	iv	imac	pi	pr	sigla dos AS
1	4	-	7	28	AS-BYMV-28-1
2	17	-	52	74	AS-BYMV-28-2
3	6	-	13	22	AS-BYMV-28-3

coelho nº 31					
série	iv	imac	pi	pr	sigla dos AS
1	4	-	7	28	AS-BYMV-31-1
2	17	-	52	74	AS-BYMV-31-2
3	6	-	13	22	AS-BYMV-31-3

- iv - número de injeções intravenosas  
imac - número de injeções intramusculares com adjuvante completo  
pi - período de imunização (dias)  
pr - período de repouso (dias)

Nos testes de precipitina em tubos, foram misturados iguais volumes de preparação com vírus e de anti-soro em tubos de vidro (5 x 50 mm), que foram colocados em banho-Maria a 37°C por 2 horas. Após este período, os tubos foram deixados em refrigerador (4°C) por 12 horas. Em seguida, os tubos foram retirados do refrigerador e fez-se a leitura dos resultados.

O procedimento seguido, para o preparo e realização dos testes de dupla-difusão em ágar, baseou-se no que já foi descrito por OLIVEIRA (1967).

Os controles, utilizados nos testes sorológicos, obedeceram o seguinte esquema:

- preparação com vírus + solução de NaCl a 0,85%.
- preparação com vírus + soro normal.
- anti-soro + solução de NaCl a 0,85%.

### 3.5. Padronização das preparações com vírus, ensaiadas em teste sorológico de precipitina em tubos.

As preparações com vírus foram ensaiadas, previamente, em testes de precipitina em tubos, com o propósito de se estabelecer os valores padrões em termos de absorbância, em 260 nm, dessas preparações, a serem adotados nas combinações homólogas e heterólogas.

Assim, preparações com cada vírus foram diluídas, em solução de NaCl a 0,85%, serialmente, seguindo-se uma progressão aritmética de razão 2. Em seguida, cada série de diluição foi ensaiada com um anti-soro homólogo diluído, em solução de NaCl a 0,85%, serialmente, seguindo-se uma progressão geométrica de razão 2. A mistura foi incubada a 37°C, durante 2 horas, sendo depois guardada em refrigerador por 12 horas. Findo este período, foi feita a leitura dos resultados.

Considerou-se como padrão, a série de diluição da preparação com vírus, imediatamente menor àquela maior diluição em que se observou reação com a maior diluição do anti-soro. Sendo que a série de diluição posterior não reagiu com a maior diluição do anti-soro. A absorbância desta série de diluição adotada, foi determinada em um comprimento de onda de 260 nm, sendo utilizada como um parâmetro para padronizar as preparações utilizadas nos demais testes. De acordo com a preparação com vírus ensaiada, utilizou-se como controle nos testes sorológicos uma preparação purificada, à partir de um lote de plantas não



infectadas, diluída para um mesmo valor em densidade ótica (em 260 nm) da preparação com vírus.

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1. Purificação de vírus

A solução TFa (Esquema 1), empregada durante a extração do suco de caules e folhas de plantas infectadas, recém-colhidas, permitiu a obtenção de extratos, com coloração verde clara. Estes extratos, quando submetidos a tratamento com éter, e posterior centrifugação, resultaram em uma fase aquosa (FA-1) de coloração amarela translúcida, que persistiu em FA-2, após tratamento com tetracloreto de carbono. Os "pellets", obtidos pela ultracentrifugação de FA-2, quando dissolvidos em  $TF_b$  ou solução de NaCl a 0,85%, resultaram em suspensões de coloração verde escura que, quando submetidas a congelamento e descongelamento com posterior centrifugação, resultaram em preparações (LS-2) de aspecto límpido e translúcido.

Exames ao microscópio eletrônico das fases LS-2, obtidas através da purificação de extratos de plantas infectadas, com PVY, LMV, BCMV e BYMV, revelaram a presença de numerosas partículas de forma alongada e aspecto flexível, de comprimento variados (figura 1). Estas partículas apresentaram-se, muitas vezes, agregadas entre si, lado a lado, e, também, ligadas umas às outras, pelas extremidades. Observou-se, também, um grande número de fragmentos isolados.

##### 4.2. Padronização das preparações com vírus, ensaiadas em testes de precipitina em tubos

A concentração padrão, em termos de absorbância, em 260 nm, de preparações com PVY, posteriormente ensaiadas em testes de precipitina em tubos, foi estimada em 3,5. E, as concentrações padrões de preparações com LMV, BCMV e BYMV, foram estimadas em 4,5; 20 e 28, respectivamente (Tabelas 5,6,7 e 8).

- Figura 1 - A- Micrografia eletrônica de preparação com PVY  
escala: 1 cm = 150,52 nm
- B- Micrografia eletrônica de preparação com LMV  
escala: 1 cm = 150,52 nm
- C- Micrografia eletrônica de preparação com BCMV  
escala: 1 cm = 121,09 nm
- D- Micrografia eletrônica de preparação com BYMV  
escala: 1 cm = 121,09 nm

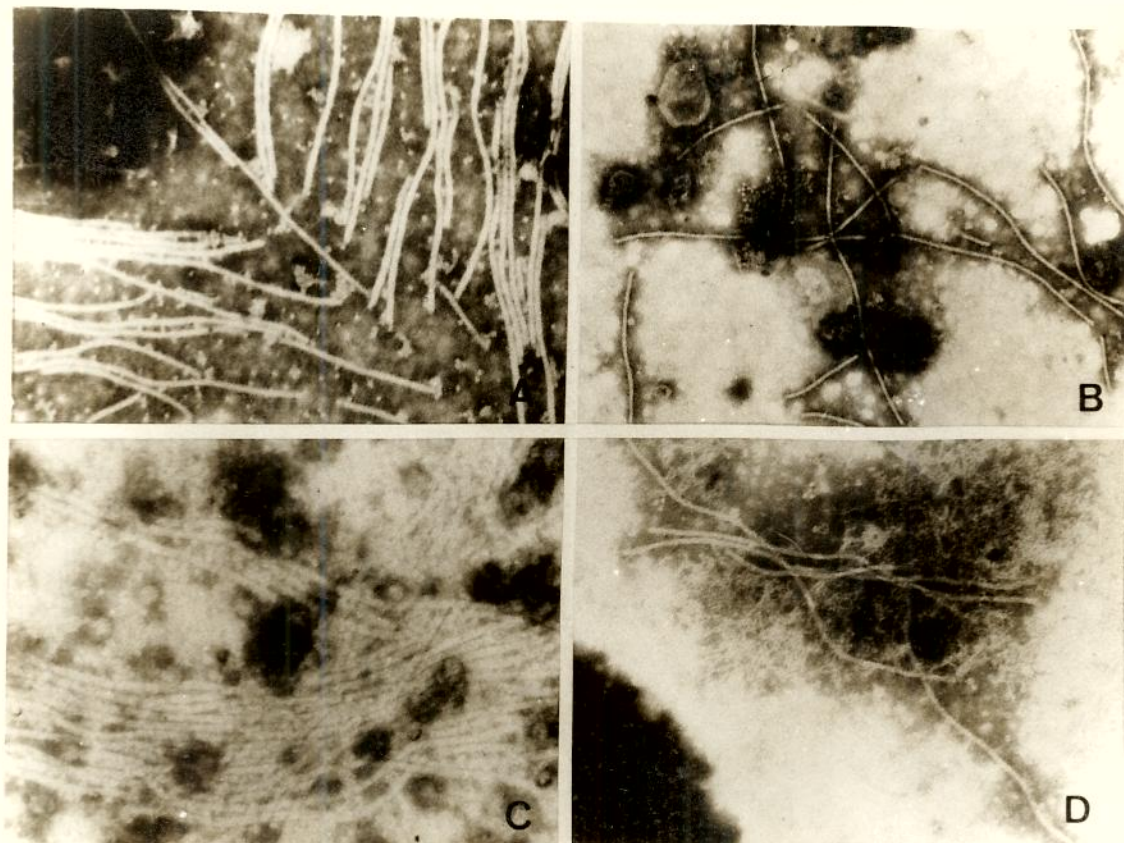


Figura 1 - A- Micrografia eletrônica de preparação com PVY  
escala: 1 cm = 150,52 nm  
B- Micrografia eletrônica de preparação com LMV  
escala: 1 cm = 150,52 nm  
C- Micrografia eletrônica de preparação com BCMV  
escala: 1 cm = 121,09 nm  
D- Micrografia eletrônica de preparação com BYMV  
escala: 1 cm = 121,09 nm

TABELA 5 - Esquema dos resultados de teste sorológico de precipitina em tubos, em que se ensaiou um anti-soro para PVY contra uma preparação com PVY, com densidade ótica, em 260 nm igual a 28.

AS-PVY	PVY							
	densidade ótica 260 nm							
	28,00	14,00	7,00	3,50	1,75	0,87	0,43	0,21
2	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+	+	+	+
64	+	+	+	+	+	+	+	+
128	+	+	+	+	+	+	+	-
256	+	+	+	+	+	+	+	-
512	+	+	+	+	+	+	-	-
1024	+	+	+	+	+	-	-	-

Densidade ótica padrão considerada, em 260 nm = 3,5

+ → reação positiva

- → reação negativa

TABELA 6 - Esquema dos resultados de teste sorológico de precipitina em tubos, em que se ensaiou um anti-soro para LMV contra uma preparação com LMV, com uma densidade ótica, em 260 nm, igual a 36.

LMV	densidade ótica, 260 nm								
	AS-LMV	36,00	18,00	9,00	4,50	2,25	1,12	0,56	0,28
2		+	+	+	+	+	+	+	+
4		+	+	+	+	+	+	+	+
8		+	+	+	+	+	+	+	+
16		+	+	+	+	+	+	+	+
32		+	+	+	+	+	+	+	+
64		+	+	+	+	+	+	+	+
128		+	+	+	+	+	+	+	-
256		+	+	+	+	+	+	+	-
512		+	+	+	+	+	+	-	-
1024		+	+	+	+	+	-	-	-

Densidade ótica padrão considerada, em 260 nm = 4,5

+ → reação positiva

- → reação negativa

TABELA 7 - Esquema dos resultados de teste sorológico de precipitina em tubos, em que se ensaiou um anti-soro para BCMV, contra uma preparação com BCMV, com uma densidade ótica, em 260 nm, igual a 80.

AS-BCMV	BCMV	densidade ótica, 260 nm							
		80,00	40,00	20,00	10,00	5,00	2,50	1,25	0,62
2		+	+	+	+	+	+	+	+
4		+	+	+	+	+	+	+	+
8		+	+	+	+	+	+	+	+
16		+	+	+	+	+	+	+	+
32		+	+	+	+	+	+	+	-
64		+	+	+	+	+	+	+	-
128		+	+	+	+	+	+	-	-
256		+	+	+	+	+	+	-	-
512		+	+	+	+	+	-	-	-
1024		+	+	+	+	-	-	-	-

Densidade ótica padrão considerada, em 260 nm = 20

+ → reação positiva

- → reação negativa

TABELA 8 - Esquema dos resultados de teste sorológico de precipitina em tubos, em que se ensaiou um anti-soro para BYMV contra uma preparação com BYMV, com uma densidade ótica, em 260 nm, igual a 56.

BYMV	densidade ótica, 260 nm								
	AS-BYMV	56,00	28,00	14,00	7,00	3,50	1,75	0,87	0,43
2		+	+	+	+	+	+	+	-
4		+	+	+	+	+	+	-	-
8		+	+	+	+	+	+	-	-
16		+	+	+	+	+	-	-	-
32		+	+	+	+	+	-	-	-
64		+	+	+	+	+	-	-	-
128		+	+	+	+	+	-	-	-
256		+	+	+	+	-	-	-	-
512		+	+	+	-	-	-	-	-
1024		+	+	+	-	-	-	-	-

Densidade ótica padrão considerada, em 260 nm = 28

+ → reação positiva

- → reação negativa

#### 4.3. Títulos homólogos e heterólogos dos anti-soros para PVY, LMV, BCMV e BYMV.

##### 4.3.1. Testes de dupla-difusão em ágar.

Como se observa na figura 2, as linhas de precipitação, resultantes da reação das preparações com vírus e os anti-soros em testes de dupla-difusão em ágar, manifestaram-se ao redor dos orifícios em que se colocou as preparações, sendo de difícil visualização.

Os valores, obtidos na titulação de anti-soros para PVY, LMV, BCMV e BYMV, ensaiados, em testes de dupla difusão em ágar, em combinações homólogas e heterólogas com preparações purificadas com vírus, estão expressos na Tabela 9.

Pode-se observar, pelo exame da Tabela 9, que, de um modo geral, os valores dos títulos homólogos são iguais ou maiores que os dos títulos heterólogos, com algumas excessões, verificadas nas combinações AS-PVY-8-3 e LMV, AS-BCMV-10-1 e LMV, AS-BCMV-10-2 e LMV. Alguns anti-soros reagiram, em combinações heterólogas, somente quando não diluídos, como se observa, por exemplo, em AS-LMV-5, séries 3, 4 e 5, ensaiado contra PVY. Em outros casos, nenhum dos anti-soros para um determinado vírus reagiu contra outro vírus, em combinação heteróloga, tal como se verifica nos ensaios em que se combinou AS-PVY-8, séries 1, 2, 3 e 4, contra BCMV e BYMV, por exemplo.

Pela comparação dos resultados expressos na Tabela 10, pode se observar que os valores obtidos pela titulação dos anti-soros, em testes de dupla-difusão em ágar são menores que os valores obtidos em testes de precipitina em tubos; como por exemplo, nos ensaios em que se combinou AS-PVY-8, séries 1, 2, 3 e 4, tem-se que os respectivos títulos homólogos são 2, 64, 4 e 16, em testes de dupla-difusão, enquanto que, em testes de precipitina, os títulos são de 32, 1024, 1024 e 256, respectivamente. Além disso por estes mesmos resultados, pode-se notar que a variação do título de um mesmo anti-soro não é paralela de acordo com os dois tipos de teste. Existe mesmo uma total discrepância entre os resultados dos dois testes, pois, como por exemplo, nas combinações das séries 1, 2, 3 e 4 do AS-PVY-8 com BCMV não se observou qualquer reação, em testes de dupla-difusão em ágar; enquanto que



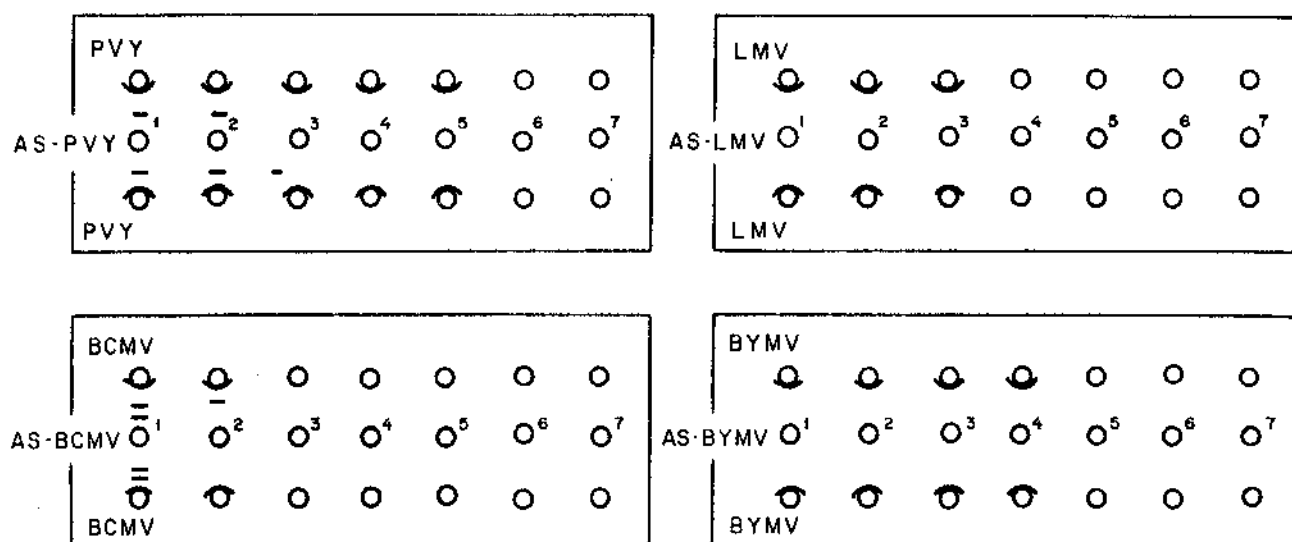


Figura 2: Lâminas de teste: de dupla - difusão em ágar.

PVY - preparação purificada com PVY

LMV - preparação purificada com LMV

BCM V - preparação purificada com BCMV

BYMV - preparação purificada com BYMV

AS-PVY - anti-soro para PVY

AS-LMV - anti-soro para LMV

AS-BCM V - anti-soro para BCMV

AS-BYMV - anti-soro para BYMV

1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 = anti-soro diluído a 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 e 1/128, respectivamente.

TABELA 9 - Títulos dos anti-soros para PVY, LMV, BCMV e BYMV, ensaiados em combinações homólogas e heterólogas, determinados através de testes de dupla-difusão em ágar.

Anti-soros	Antígenos			
	PVY	LMV	BCMV	BYMV
AS-PVY-8-1	2 *	0	0	0
AS-PVY-8-2	64	2	0	0
AS-PVY-8-3	4	16	0	0
AS-PVY-8-4	16	1	0	0
AS-LMV-5-1	0	8	0	0
AS-LMV-5-2	0	32	0	0
AS-LMV-5-3	1	32	8	0
AS-LMV-5-4	1	16	2	2
AS-LMV-5-5	1	128	1	8
AS-BCMV-6	0	0	4	2
AS-BCMV-10-1	1	16	8	4
AS-BCMV-10-2	1	8	2	0
AS-BYMV-27-2	0	1	4	8
AS-BYMV-31-2	0	1	4	4

\* → Os títulos estão representados pelo inverso da diluição do AS.

CONTROLES:

AS + NaCl 0,85% - negativo  
 vírus + NaCl 0,85% - negativo  
 SN + vírus - negativo

TABELA 10 - Comparação dos valores dos títulos dos anti-soros para PVY, LMV, BCMV e BYMV, ensaiados em combinações homólogas e heterólogas, determinados através de testes de dupla-difusão em ágar e de precipitina em tubos.

Anti-soros	Antígenos							
	PVY		LMV		BCMV		BYMV	
	dd <sup>*</sup>	pp <sup>**</sup>	dd	pp	dd	pp	dd	pp
AS-PVY-8-1	2 <sup>***</sup>	32	0	8	0	32	0	32
AS-PVY-8-2	64	1024	2	2	0	32	0	256
AS-PVY-8-3	4	1024	16	16	0	128	0	64
AS-PVY-8-4	16	256	1	8	0	4	0	32
AS-LMV-5-1	0	0	8	0	0	0	0	8
AS-LMV-5-2	0	0	32	0	0	4	0	16
AS-LMV-5-3	1	0	32	256	8	16	0	16
AS-LMV-5-4	1	0	16	64	2	32	2	32
AS-LMV-5-5	1	0	128	256	1	32	8	8
AS-BCMV-6	0	0	0	2	4	1024	2	256
AS-BCMV-10-1	1	2	16	0	8	1024	4	128
AS-BCMV-10-2	1	2	8	0	2	4096	0	1024
AS-BYMV-27-2	0	0	1	0	4	128	8	128
AS-BYMV-31-2	0	0	1	8	4	1024	4	512

\* → título do AS obtido em testes de dupla-difusão em ágar

\*\* → título do AS obtido em testes de precipitina em tubos

\*\*\* - os títulos estão representados pelo inverso da diluição do AS.

CONTROLES:

AS + NaCl 0,85% - negativo

vírus + NaCl 0,85% - negativo

SN + vírus - negativo

nas mesmas séries de AS-PVY-8, em testes de precipitina em tubos, tituladas contra BCMV, os valores foram de 32, 32, 128 e 4, respectivamente.

Não se observou qualquer reação nos controles ensaiados (soro normal + preparação com vírus; solução de NaCl a 0,85% + preparação com vírus; solução de NaCl a 0,85% + anti-soro).

#### 4.3.2. Testes de precipitina em tubos

Os valores, encontrados na titulação de anti-soros para PVY, obtidos dos coelhos 8, 13 e 15, e, ensaiados em testes de precipitina, em tubos, em combinações homólogas e heterólogas contra preparações purificadas com vírus, estão expressos na Tabela 11.

Por esta tabela, pode-se verificar que, em todas as séries de AS-PVY-8, 13 e 15, os títulos homólogos são maiores que os heterólogos, com excessão da série 1 de AS-PVY-8, em que o título homólogo (32) é igual aos heterólogos para BCMV e BYMV.

Os títulos heterólogos para LMV, em AS-PVY-8, praticamente não variam nas séries 1 a 6, mas sofrem um acréscimo da série 7 até a série 10, tornando-se nulo em AS-PVY-8-11. Em AS-PVY-13, os títulos heterólogos para LMV, têm um máximo na série 3, para diminuir nas séries 4 e 5. E, em AS-PVY-15, os títulos heterólogos para LMV, aumentam nas séries 1, 2 e 3, com um máximo na série 4.

Os valores dos títulos heterólogos para BCMV, variam de zero a 32, nas diferentes séries de AS-PVY-8, 13 e 15, com excessão de AS-PVY-8-3, onde o valor obtido é de 128.

Os valores dos títulos heterólogos para BYMV, em AS-PVY-8, variam de 32 a 64, exceto na série 2 de AS-PVY-8, onde o valor é de 256. Em AS-PVY-13, o título heterólogo para BYMV atinge um valor máximo de 256, na série 2, diminuindo para 32, na série 3, e aumentando para 128, nas séries 4 e 5. Em AS-PVY-15, o valor do título heterólogo para BYMV, nas séries 2 e 4, é de 1024, enquanto que, nas séries 1 e 3, os valores obtidos são de 256 e 128, respectivamente.

Na Tabela 12, estão expressos os valores encontrados na titulação de anti-soros para LMV, obtidos dos coelhos 5 e 19, e ensaiados em testes de precipitina em tubos, em combinações homólogas e heterólogas contra preparações purificadas com vírus.

TABELA 11 - Títulos dos anti-soros para PVY, obtidos dos coelhos 8, 13 e 15, ensaiados em combinações homólogas e heterólogas, determinados através de testes de precipitina em tubos.

Anti-soros	Antígenos			
	PVY	LMV	BCMV	BYMV
	(DO.260 = 3,5)*	(DO.260 = 4,5)	(DO.260 = 20)	(DO.260 = 28)
AS-PVY-8-1	32**	8	32	32
AS-PVY-8-2	1024	2	32	256
AS-PVY-8-3	1024	16	128	64
AS-PVY-8-4	256	8	4	32
AS-PVY-8-5	256	16	4	64
AS-PVY-8-6	256	16	4	64
AS-PVY-8-7	1024	64	16	32
AS-PVY-8-8	8192	256	4	64
AS-PVY-8-9	4096	128	8	32
AS-PVY-8-10	8192	1024	4	64
AS-PVY-8-11	256	0	0	64
AS-PVY-13-1	1024	16	16	16
AS-PVY-13-2	2048	32	32	256
AS-PVY-13-3	4096	128	32	32
AS-PVY-13-4	2048	64	32	128
AS-PVY-13-5	2048	16	2	128
AS-PVY-15-1	2048	0	8	256
AS-PVY-15-2	8192	32	16	1024
AS-PVY-15-3	2048	64	2	128
AS-PVY-15-4	8192	512	0	1024

\* → densidade ótica, em 260 nm, das preparações purificadas

\*\* → os títulos estão representados pelo inverso da diluição do anti-soro

CONTROLES: AS + NaCl 0,85% - negativo  
vírus + NaCl 0,85% - negativo  
SN + vírus - negativo

TABELA 12 - Títulos dos anti-soros para LMV, obtidos dos coelhos 5 e 19, ensaiados em combinações homólogas e heterólogas, de terminados através de testes de precipitina em tubos.

Anti-soros	Antígenos			
	PVY	LMV	BCMV	BYMV
	(D0260 = 3,5)*	(D0260 = 4,5)	(D0260 = 20)	(D0260 = 28)
AS-LMV-5-1	0	0	0	8
AS-LMV-5-2	0	0	4	16
AS-LMV-5-3	0	256**	16	16
AS-LMV-5-4	0	64	32	32
AS-LMV-5-5	0	256	32	8
AS-LMV-5-6	4	256	128	8
AS-LMV-5-7	0	2048	64	256
AS-LMV-5-8	4	2048	64	128
AS-LMV-5-9	4	1024	8	16
AS-LMV-5-10	512	4096	32	512
AS-LMV-5-11	2	256	8	64
AS-LMV-5-12	0	1024	0	8
AS-LMV-5-13	4	512	16	64
AS-LMV-19-1	2	8	2	16
AS-LMV-19-2	0	8192	4	1024
AS-LMV-19-3	0	1024	32	64
AS-LMV-19-4	0	1024	2	64

\* → densidade ótica, em 260 nm, das preparações purificadas

\*\* → os títulos estão representados pelo inverso da diluição do anti-soro

CONTROLES: AS + NaCl 0,85% - negativo  
vírus + NaCl 0,85% - negativo  
SN + vírus - negativo

Pode-se observar por esta tabela, que na maioria das séries de AS-LMV-5 e 19, os títulos homólogos são maiores do que os heterólogos, exceto em AS-LMV-5-1, AS-LMV-5-2 e AS-LMV-19-1.

Os títulos heterólogos dos AS-LMV-5 e 19, em combinações com PVY, praticamente variam entre zero e 4, exceto na série 10 de AS-LMV-5 em que o título heterólogo para PVY é da ordem de 512.

Os títulos heterólogos para BCMV de AS-LMV-5, em diversas séries de sangria, atingem no máximo o valor de 32, com exceção de AS-LMV-5-6, AS-LMV-5-7 e AS-LMV-5-8, onde os respectivos valores são 128, 64 e 64. Em AS-LMV-19, o maior valor do título heterólogo para BCMV, é de 32, na série 3 deste anti-soro.

Nas 13 séries de AS-LMV-5, o título heterólogo para BYMV, não ultrapassa o valor de 64, exceto em AS-LMV-5-7, onde o título é de 256, em AS-LMV-5-8, o título é de 128 e em AS-LMV-5-10 é de 512.

Nas séries 1, 3 e 4 de AS-LMV-19, os títulos heterólogos para BYMV não ultrapassam o valor de 64, o mesmo não ocorrendo em AS-LMV-19-2, onde o título atinge o valor de 1024.

Os valores expressos na Tabela 13, representam os títulos dos anti-soros para BCMV, obtidos dos coelhos 6, 10, 12, 14, 20, 21 e 35, em combinações homólogas e heterólogas com preparações purificadas com PVY, LMV, BCMV e BYMV.

Pode-se observar por esta tabela que, na maioria dos casos, os títulos homólogos das séries de AS-BCMV são maiores que os títulos heterólogos, exceto nas combinações heterólogas de AS-BCMV-14-6, AS-BCMV-21-5 e AS-BCMV-35-2, com BYMV.

Os títulos obtidos em combinações heterólogas de AS-BCMV com PVY, ou com LMV, variam de zero a 32; o mesmo não ocorrendo nas combinações destes anti-soros com BYMV, pois nestes casos os títulos variam de 4 a 1024.

A Tabela 14 apresenta os valores observados na titulação dos anti-soros para BYMV, obtidos dos coelhos 27, 28 e 31, em combinações homólogas e heterólogas com preparações purificadas com PVY, LMV, BCMV e BYMV.

TABELA 13 - Títulos dos anti-soros para BCMV, obtidos dos coelhos 6, 10, 12, 14, 20, 21 e 35, ensaiados em combinações homólogas e heterólogas, determinados através de testes de precipitina em tubos.

Anti-soros	Antígenos			
	PVY	LMV	BCMV	BYMV
	(D0260 = 3,5)*	(D0260 = 4,5)	(D0260 = 20)	(D0260 = 28)
AS-BCMV-6	0	2	1024**	512
AS-BCMV-10-1	2	0	1024	128
AS-BCMV-10-2	2	0	4096	1024
AS-BCMV-10-3	16	2	1024	512
AS-BCMV-10-4	4	32	1024	64
AS-BCMV-12	16	4	4096	1024
AS-BCMV-14-1	0	16	128	32
AS-BCMV-14-2	4	32	1024	256
AS-BCMV-14-3	4	16	1024	256
AS-BCMV-14-4	4	2	1024	256
AS-BCMV-14-5	2	0	1024	256
AS-BCMV-14-6	2	8	128	128
AS-BCMV-20-1	0	2	64	4
AS-BCMV-20-2	4	16	1024	128
AS-BCMV-21-1	0	4	128	8
AS-BCMV-21-2	4	32	1024	128
AS-BCMV-21-3	0	8	1024	128
AS-BCMV-21-4	0	0	1024	128
AS-BCMV-21-5	8	32	128	128
AS-BCMV-35-1	0	0	1024	256
AS-BCMV-35-2	0	8	64	64

\* → densidade ótica, em 260 nm, das preparações purificadas

\*\* → os títulos estão representados pelo inverso da diluição dos anti-soros.

CONTROLES: AS + NaCl 0,85% - negativo  
 vírus + NaCl 0,85% - negativo  
 SN + vírus - negativo



TABELA 14 - Títulos dos anti-soros para BYMV, obtidos dos coelhos 27, 28 e 31, ensaiados em combinações homólogas e heterólogas, determinados através de testes de precipitina em tubos.

Anti-soros	Antígenos			
	PVY	LMV	BCMV	BYMV
	(D0260 = 3,5) *	(D0260 = 4,5)	(D0260 = 20)	(D0260 = 28)
AS-BYMV-27-1	0	0	0	0
AS-BYMV-27-2	0	0	128	128**
AS-BYMV-27-3	0	0	1024	2048
AS-BYMV-28-1	0	0	0	2
AS-BYMV-28-2	8	128	512	512
AS-BYMV-28-3	0	32	512	1024
AS-BYMV-31-1	0	0	0	0
AS-BYMV-31-2	0	8	1024	1024
AS-BYMV-31-3	0	4	512	1024

\* → densidade ótica em 260 nm, das preparações purificadas

\*\* → os títulos estão representados pelo inverso da diluição dos anti-soros.

CONTROLES: AS + NaCl 0,85% - negativo  
 vírus + NaCl 0,85% - negativo  
 SN + vírus - negativo

As primeiras séries de sangrias dos AS-BYMV-27, 28 e 31, não reagiram com PVY, LMV, BCMV e BYMV, quer em combinações homólogas, quer em heterólogas; porém, em todas as 2ª e 3ª séries destes anti-soros, tem-se que o valor dos títulos homólogos é igual ou maior que o dos heterólogos.

Os AS-BYMV-27, 28 e 31 não reagiram com PVY, em combinação heteróloga, exceto em AS-BYMV-28-2, cujo título heterólogo é 8.

Os títulos obtidos em combinações de AS-BYMV-com LMV, variam de zero a 32, exceto em AS-BYMV-28-2, onde o valor é de 128.

Nas séries 2 e 3 de AS-BYMV-27, AS-BYMV-28 e AS-BYMV-31, os títulos heterólogos para BCMV variam de 128 a 1024.

Os valores, expressos na Tabela 15, representam os resultados obtidos na titulação de várias séries de anti-soros para PVY, em combinações com preparações purificadas à partir de plantas de fumo, quenopódio e feijoeiro não infectadas. A concentração, em termos de densidade ótica em 260nm, destas preparações, é de 3,5; 4,5 e 28, para fumo, quenopódio e feijoeiro, respectivamente.

Os títulos obtidos nas combinações AS-PVY e fumo, variam de zero a 16, observando-se a mesma variação em AS-PVY e quenopódio. Os títulos para AS-PVY e feijoeiro variam de zero a 8, exceto em AS-PVY-8-3 e AS-PVY-13-2, cujos valores respectivos são 64 e 32.

A Tabela 16 expressa os valores obtidos na titulação de algumas séries de AS-LMV, contra preparações purificadas à partir de plantas não infectadas de fumo, quenopódio e feijoeiro. Estas preparações tiveram a sua concentração fixada, em termos de densidade ótica em 260nm, em 3,5; 4,5 e 28, respectivamente para fumo, quenopódio e feijoeiro.

Pode-se observar pelos resultados desta tabela que os AS-LMV ensaiados não reagem contra fumo. Além disso, nota-se que os valores obtidos variam de 2 a 4 nas combinações de AS-LMV com quenopódio, exceto em AS-LMV-5-13, AS-LMV-19-3 e AS-LMV-19-4, onde os respectivos valores são 16, 64 e 8. Nas combinações AS-LMV contra feijoeiro, os títulos variam de zero a 64.

TABELA 15 - Títulos de anti-soros para PVY, obtidos dos coelhos 8, 13, e 15, ensaiados em combinação com preparações purificadas à partir de plantas de fumo, quenopódio e feijoeiro não infectadas, em testes de precipitina em tubos.

Anti-soros	Antígenos		
	f.s. (D0260 = 3,5)*	q.s. (D0260 = 4,5)	fj.s. (D0260 = 28)
AS-PVY-8- 2	2**	-***	0
AS-PVY-8- 3	8	-	64
AS-PVY-8- 5	2	-	4
AS-PVY-8- 6	2	-	8
AS-PVY-8- 7	0	8	-
AS-PVY-8- 8	2	0	8
AS-PVY-8- 9	0	2	-
AS-PVY-8-10	4	0	0
AS-PVY-8-11	2	-	0
AS-PVY-13-2	0	-	32
AS-PVY-13-3	0	16	-
AS-PVY-13-4	0	0	8
AS-PVY-13-5	4	0	8
AS-PVY-15-1	0	-	0
AS-PVY-15-2	0	-	0
AS-PVY-15-3	0	0	0
AS-PVY-15-4	16	0	0

\* → densidade ótica, em 260 nm, das preparações purificadas

\*\* → os títulos estão representados pelo inverso da diluição dos anti-soros

\*\*\* → combinação não ensaiada

f.s. → preparação purificada à partir de plantas de fumo sadias

q.s. → preparação purificada à partir de plantas de quenopódio sadias

fj.s. → preparação purificada à partir de plantas de feijoeiro sadias

CONTROLES: AS + NaCl 0,85% - negativo

preparação + NaCl 0,85% - negativo

SN + preparação - negativo

TABELA 16 - Títulos de anti-soros para LMV, obtidos dos coelhos 5 e 19, ensaiados em combinação com preparações purificadas à partir de plantas de fumo, quenopódio e feijoeiro não infectadas, em testes de precipitina em tubos.

Anti-soros	Antígenos		
	f.s.	q.s.	fj.s.
	(D0260 = 3,5)*	(D0260 = 4,5)	(D0260 = 28)
AS-LMV-5-6	-***	4**	64
AS-LMV-5-7	-	4	0
AS-LMV-5-8	-	4	2
AS-LMV-5-10	0	2	0
AS-LMV-5-11	-	2	32
AS-LMV-5-13	0	16	8
AS-LMV-19-2	-	2	0
AS-LMV-19-3	0	64	16
AS-LMV-19-4	0	8	0

\* → densidade ótica, em 260 nm, das preparações purificadas

\*\* → os títulos estão representados pelo inverso da diluição dos anti-soros

\*\*\* → combinação não ensaiada

f.s. → preparação purificada à partir de plantas de fumo sadias

q.s. → preparação purificada à partir de plantas de quenopódio sadias

fj.s. → preparação purificada à partir de plantas de feijoeiro sadias

CONTROLES: AS + NaCl 0,85% - negativo

preparação + NaCl 0,85% - negativo

SN + preparação - negativo

Os valores, apresentados na Tabela 17, expressam os resultados obtidos na titulação de algumas séries de AS-BCMV contra preparações purificadas à partir de plantas não infectadas de fumo, quenopódio e feijoeiro. Como nos outros casos, cada preparação teve sua concentração fixada, em termos de sua densidade ótica, em 260 nm, em 3,5; 4,5 e 28, para fumo, quenopódio e feijoeiro, respectivamente.

Nesta tabela pode-se notar que nas combinações: fumo x AS-BCMV-14-6, AS-BCMV-21-5 e AS-BCMV-35-2, não se observa qualquer reação. Nestas mesmas séries de AS-BCMV ensaiadas contra quenopódio, observa-se os respectivos valores em titulação: 2, 8 e zero.

Nos ensaios, em que se combinou AS-BCMV e feijoeiro, tem-se títulos que variam de 4 a 32.

Os valores expressos na Tabela 18, representam os títulos obtidos em ensaios, em que se combinou algumas séries de AS-BYMV com preparações purificadas à partir de plantas não infectadas de quenopódio e feijoeiro, que foram diluídas até uma concentração, em densidade ótica (260 nm) de 4,5 para quenopódio e de 28 para feijoeiro.

Como está representado na tabela, não se observou qualquer reação na combinação: AS-BYMV-28-2 x quenopódio; e, os títulos na combinação AS-BYMV e feijoeiro variam de 4 a 8.

TABELA 17 - Títulos de anti-soros para BCMV, obtidos dos coelhos 6, 10, 12, 14, 20, 21 e 35, ensaiados em combinação com preparações purificadas à partir de plantas de fumo, quenopódio e feijoeiro não infectadas, em testes de precipitação em tubos.

Anti-soros	Antígenos		
	f.s.	q.s.	fj.s.
	(D0260 = 3,5) *	(D0260 = 4,5)	(D0260 = 28)
AS-BCMV-6	-***	-	32**
AS-BCMV-10-1	-	-	4
AS-BCMV-10-2	-	-	16
AS-BCMV-10-3	-	-	32
AS-BCMV-10-4	-	-	2
AS-BCMV-12	-	-	32
AS-BCMV-14-2	-	-	16
AS-BCMV-14-3	-	-	8
AS-BCMV-14-4	-	-	8
AS-BCMV-14-5	-	-	8
AS-BCMV-14-6	0	2	8
AS-BCMV-20	-	-	16
AS-BCMV-21-2	-	-	32
AS-BCMV-21-3	-	-	16
AS-BCMV-21-4	-	-	8
AS-BCMV-21-5	0	8	4
AS-BCMV-35-1	-	-	8
AS-BCMV-35-2	0	0	8

\* → densidade ótica, em 260 nm, das preparações purificadas

\*\* → os títulos estão representados pelo inverso da diluição dos anti-soros

\*\*\* → combinação não ensaiada

f.s. → preparação purificada à partir de plantas de fumo sadias

q.s. → preparação purificada à partir de plantas de quenopódio sadias

fj.s. → preparação purificada à partir de plantas de feijoeiro sadias

CONTROLES: AS + NaCl 0,85% - negativo

preparação + NaCl 0,85% - negativo

SN + preparação - negativo

TABELA 18 - Títulos de anti-soros para BYMV, obtidos dos coelhos 27, 28 e 31, ensaiados em combinação com preparações purificadas à partir de plantas de quenopódio e feijoeiro não infectadas, em testes de precipitina em tubos.

Anti-soros	Antígenos		
	f.s.	q.s.	fj.s.
	(D0260 = 3,5)*	(D0260 = 4,5)	(D0260 = 28)
AS-BYMV-27-2	-***	-	8**
AS-BYMV-27-3	-	-	4
AS-BYMV-28-2	-	0	8
AS-BYMV-28-3	-	-	4
AS-BYMV-31-2	-	-	8
AS-BYMV-31-3	-	-	4

\* - densidade ótica, em 260 nm, das preparações purificadas

\*\* - os títulos estão representados pelo inverso da diluição dos anti-soros

\*\*\* - combinação não ensaiada

f.s. - preparação purificada à partir de plantas de fumo sadias

q.s. - preparação purificada à partir de plantas de quenopódio sadias

fj.s. - preparação purificada à partir de plantas de feijoeiro sadias

CONTROLES: AS + NaCl 0,85% - negativo  
 preparação + NaCl 0,85% - negativo  
 SN + preparação - negativo

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Purificação do PVY, LMV, BCMV e BYMV

O esquema utilizado na purificação dos quatro vírus estudados no presente trabalho, baseia-se no descrito por WETTER (1960), com modificações. A principal contribuição do método deste autor, foi no que concerne à clarificação dos extratos dos caules e folhas recém-colhidos de plantas infectadas, porque o emprego dos solventes orgânicos (éter etílico e tetracloreto de carbono) resultou em sobrenadantes límpidos e aparentemente isentos de cloroplastos. Segundo WETTER (1960), quando da mistura de partes iguais de suco e éter, livre de peróxidos, emulsionados sob agitação, ocorre uma coagulação dos componentes coloidais não infectivos do suco, tais como cloroplastos, resultando em preparações parcialmente purificadas, sorologicamente ativas e infectivas. Os resultados, obtidos nos testes de precipitina em tubos, (Tabelas 11, 12, 13 e 14), vêm confirmar esta observação do autor, pois os títulos dos anti-soros atingiram níveis satisfatórios, indicando que as preparações com vírus foram ativas, tanto na reação "in vitro", como "in vivo", induzindo a formação de anticorpos nos animais com elas imunizados.

Os solventes orgânicos, segundo alguns autores (STEERE, 1959; DELGADO-SANCHEZ & GROGAN, 1966; JONES & TOLIN, 1972), utilizados na clarificação do suco de plantas com vírus, diminuem a sua concentração, considerando-se a perda da infectividade, em testes biológicos. Os resultados dos testes sorológicos, no presente trabalho, sugerem, porém, que o tratamento do extrato com tetracloreto de carbono e éter não prejudicou as partículas de vírus, pelo menos no que se refere à sua antigenicidade, confirmando os trabalhos de BERCKS (1959), WETTER (1960), SCOTT (1962) e VAN REGENMORTEL (1964), uma vez que as preparações não foram ensaiadas quanto à infectividade.

A técnica de clarificação do extrato de plantas infectadas, descrita por WETTER (1960), foi adotada por BERCKS (1960a, 1960b, 1961) e VAN REGENMORTEL et alii (1962) que trabalharam na determinação



das relações sorológicas de BCMV e de BYMV, entre si, e com outros vírus do grupo do PVY. Assim, BERCKS (1960a) utilizou preparações semi-purificadas com éter na produção de anti-soros para BYMV e BCMV, e em testes sorológicos. Em um trabalho anterior, BERCKS (1959), empregou a mesma técnica na obtenção de preparações com BCMV, demonstrando, então, que este vírus é sorologicamente ativo. O mesmo autor (BERCKS, 1960b, 1961), num trabalho sobre o estudo das relações sorológicas entre PVY, BYMV e vírus do mosaico da beterraba, preparou anti-soros, pela imunização com preparações contendo BYMV e vírus do mosaico da beterraba, purificadas segundo o método de WETTER (1960), que em reações cruzadas, permitiram ao autor verificar as relações entre estes vírus. VAN REGENMORTEL et alii (1962), em um trabalho sobre o vírus do mosaico da melancia, utilizaram, na produção de anti-soro, preparações parcialmente purificadas com este vírus, de acordo com o método de WETTER (1960). O título do anti-soro, preparado por BERCKS (1960a), para BCMV foi de 3500, em combinações homólogas, e para BYMV o maior valor foi de 48000. BERCKS (1960b e 1961) conseguiu títulos de 128000 para anti-soro para BYMV e de 600 para anti-soro para vírus do mosaico da beterraba. E, VAN REGENMORTEL et alii (1962) verificou que o maior título de anti-soro para vírus do mosaico da melancia foi de 16000.

Os valores, obtidos na titulação dos anti-soros para PVY, LMV, BCMV e BYMV, em combinações homólogas (Tabelas 11, 12, 13 e 14), vêm confirmar os resultados dos mencionados autores quanto à validade do método de WETTER (1960) na obtenção de preparações purificadas com vírus, sorologicamente ativos, uma vez que, no presente trabalho, os títulos dos anti-soros para PVY, LMV, BCMV e BYMV atingiram valores de 8192, 8192, 4096 e 2048, respectivamente.

Pelos resultados, obtidos nos testes de precipitina em tubos, em que foram ensaiados os anti-soros para PVY, LMV, BCMV e BYMV contra preparações purificadas à partir de plantas não infectadas, utilizando-se a técnica do éter-tetracloro de carbono (Tabelas 15, 16, 17 e 18), pode-se depreender que as preparações com vírus não foram totalmente isentas do material celular da planta hospedeira, e, que além disso, este material de diversas plantas hospedeiras apresenta reatividade cruzada. Todavia, tem-se que estes resultados não invalidam os ob

tidos em combinações de anti-soros para PVY, LMV, BCMV e BYMV contra preparações com este vírus, (Tabelas 11, 12, 13 e 14) como será discutido adiante.

Exames ao microscópio eletrônico, das preparações purificadas (Figura 1) revelam que as partículas de PVY, LMV, BCMV e BYMV têm uma acentuada tendência em se agregar pelas extremidades e, também, no sentido do seu comprimento, formando aglomerados compactos. Esta tendência dos vírus alongados em se aglomerar, quando em preparações purificadas, foi observada também por outros autores (REICHMANN, 1959; SHEPHERD & POUND, 1960; CORBETT, 1961; VAN REGENMORTEL et alii, 1962; DELGADO-SANCHEZ & GROGAN, 1966), sendo que alguns atribuíram a causa deste fenômeno ao possível envolvimento de cátions bivalentes ou interações hidrofóbicas. É interessante notar que este comportamento das partículas de PVY, LMV, BCMV e BYMV, parece não ter influído na sua manifestação como antígenos, fato também mencionado por DELGADO-SANCHEZ & GROGAN (1966) ao se referirem aos trabalhos de CREMER (1951), BARTELS (1957), HAMANN (1962), BARTELS (1964) e PURCIFULL & SHEPHERD (1964).

## 5.2. Padronização da concentração das preparações com vírus

A avaliação da concentração das preparações com vírus, em termos de sua densidade ótica, em 260 nm, foi satisfatória como um parâmetro na padronização destas preparações, ensaiadas em testes de precipitina em tubos. Este procedimento trouxe vantagens de ordem prática, pois as concentrações das preparações foram avaliadas fácil e rapidamente em análises espectrofotométricas; além disso, redundou em economia dessas preparações, pois, sabia-se que, dentro de certos limites, uma preparação com alta densidade ótica, poderia ser diluída até um certo nível, sem ter diminuída a capacidade de reação nos testes de precipitina (Tabelas 5, 6, 7 e 8). Outro fato, que justificou a adoção deste tipo de avaliação da concentração das preparações, foram os resultados obtidos nos testes de precipitina nos quais se ensaiou preparações purificadas à partir de plantas infectadas e não infectadas. Pode-se ob

servar nas tabelas 11 e 15, que o valor dos títulos de 20 séries de AS-PVY-8, AS-PVY-13 e AS-PVY-15, quando ensaiadas contra preparações com PVY (D0260=3,5), variou de 32 a 8192, enquanto que, em 17 destas séries, em combinações com preparações purificadas à partir de plantas não infectadas de fumo (D0260=3,5), o valor do título variou de zero a 16. Nas tabelas 12 e 16, os valores, obtidos na titulação de 17 séries de AS-LMV-5 e AS-LMV-19, ensaiadas contra preparações com LMV (D0260=4,5), variaram de zero a 8192, enquanto que os títulos de 9 destas séries ensaiadas contra preparações purificadas à partir de plantas sadias de quenopódio (D0260=4,5), variaram de 2 a 64. Nas tabelas 13 e 17, pode-se notar que, a variação dos títulos de 21 séries de sete AS-BCMV, em combinação com preparações com BCMV (D0260=20), foi de 16 a 4096, e também que a variação dos títulos de 18 séries destes sete AS-BCMV, combinadas com preparações purificadas à partir de plantas de feijoeiro sadias (D0260=28), foi de 2 a 32. Pelo exame das tabelas 14 e 18, vê-se que os títulos de 9 séries de três AS-BYMV, em combinação com preparações com BYMV (D0260=28) variaram de zero a 2048, enquanto que nas reações de 6 séries destes três AS-BYMV a variação dos títulos foi de 4 a 8, quando ensaiadas contra preparações purificadas à partir de plantas sadias de feijoeiro (D0260=28). Tendo em vista estes resultados, pode-se deprender que os compostos normais da célula hospedeira, que absorvem luz em um comprimento de onda de 260 nm, estão diluídos a um nível tal que reagem com os anti-soros somente quando estes estão pouco diluídos. Isto significa que ao diluirmos a preparação com vírus até um certo valor em D0260, a concentração em compostos normais será bem menor do que a concentração em partículas de vírus, em um certo limite, que minimiza a influência dos primeiros na interpretação dos testes sorológicos.

Diversos autores (CAMPBELL & TOCHIHARA, 1969; MILNE & GROGAN, 1969; FRIBOURG & DE ZOETEN, 1970; THOTTAPPILLY et alii, 1972; UYEMOTO et alii, 1972; GOTLIEB & BERBEE, 1973; STEVENSON & HAGEDORN, 1973) têm-se utilizado, também, da medida direta da densidade ótica das preparações com vírus, como um parâmetro, na padronização da concentração dessas preparações.

### 5.3. Testes de dupla-difusão em ágar

As reações sorológicas, detectadas em testes de dupla-difusão em ágar, entre alguns dos anti-soros obtidos e as preparações com PVY, LMV, BCMV e BYMV, como mostram os resultados (Figura 2), foram de fraca intensidade e manifestaram-se junto dos orifícios em que se colocou estas preparações. Este problema de detecção de reações sorológicas, em que estão envolvidos vírus de partículas alongadas, se deve provavelmente a uma pronunciada interação eletrostática entre essas partículas e os grupos ionizados, presentes em gel de ágar, ou então, à desproporção entre as dimensões das partículas e o diâmetro dos poros da camada de ágar a 1%. Estas observações estão em acordo com as conclusões de vários autores (HAMILTON, 1964; PURCIFULL & SHEPHERD, 1964; TOMLINSON et alii, 1965; TOMLINSON & WALKEY, 1967; MILNE & GROGAN, 1969; SHEPARD, 1969; SHEPARD & SECOR, 1969; GOODING Jr. & BING, 1970; PURCIFULL & GOODING Jr., 1970; SHEPARD, 1970; DE BOKHX & WATERREUS, 1971), que indicam diversos tratamentos das preparações com vírus, visando fragmentar as partículas em unidades menores, afim de facilitar a sua difusão em meio de ágar. Os tratamentos constam da aplicação de ultra-som, detergentes, soluções tampão de pH alto, piridina ou pirrolidina, etc.

Os valores expressos na tabela 9, são resultantes da titulação de anti-soros para PVY, LMV, BCMV e BYMV, em combinações homólogas e heterólogas, em testes de dupla-difusão em ágar. Estes valores são muito baixos, indicando fracas reações em combinações heterólogas, sendo assim os resultados sem consistência. Além disso, pode-se observar na tabela 10, que os testes de dupla-difusão em ágar foram pouco sensíveis em relação aos testes de precipitina em tubos, nas condições em que foram conduzidos os experimentos.

A determinação das relações sorológicas entre vírus de partícula alongada, como os do grupo do PVY, através de testes de dupla-difusão em ágar, é viável somente se as preparações com vírus forem submetidas a tratamentos prévios, como foi salientado anteriormente. Os

trabalhos dos autores (HAMILTON,1964; PURCIFULL & SHEPHERD,1964; TOMLINSON et alii,1965; TOMLINSON & WALKEY,1967; MILNE & GROGAN,1969;SHEPARD, 1969; SHEPARD & SECOR,1969; GOODING Jr. & BING,1970; PURCIFULL & GOODING Jr.,1970; SHEPARD,1970; DE BOKHX & WATERREUS,1971), vêm comprovar esta afirmação.

Aproveitando estas experiências anteriores, SHEPARD et alii, (1974), imunizaram coelhos com preparações purificadas com vírus "etch" do fumo e com PVY, previamente tratadas com pirrolidina e formaldeído, segundo método descrito por SHEPARD (1970,1972). Os autores combinaram os anti-soros para vírus "etch" do fumo e PVY, assim obtidos, com preparações contendo 14 vírus do grupo do PVY, tratadas também segundo o método mencionado acima, em testes de dupla-difusão em ágar. Os resultados obtidos pelos autores, vêm demonstrar que os testes de dupla-difusão em ágar podem ser usados no estudo das relações sorológicas entre vírus cujas partículas têm aspecto alongado, desde que estas partículas sejam submetidas à ação de agentes que as fragmentem ou dissociem em sub-unidades menores. O uso destes testes traz a vantagem de se poder observar o aspecto das linhas de precipitação formadas pela reação de vários vírus em combinação heteróloga, e conseqüentemente as relações sorológicas entre estes vírus.

#### 5.4. Testes de precipitina em tubos

Os valores observados na tabela 11, indicam que, em certas fases da imunização dos coelhos 8, 13 e 15, a taxa de anticorpos alcança um nível tal que permite a detecção de reações sorológicas em combinações heterólogas. Assim, os títulos de AS-PVY-8, nas séries 7, 8, 9 e 10, obtidos em combinações heterólogas com preparações com LMV, são 64, 256, 128 e 1024, respectivamente. Os títulos heterólogos para LMV, na tabela 11, do AS-PVY-13, mostram valores significativos nas séries 3 e 4 deste anti-soro da ordem de 128 e 64, respectivamente. Na mesma tabela, observa-se que nas séries 3 e 4 de AS-PVY-15, os títulos heterólogos para LMV são de 64 a 512, respectivamente.

Estes resultados, obtidos em combinações heterólogas destes anti-soros para PVY com preparações com LMV, permitem considerar-se

que PVY e LMV são sorologicamente relacionados.

O valor 64 estabelecido como título mínimo indicativo de relação sorológica entre dois vírus numa combinação heteróloga é naturalmente um critério arbitrário, tendo em vista as considerações de BERCKS (1966) sobre o relativismo das expressões: títulos baixos e títulos altos. Todavia, em se considerando os valores expressos nas tabelas 15, 16, 17 e 18, representativos dos títulos de anti-soros para PVY, LMV, BCMV e BYMV, ensaiados contra preparações purificadas à partir de plantas não infectadas, verifica-se que em todas as combinações os títulos não foram maiores do que 32, exceto na tabela 15, na combinação AS-PVY-8-3 x feijoeiro sadio, e na tabela 16, na combinação AS-LMV-5-6 x feijoeiro sadio, onde os respectivos títulos atingiram o valor de 64. Além disso, a consideração de que as relações sorológicas entre PVY e LMV é verdadeira, pelo fato de serem observados títulos heterólogos iguais ou superiores a 64, baseia-se na verificação de que estas séries de AS-PVY quando tituladas contra preparações purificadas à partir de plantas de quenopódio sadias, terem no máximo um título igual a 16, observando-se, na maioria das combinações, ausência de reação (Tabela 16). Assim, pode-se afirmar que as reações observadas são nitidamente sorológicas, onde as partículas de vírus são os principais antígenos envolvidos.

Por outro lado, deve-se notar na tabela 12 que as relações sorológicas entre PVY e LMV, não são evidenciadas nas combinações AS-LMV e preparações com PVY, exceto em AS-LMV-5-10 x PVY, onde o título heterólogo é de 512. Este valor pode ser considerado como excepcional, pois nas demais combinações a reação é nula, ou quase nula. Todavia, considerando que nesta série de AS-LMV-5 o título homólogo atingiu o valor máximo de 4096, durante o curso da imunização, pode-se admitir que a taxa de anticorpos produzidos nesta fase de imunização tenha sido suficiente para reagir com PVY, numa proporção detectável no teste de precipitina em tubos. Em paralelo, tem-se que, pelo exame da tabela 16, a série 10 de AS-LMV-5 não reagiu com preparação purificada à partir de plantas de fumo não infectadas. Além disso, como foi observado em outros casos, existem vários exemplos na literatura, de trabalhos em que se

considerou certos vírus como sorologicamente relacionados com outros, baseando-se em simples determinações unilaterais, isto é, um anti-soro para um vírus A reagiria em combinação com um vírus B, mas o anti-soro para o vírus B não reagiria com o vírus A. Assim, BERCKS (1960b, 1961), VAN REGENMORTEL et alii (1962), BARTELS (1964), FRIBOURG & DE ZOETEN (1970) e BARTELS (1971) também observaram, em combinações heterólogas, reações unilaterais, mas mesmo assim, consideraram os vírus estudados como sorologicamente afins. Segundo BERCKS (1966), esta falha nas reações cruzadas, significa que os anti-soros ensaiados contêm uma certa quantidade de anticorpos que não produz reação sorológica detectável ao nível dos testes de precipitina. Este autor, conseguiu obter resultados positivos, com este tipo de anti-soro, submetendo-os a tratamentos que concentrassem seus anticorpos.

A verificação de que PVY e LMV são sorologicamente relacionados, vem confirmar as observações de BRANDES (1964) e SHEPARD et alii (1974), que trabalhando com outros isolados destes vírus, determinaram que são sorologicamente afins. O primeiro autor, ao descrever as principais características do LMV refere-se a uma comunicação pessoal de BARTELS sobre a detecção de uma fraca reação sorológica entre preparações com LMV e anti-soros para PVY de alto título. Contudo, BRANDES (1964) não apresenta mais detalhes em seu trabalho. SHEPARD et alii (1974) imunizaram coelhos com preparações com vírus "etch" do fumo e com PVY, tratadas com pirrolidina e formaldeído, segundo método descrito por SHEPARD (1970, 1972). Os anti-soros obtidos foram ensaiados, em testes de dupla-difusão em ágar, contra preparações tratadas com pirrolidina-formaldeído com 14 vírus do grupo PVY, inclusive LMV. As linhas de precipitação, observadas nestes testes, fundiam-se nas extremidades quando em combinações heterólogas, indicando que as proteínas dissociadas dos capsídeos das partículas de vírus eram sorologicamente afins. Isto quer dizer que o LMV é relacionado com outros 12 vírus do grupo, de acordo com SHEPARD et alii (1974).

Os experimentos de SHEPARD et alii (1974), embora tenham conduzido a conclusões semelhantes, não são comparáveis aos do presente trabalho, pelo fato de que as preparações com vírus ensaiadas e injeta-

das não terem sido submetidas a tratamento prévio no sentido de serem dissociadas as sub-unidades das partículas de vírus. Além disso, nos testes de dupla-difusão foram ensaiados preparações não tratadas e anti-soros de animais injetados com estas preparações. Possivelmente, se as considerações de SHEPARD et alii (1974) forem levadas em conta, haja vantagem de se trabalhar com preparações com vírus, cujos capsídeos tenham sido dissociados, pois desta forma sítios antigênicos que não estivessem expostos na partícula intacta, e fossem comuns aos vírus estudados, estimulassem a formação de novos anticorpos, aumentando assim as chances de aparecimento de reações cruzadas, dentro de um período menor de imunização.

É de interesse notar que embora tenha havido discrepâncias fundamentais na metodologia, os dois trabalhos chegaram às mesmas conclusões sobre o relacionamento sorológico entre PVY e LMV.

Observando-se os valores expressos na tabela 11, obtidos pela titulação de anti-soros para PVY em combinação com preparação com BCMV, pode-se depreender que apenas em uma das séries de AS-PVY-8, a de número 3, ocorreu uma reação cruzada com BCMV, observando-se um título de 128. Todavia, esta comprovação carece de consistência pois nesta série 3 de AS-PVY-8, quando ensaiada contra preparação purificada à partir de plantas de feijoeiro não infectadas, observou-se um título de 64. Isto significa que AS-PVY-8-3, ensaiado, continha anticorpos reagentes para material normal de células de plantas de feijoeiro. Por outro lado, a tabela 13 não registra qualquer reação heteróloga entre sete anti-soros para BCMV e preparações com PVY.

Assim, pelos resultados obtidos, nas condições em que os experimentos foram conduzidos, pode-se afirmar que PVY e BCMV não têm reações sorológicas. Porém, à mesma conclusão não chegaram SHEPARD et alii (1974) em seus experimentos já mencionados sobre as reações cruzadas de proteínas dissociadas de capsídeos de partículas de 14 vírus do grupo do PVY, estando entre eles, o BCMV. Esta disparidade, observada entre os dois trabalhos, pode estar relacionada com a metodologia aplicada em cada um, o que se conclui que o tratamento prévio utilizado por SHEPARD et alii (1974) das preparações com vírus, permitiria a exposição de cer



tos grupos antigênicos ocultos na partícula de vírus, como já se discutiu anteriormente. Isto possibilitaria o aumento da chance das reações cruzadas serem mais intensas e, assim, detectáveis nos testes sorológicos. No presente trabalho tal metodologia não foi aplicada e provavelmente, é esta a razão pela qual os resultados obtidos são diferentes dos de SHEPARD et alii (1974).

Os valores obtidos na titulação de AS-PVY-8, 13 e 15, em combinação com preparações com BYMV, expressos na tabela 11, indicam que em várias séries destes anti-soros ocorreram reações heterólogas, considerando-se 64 como um título mínimo. Assim, no AS-PVY-8, tem-se que as séries 2, 3, 5, 6, 8, 10 e 11 reagem em combinação heteróloga. Em AS-PVY-13, as séries 2, 4 e 5 mostram reação heteróloga com BYMV. Igualmente, nas séries 1, 2, 3 e 4 de AS-PVY-15. Estes resultados, de acordo com os apresentados na tabela 15, podem ser considerados como consistentes, exceto na combinação AS-PVY-8-3 com BYMV, pois quando este AS-PVY-8-3 foi ensaiado contra preparação purificada à partir de plantas não infectadas de feijoeiro o valor do título obtido foi o mesmo da combinação com BYMV.

Pode-se depreender, pelo que foi apresentado acima, que PVY e BYMV são sorologicamente relacionados entre si. Todavia, a constatação desta relação é unilateral, pois pela tabela 14, os resultados obtidos na titulação de três AS-BYMV contra preparação com PVY, carecem de consistência.

A determinação das relações sorológicas de PVY e BYMV vem confirmar os resultados de BERCKS (1960b, 1961) e VAN REGENMORTEL et alii (1962), que utilizando outros isolados destes vírus, detectaram as suas afinidades sorológicas. Estas detecções foram de forma unilateral, porque os autores observaram reações heterólogas somente com anti-soros para BYMV com títulos homólogos da ordem de 128000 e 256000.

Na tabela 12, estão expressos os valores obtidos na titulação de AS-LMV-5 e AS-LMV-19 em combinações homólogas e heterólogas com PVY, BCMV e BYMV. Por estes títulos, pode-se depreender que ocorreram reações heterólogas com BCMV, considerando-se 64 como título mínimo. Assim, tem-se os valores de 128, 64 e 64, respectivamente, para as séries

6, 7 e 8 de AS-LMV-5, titulado contra preparações com BCMV. Todavia, a reação heteróloga entre AS-LMV-5-6 e BCMV não tem consistência pois como pode ser observado na tabela 15, o título de 64, foi obtido na combinação desta mesma série de AS-LMV-5 e preparação purificada à partir de plantas de feijoeiro não infectadas. Por outro lado, a tabela 13 não registra qualquer reação heteróloga entre sete anti-soros para BCMV e preparações com LMV.

Pelo que foi apresentado acima, tem-se que LMV e BCMV não tem relações sorológicas, provavelmente, porque as duas reações heterólogas, mencionadas acima, representam uma parca evidência para se afirmar o contrário. Porém, no já mencionado trabalho de SHEPARD et alii (1974), determinou-se que, entre as proteínas dos capsídeos dissociados destes dois vírus, existe uma relação sorológica. A explicação para a disparidade de resultados, entre este trabalho e o de SHEPARD et alii (1974), como já foi mencionado anteriormente, reside no fato destes autores terem submetido suas preparações com vírus a tratamento prévio, conseguindo assim aumentar as chances de reações sorológicas pela exposição de grupos antigênicos que estariam ocultos na partícula de vírus intacta.

Na mesma tabela 12, estão registrados os valores obtidos na titulação de AS-LMV-5 e 19, ensaiados, contra preparações com BYMV. Pode-se observar por meio destes valores que as séries 7, 8, 10, 11 e 13 de AS-LMV-5 e as séries 2, 3 e 4 de AS-LMV-19 reagiram em combinações heterólogas com BYMV, considerando-se como título mínimo, o valor 64.

Assim, pode-se concluir que LMV e BYMV têm relações sorológicas entre si, uma vez que os valores obtidos, pela titulação destas séries de AS-LMV-5 e 19, ensaiadas com preparações purificadas à partir de plantas de feijoeiro não infectadas, não ultrapassam 32 (tabela 16).

Por outro lado, tem-se na tabela 14, que dos três AS-BYMV titulados, em combinação com preparações contendo LMV, um deles, o AS-BYMV-28, reagiu na série 2 com LMV. Observa-se, também, que na tabela-18, esta série 2 de AS-BYMV-28, quando ensaiada contra preparação purificada à partir de plantas de quenopódio não infectadas, não mostrou qualquer reação.

Na literatura consultada, não se encontrou registro algum sobre a determinação de relações entre LMV e BYMV, porém, a despeito da ausência de constatação anterior, os resultados, obtidos no presente trabalho, demonstram que esta relação é definida.

Confirmando os trabalhos de vários autores (BEEMSTER & VAN DER WANT, 1951; BERCKS, 1960a; ZAUMEYER & GOTH, 1964; BOS, 1970; UYEMOTO et alii, 1972), que utilizando outros isolados de BCMV e BYMV, determinaram que estes dois vírus estão relacionados sorologicamente entre si, no presente trabalho, com base nos resultados obtidos, também verificou-se o mesmo. Assim, pelo exame dos valores obtidos na titulação de sete anti-soros para BCMV e três anti-soros para BYMV, expressos nas tabelas 13 e 14, constata-se que na maioria das combinações heterólogas com BCMV e BYMV, ocorreram reações cruzadas de apreciável nitidez. Esta determinação é reforçada pelo fato destes anti-soros para BCMV e BYMV, quando titulados contra preparações purificadas à partir de plantas não infectadas de feijoeiro, apresentarem títulos, cujos valores não ultrapassaram 32.

#### 5.5. Considerações gerais

Em um sentido mais amplo, pode-se observar que, pelas relações sorológicas entre os vírus estudados no presente trabalho, o PVY, o LMV e o BYMV estariam provavelmente compreendidos em um mesmo sub-grupo. É interessante notar que apesar do BCMV estar relacionado com o BYMV, considerando-se a morfologia e dimensões de suas partículas, além de suas íntimas relações sorológicas, aquele vírus parece não ser afim com o PVY e LMV. SHEPARD et alii (1974) determinaram que as proteínas dos capsídeos dissociados de PVY, LMV e BCMV são sorologicamente relacionadas; mas esta conclusão parece reforçar a hipótese, acima anunciada, pois este relacionamento não parece tão evidente quando se utiliza preparações não tratadas nos testes sorológicos.

A evidência de que os vírus de planta são relacionados sorologicamente, conduz a uma série de especulações sobre a origem e o significado desta afinidade. Uma hipótese, que poderia ser aventada, é a de que estas relações existiriam, não exatamente entre os vírus, mas

devidas a produtos, comuns a todos os vírus de um determinado grupo, elaborados na célula da planta hospedeira, após a infecção. Esses produtos comuns, poderiam ser as inclusões citoplasmáticas ou nucleares, observadas nas células de plantas infectadas por vários vírus do grupo do PVY. Contudo, HIEBERT et alii (1971) conseguiram purificar inclusões lamelares produzidas nas células de plantas hospedeiras, infectadas pelo PVY e pelo vírus "etch" do fumo. Estes autores determinaram que estas inclusões têm propriedades imunogênicas, mas são sorologicamente distintas umas das outras, dos seus respectivos vírus e das proteínas das plantas hospedeiras. Este trabalho vem, portanto, demonstrar que a hipótese, acima enunciada, não se fundamenta em observações práticas. A hipótese mais aceita é a de que existiria uma relação entre a afinidade sorológica e a constituição molecular dos vírus relacionados. Isto tem sido evidenciado por alguns autores (KNIGHT & STANLEY, 1941; KNIGHT et alii, 1962; STACE-SMITH & TREMAINE, 1970). Neste último trabalho, os autores determinaram que a composição do PVY, em amino-ácidos, é parecida com a da proteína do vírus "etch" do fumo, sorologicamente relacionado com o PVY.

A evidência de que, entre os vírus estudados existem algumas relações sorológicas, leva à consideração de que, de acordo com BRANDES & BERCKS (1965), estas relações seriam a consequência de um processo evolutivo que os conduziu a uma diferenciação à partir de ancestrais comuns. Como argumento, pode-se lembrar que ocorrem nos vírus os mesmos fenômenos de mutação, observados nos organismos superiores, que desempenham um importante papel no processo de evolução. Além disso, tem-se que os graus de afinidade sorológica variam desde os mais próximos até os mais distantes, numa gama que indicaria até que ponto os vírus estariam afastados dos seus ancestrais comuns.

HANSEN (1957) também concorda com a teoria da evolução dos vírus de planta, mas considera que uma origem comum não resulta necessariamente num relacionamento íntimo, e que uma nítida afinidade não é dependente ou indicativa de uma origem comum.

Considerando-se os resultados obtidos neste trabalho e naqueles relatados na literatura, pode-se afirmar que a contribuição da sorologia na classificação dos vírus de planta, é mais valiosa do que

outros métodos utilizados, tais como a determinação do círculo de hospedeiras e a sintomatologia. Contudo, de acordo com BERCKS (1966), os métodos bioquímicos e biofísicos também devem ser considerados. E, segundo VAN REGENMORTEL (1966), com o aumento nos conhecimentos da sequência química das proteínas dos vírus, pode-se tornar possível desenvolver uma paleogenética química dos vírus de planta, de acordo com os mesmos princípios aplicados em estudos filogenéticos da estrutura química da hemoglobina (ZUCKERKANDL & PAULING, 1962; BRAUNITZER et alii, 1964).

## 6. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos no presente trabalho, pode - se concluir que :

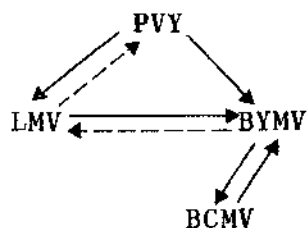
- a aplicação de um sistema difásico éter-tetracloro de carbono, como técnica de clarificação do suco extraído de plantas infectadas com os vírus estudados, foi eficiente na obtenção de extratos clarificados, que quando submetidos a ultracentrifugação, resultaram em preparações semi-purificadas de satisfatório comportamento antigênico, tanto nos testes sorológicos, como na indução da formação de anti-corpos nos animais imunizados.

- os testes de precipitina em tubos apresentam u'a maior sensibilidade, que os de dupla-difusão em ágar, na titulação de anti-soros ensaiados com preparações contendo partículas filiformes, como as do PVY, LMV , BCMV e BYMV, nas condições em que os testes foram conduzidos.

- com base nos resultados, obtidos pela titulação de anti-soros para PVY, LMV, BCMV e BYMV, contra preparações com PVY, LMV, BCMV e BYMV , em combinações homólogas e heterólogas, através de testes de precipitina em tubos, estabeleceu-se que:

- o PVY tem relações sorológicas definidas com o LMV e com o BYMV;
  - o LMV tem relações sorológicas definidas com o PVY e com o BYMV;
  - o BCMV tem relações sorológicas próximas e definidas com o BYMV;
  - o BYMV tem relações sorológicas próximas e definidas com o BCMV, e simplesmente definidas com o PVY e com o LMV.
- Os resultados da titulação dos anti-soros preparados não foram suficiientemente consistentes para se estabelecer qualquer relação entre PVY e BCMV, e entre LMV e BCMV.

Com base nos valores determinados na titulação dos anti-soros, através de testes de precipitina em tubos, as relações sorológicas, entre os vírus estudados, podem ser expressas pelo esquema seguinte :



————→ relações sorológicas nítidas

- - - - -> relações sorológicas detectadas com poucos anti-soros

## 7. RESUMO

Isolados de PVY, LMV, BCMV e BYMV foram multiplicados por inoculação mecânica nas folhas de plantas de fumo, quenopódio e feijoeiro, respectivamente, induzindo infecção do tipo sistêmico. Estes isolados foram parcialmente purificados à partir dos caules e folhas, destas plantas infectadas, homogeneizados em presença de solução tampão de fosfato 0,1 M de pH 7,0, contendo sulfito de sódio a 0,5%. O extrato filtrado foi clarificado por adição de éter etílico e tetracloreto de carbono, e os vírus foram concentrados por ultracentrifugação. As micrografias eletrônicas das preparações parcialmente purificadas de PVY, LMV, BCMV e BYMV mostraram um grande número de partículas alongadas e flexíveis, de variados tamanhos e frequentemente agregadas entre si. Estas preparações foram injetadas em coelhos, tanto por via intravenosa, como por via intramuscular, utilizando-se diferentes esquemas de imunização, para produção de anti-soros. Estes anti-soros foram titulados, através de testes de dupla-difusão em ágar, e testes de precipitina em tubos, em combinações homólogas e heterólogas com as preparações de PVY, LMV, BCMV e BYMV. Em comparação com os testes de dupla-difusão em ágar, os testes de precipitina em tubos demonstraram ser muito mais sensíveis na detecção de anti-corpos em baixa concentração.

As relações sorológicas entre o PVY, LMV, BCMV e BYMV foram detectadas pela comparação dos títulos homólogos e heterólogos dos anti-soros, ensaiados em testes de precipitina em tubos, e, pelos resultados obtidos, pode-se afirmar que :

- o PVY tem relações sorológicas com o LMV e o BYMV.
- o LMV tem relações sorológicas com o PVY e o BYMV.
- o BCMV tem relações sorológicas próximas com o BYMV.
- o BYMV tem relações sorológicas próximas com o BCMV.
- o BYMV tem relações sorológicas com o LMV e o PVY.

Os valores dos títulos dos anti-soros para PVY, LMV e BCMV, quando ensaiados, em combinações homólogas e heterólogas, contra preparações com PVY, LMV e BCMV não foram significativos de forma a se



poder afirmar que o PVY, bem como o LMV, tenham relações sorológicas com o BCMV.

Os resultados obtidos vêm complementar o esquema de classificação dos vírus de planta, cujas partículas têm forma alongada, proposto por BRANDES & BERCKS (1965), que estabelece como critérios de similaridade, a morfologia da partícula de vírus e suas relações sorológicas.

## 8. SUMMARY

PVY, LMV, BCMV and BYMV isolates were transmitted by manual inoculation of sap, infecting systemically *Nicotiana tabacum* L. var. *Turkish*, *Chenopodium quinoa* L. and *Phaseolus vulgaris* L. plants respectively. These isolates were partially purified from homogenates of infected stems and leaves in 0,1M phosphate buffer (pH 7,0) containing 0,5% sodium sulfite. The filtered homogenate was clarified by adding ether and carbon tetrachloride and the viruses were concentrated and partially purified by ultracentrifugation. Electron-micrographs showed virus preparations to contain filamentous particles, many of which were aggregated or fragmented. Antisera to PVY, LMV, BCMV and BYMV were prepared in rabbits injected with purified virus intravenously or intramuscularly, following several immunization schedules. These antisera were titred in agar double-diffusion and precipitin tests with the respective homologous and heterologous virus preparations. In comparative trials, precipitin tests were much more sensitive than double-diffusion tests for detecting low antibody concentrations.

Serological relationships between PVY, LMV, BCMV and BYMV were established by comparison of homologous and heterologous antisera titres in precipitin tests, and from the results we can assume that:

- PVY is related to LMV and BYMV
- LMV is related to PVY and BYMV
- BCMV is closely related to BYMV
- BYMV is closely related to BCMV
- BYMV is related to LMV and PVY

On the basis of the serological results, no valid statements on serological relationships between PVY-BCMV and LMV-BCMV are possible.

The results supplement classification of elongated plant viruses on a morphological and serological basis as suggested by BRANDES & BERCKS (1965).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

1. BAGNALL, R.H. A virus from *Solanum phureja*. *Phytopathology*, 53 : 546-7, 1963.
2. BARTELS, R. Ein Beitrag zum serologischen Nachweis des Y-Virus in der Kartoffel. *Phytopathol. Z.*, 30:1-16, 1957.
3. BARTELS, R. Serologische Differenzierungsversuche mit Stämmen des Kartoffel-Y-Virus. In: CONFERENCE ON POTATO VIRUS DISEASES, 3<sup>o</sup>, Lisse-Wageningen, 24-28 June 1957. *Proc.* 1958. p.13-9.
4. BARTELS, R. Untersuchungen über serologische Beziehungen zwischen Viren der "tobacco-etch-Virus-Gruppe". *Phytopathol. Z.*, 49:257-65, 1964.
5. BARTELS, R. Serologische Verwandtschaft des Tulip breaking virus mit Viren des Kartoffel-Y-Gruppe. *Phytopathol. Z.*, 71:87-90, 1971.
6. BAWDEN, F.C. & KASSANIS, B. Serological related strains of potato virus Y that are not mutually antagonistic in plants. *Ann. Appl. Biol.*, 38 :402-10, 1951.
7. BEALE, HELEN P. Serological reaction as a means of determining the concentration of tobacco mosaic virus. *Phytopathology*, 23:4, 1933, (Abstract).
8. BEALE, HELEN P. The serum reaction as an aid in the study of filterable viruses of plants. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 6:407-35, 1934.
9. BEEMSTER, A.B.R. & VAN DER WANT, J.P.H. Serological investigations on *Phaseolus* viruses 1 and 2. *Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.*, 17:285-96, 1951.
10. BEHNCKEN, G.M. The occurrence of peanut mottle virus in Queensland. *Aust. J. Agric. Res.*, 21:465-72, 1970.
11. BERCKS, R. Serologische Untersuchungen über das *Phaseolus*-Virus 1. *Phytopathol. Z.*, 35 :105-18, 1959.

---

<sup>1</sup>De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Referências bibliográficas: normas brasileiras*, PNB-66. Rio de Janeiro, 1970. 31p.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos: BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE OF BIOLOGICAL ABSTRACTS. *Biosis list of periodicals with coden, title abbreviations, new, changed and ceased titles*. Philadelphia, 1973. 197p.

12. BERCKS, R. Serologische Untersuchungen zur Differenzierung von Isolaten des *Phaseolus*-Virus 2 und ihrer Verwandtschaft mit *Phaseolus*-Virus 1. *Phytopathol. Z.*, 39:120-8, 1960a.
13. BERCKS, R. Serological relationships between beet mosaic virus, potato virus Y and bean yellow mosaic virus. *Virology*, 12:311-3, 1960b.
14. BERCKS, R. Serologische Verwandtschaft zwischen Kartoffel-Y-Virus, Rübemosaik-Virus und *Phaseolus*-Virus 2. *Phytopathol. Z.*, 40:357-65, 1961.
15. BERCKS, R. The significance of weak cross-reactions with high-titre antisera. In: BEEMSTER, A.B.R. & DJIKSTRA, Jeanne ed., *Viruses on plants*. Amsterdam, Holland Pub. Co., 1966. p.205-12.
16. BIRKELAND, J.M. Serological studies of plant viruses. *Bot. Gaz.*, 95:419-36, 1934.
17. BOCK, K.R. East African strains of cowpea aphid-borne mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.*, 74:75-83, 1973a.
18. BOCK, K.R. Peanut mottle virus in East Africa. *Ann. Appl. Biol.*, 74:171-9, 1973b.
19. BODE, O. & BRANDES, J. Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Kohlrüben-mosaik-Virus (turnip mosaic virus). *Phytopathol. Z.*, 34:103-6, 1958.
20. BODE, O. & PAUL, H.L. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Kartoffelviren. III. Vermessungen an Teilchen des Kartoffel-Y-Virus. *Phytopathol. Z.*, 27:107-12, 1956.
21. BOS, L. The identification of three new viruses isolated from *Wisteria* and *Pisum* in The Netherlands, and the problem of variation within the potato virus Y group. *Neth. J. Plant Pathol.*, 76:8-46, 1970.
22. BOS, L. Bean common mosaic virus. *Descrip. Plant Viruses*, (73): 1971.

23. BRAKKE, M.K. Wheat streak mosaic virus. *Descrip. Plant Viruses*, (48): 1971.
24. BRANDES, J. Elektronenmikroskopische Größenbestimmung von acht stäbchen- und fadenförmigen Pflanzenviren. *Phytopathol. Z.*, 35:205-10, 1959.
25. BRANDES, J. Identifizierung von gestreckten pflanzenpathogenen Viren auf morphologischer Grundlage. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtsch. Berl-Dahlem*, 110:130, 1964.
26. BRANDES, J. & BERCKS, R. Gross morphology and serology as a basis for classification of elongated plant viruses. *Adv. Virus Res.*, 11:1-24, 1965.
27. BRANDES, J. & PAUL, H.L. Das Elektronenmikroskop als Hilfsmittel bei der Diagnose pflanzlicher Viroser. Betrachtungen zur Vermessung faden- und stäbchenförmiger Virusteilchen. *Arch. Mikrobiol.*, 26:358-68, 1957.
28. BRANDES, J. & QUANTZ, L. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Buschbohnenviren (*Phaseolus*-Virus 1 und *Phaseolus*-Virus 2). *Naturwissenschaften*, 42:588, 1955.
29. BRANDES, J. & WETTER, C. Classification of elongated plant viruses on the basis of particle morphology. *Virology*, 8:99-115, 1959.
30. BRAUNITZER, G.; HILSE, K.; RUDLOFF, V.; HILSCHMANN, N. The hemoglobine. *Adv. Protein Chem.*, 19:1-71, 1964.
31. BRENNER, S. & HORNE, R.W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta*, 34:103-10, 1959.
32. BRUNT, A.A. Some hosts and properties of bulbous Iris mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.*, 61:187-94, 1968.
33. BRUNT, A.A. Virus diseases of narcissus. *Daffodil Tulip Yb.*, 36:18-37, 1970.
34. Brunt, A.A. Narcissus yellow stripe virus. *Descrip. Plant Viruses*, (76):1971.

35. BRUNT, A.A. & ATKEY, P.T. Rapid detection of Narcissus yellow stripe and two other filamentous viruses in crude negatively-stained Narcissus sap. *Rep. Glasshouse Crops Res. Inst.*, 1966:155-9, 1967.
36. BRUNT, A.A. & KENTEN, R.H. Pepper veinal mottle virus- a new member of potato virus Y group from peppers (*Capsicum annuum* L and *C. frutescens* L) in Ghana, *Ann. Appl. Biol.*, 69:235-43, 1971.
37. CAMARGO, I.J.B.; KITAJIMA, E.W.; COSTA, A.S. Microscopia eletrônica de tecidos de plantas infectadas pelo vírus do mosaico da cenoura. *Ciênc. Cult., São Paulo*, 20:351-2, 1968.
38. CAMPBELL, R.N.; MIELINIS, NANCY M.; HALL, D.H. Transmission of sweet potato russet crack virus. *Phytopathology*, 62:750, 1972 (Abstract).
39. CAMPBELL, R.N. & TOCHIHARA, H. Radish enation mosaic virus is a strain of radish mosaic virus. *Phytopathology*, 59:1756-7, 1969.
40. CASPER, R. & BRUNT, A.A. Das Freesia streak virus- ein in Deutschland neues Freesienvirus. *Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzdienst., Braunschweig*, 23 :89-90, 1971.
41. CATHERALL, P.L. Anthoxanthum mosaic virus. *Plant Pathol.*, 19:126-7, 1970.
42. CHESTER, K.S. Serological evidence in the study of the relationships of certain plant viruses. *Phytopathology*, 25:10, 1935a (Abstract).
43. CHESTER, K.S. Serological evidence in plant-virus classification. *Phytopathology*, 25:686-701, 1935b.
44. CHESTER, K.S. Serological studies of plant viruses. *Phytopathology*, 27:903-12, 1937.
45. CHOD, J. Nekteré vlastnosti mozaiky Mrkve. (Some properties of Carrot mosaic virus). *Ochr. Rost.*, 1:49, 1965.
46. CHRISTIE, S.R.; EDWARDSON, J.R.; ZETTLER, F.W. Characterization and electron microscopy of a virus isolated from bidens and lepidium. *Pl. Dis. Rep.*, 52:763-8, 1968.

47. CONTI, M. & LOVISOLO, O. Observations on a virus isolated from *Wisteria floribunda* DC in Italy. *Riv. Patol. Veg., Pavia, Ser. IV*, 5:115-32, 1969.
48. CONWAY-JACOBS, A.; SCHECHTER, B.; SELA, M. A comparison of the antigenic specificity of random and ordered linear polypeptides composed of L-tyrosine, L-alanine and L-glutamic acid. *Eur. J. Biochem.*, 20:325-9, 1957.
49. CORBETT, M.K. Serological and morphological relationships of plant viruses. *Florida Agric. Exp. Stan. Annu. Rep.*, 1956:117-8, 1957.
50. CORBETT, M.K. Purification of potato virus X without aggregation. *Virology*, 15:8-15, 1961.
51. COSTA, A.S.; COSTA, C.L.; NAGAI, H.; KITAJIMA, E.W. Cebolinha de cheiro, fonte de vírus do mosaico em faixas da cebola, *Biológico*, 37:157-9, 1971.
52. COSTA, A.S.; KITAJIMA, E.W.; NORMANHA, E.S. Sweet potato mosaic induced by a virus of the potato Y group. *Fitopatologia, Peru*, 8:7, 1973.
53. CREMER, M.C. The preparation of antiserum against potato virus Y. In: CONFERENCE POTATO VIRUS DISEASES, 1st, Lisse-Wageningen, 1951, *Proc. p.* 85-7.
54. DE BOKHX, J.A. & WATERREUS, H.A.J.I. Serology of Potato Virus S after ultrasonic treatment. *Meded. Fak. LandbWestensch., Gent*, 36:364-75, 1971. *Meded. Inst. plziektenk. Onderz.*, 571, 1971. "citado por" *Rev. Plant Pathol.*, 51, 2768, 1972.
55. DELGADO-SANCHEZ, S. & GROGAN, R.G. Purification and properties of potato virus Y. *Phytopathology*, 56:1397-404, 1966.
56. DELGADO-SANCHEZ, S. & GROGAN, R.G. Potato virus Y. *Descrip. Plant Viruses*, (37):1970.
57. EISEN, H.M. & SISKIND, G.W. Variation in affinities of anti-bodies during the immune response. *Biochemistry*, 3:996-1008, 1964.

58. ELSER, J.E. & ALLEN, T.C. Intracellular modifications associated with streak mottle virus in *Lilium speciosum*. *Phytopathology*, 59: 10-7, 1969, (Abstract).
59. FISCHER, H.U. & LOCKHART, B.E.L. High incidence of onion yellow dwarf in areas of commercial onion production in Morocco. *Plant Dis. Rep.*, 58:252-3, 1974.
60. FRIBOURG, C.E. & DE ZOETEN, G.A. Antiserum preparation and partial purification of potato virus A. *Phytopathology*, 60:1414-21, 1970.
61. FURTH, J. Antigenic character of heated protein. *J. Immunol.*, 10: 777-89, 1928.
62. FURTHMAYR, H. & TIMPL, R. Structural requirements of antigenic determinants in the aminoterminal region of the rat collagen  $\alpha$  2 chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 47:994-50, 1972.
63. GOLD, A.H.; SCOTT, H.A.; MC KINNEY, H.H. Electron microscopy of several viruses occurring in wheat and other monocots. *Plant Dis. Rep.*, 41:250-3, 1957.
64. GOLLIFER, D.E. & BROWN, J.F. Virus diseases of *Colocasia esculenta* in the British Solomon Islands. *Plant Dis. Rep.*, 56:597-9, 1972.
65. GOODCHILD, D.F. Relationships of legume viruses in Australia. *Aust. J. Biol. Sci.*, 9:213-30, 231-7, 1956.
66. GOODING Jr., G.V. & BING, N.W. Serological identification of potato virus Y and tobacco etch virus using immunodiffusion plates containing sodium dodecyl sulfate. *Phytopathology*, 60:1293.
67. GOODING Jr. G.V. & SUN, M. A newly recognized virus diseases of burley tobacco in North Carolina. *Phytopathology*, 62:801-9, 1972. (Abstract).
68. GOVIER, D.A. & PLUMB, R.T. Henbane mosaic virus. *Descrip. Plant Viruses*, (95):1972.
69. GOVIER, D.A. & WOODS, R.D. Changes induced by magnesium ions in the morphology of some plant viruses with filamentous particles. *J. Gen. Virol.*, 13:127-32, 1971.



70. GREBER, R.S. Passion-fruit woodiness virus as the cause of Passion vine tip blight disease. *Queensl. J. Agric. Anim. Sci.*, 23:533-8, 1966.
71. HAMANN, U. Die Verwendung von *Physalis floridana* als Wirtspflanze zur Herstellung von Y-Antiserum. *Phytopathol. Z.*, 43:416-9, 1962.
72. HAMILTON, R.I. Serodiagnosis of barley stripe mosaic facilitated by detergent. *Phytopathology*, 54:1290-1, 1964.
73. HANSEN, H.P. Correlations and interrelationships in viruses and in organisms. II. The principles of the natural periodical system of plant and animal infecting viruses. *Kgl. Vet. Land-Bohjskole Arsskr.*, 31-66, 1957.
74. HARRISON, B.D. & ROBERTS, I.M. Pinwheels and crystalline structures induced by Atropa mild mosaic virus, a plant with particles 925nm long. *J. Gen. Virol.*, 10:71-8, 1971.
75. HEIN, ALICE Über das Vorkommen einer Virose an Spargel. *Z. Pflanzenkr.*, 67:217-9, 1960.
76. HENNEY, C.S. The specificity of the early immune response to dinitrophenylated human  $\gamma$ G-globulin. *Immunochemistry*, 7:275-87, 1970.
77. HEROLD, F. & WEIBEL, J. Electron microscope demonstration of papaya ringspot virus. *Virology*, 18:302-11, 1962.
78. RIEBERT, E.; PURCIFULL, D.E.; CHRISTIE, R.G.; CHRISTIE, S.R. Partial purification of inclusions induced by tobacco etch virus and potato virus Y. *Virology*, 43:683-46, 1971.
79. HOLLINGS, M. & STONE, O.M. Carnation vein mottle virus. *Descrip. Plant Viruses*, (78): 1971.
80. HULL, R. Virus diseases of garden lupin in Great Britain. *Ann. Appl. Biol.*, 61:373-80, 1968.
81. INOUE, T. The legume viruses of Japan. *Rev. Pl. Prot. Res., Tokyo*, 2:42-51, 1969.
82. JONES, R.K. & TOLIN, S.A. Factors affecting purification of maize dwarf mosaic virus from corn. *Phytopathology*, 62:812-6, 1972.

83. KAHN, R.P. & BARTELS, R. The Colombian Datura virus - a new virus in the potato virus Y group. *Phytopathology*, 58:587-92, 1968.
84. KAISER, W.J.; DANESH, D.; OKHOVAT, M.; MOSSAHEBI, H. Diseases of pulse crops (edible legumes) in Iran. *Plant Dis. Rep.*, 52:678-9, 1968.
85. KITAJIMA, E.W.; CARVALHO, ANA MARIA B.; COSTA, A.S. Morfologia do vírus do mosaico do picão. *Bragantia*, 20:503-12, 1961.
86. KITAJIMA, E.W. & COSTA, A.S. Morfologia do vírus do mosaico amarelo do salsão. *Bragantia*, 27:VII, 1968a.
87. KITAJIMA, E.W. & COSTA, A.S. Inclusões fibrosas intranucleares em plantas infectadas pelo vírus do mosaico amarelo do salsão. *Bragantia*, 27:IX, 1968b.
88. KITAJIMA, E.W. & COSTA, A.S. Vírus do mosaico do espinafre, "citado por" KITAJIMA, E.W. Morfologia dos vírus de plantas. In: ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ", Piracicaba. *Curso pós-graduado de Fitopatologia*. Piracicaba, 1971. p.7. (apostila mimeografada).
89. KITAJIMA, E.W. & COSTA, A.S. Morphology and intracellular behavior of the sweet potato mosaic virus. *Fitopatologia, Peru*, 8:9, 1973.
90. KITAJIMA, E.W.; COSTA, A.S.; CARVALHO ANA MARIA B. Morfologia do vírus da palidez das nervuras da malva. *Bragantia*, 21:CIII, 1962.
91. KLINKOWSKI, M. & SCHMELZER, K. Beiträge zur Kenntnis der Tabakrippenbrandne. *Phytopathol. Z.*, 28:285-306, 1957.
92. KNESEK, J.E. & HAMPTON, R.O. Purification of pea seed-borne virus. *Phytopathology*, 62:1101-6, 1972. (Abstract).
93. KNIGHT, C.A.; SILVA, D.M.; DAHL, DORIS; TSUGITA, A. Two distinctive strains of tobacco mosaic virus. *Virology*, 16:236-43, 1962.
94. KNIGHT, C.A. & STANLEY, W.M. Aromatic amino acids in strains of tobacco mosaic virus and in the related cucumber viruses 3 and 4. *J. Biol. Chem.*, 141:39-49, 1941.

95. LAWSON, R.H.; HEARON, S.S.; SMITH, F.F.; KAHN, R.P. Electron microscopy and separation of viruses in *Dioscorea floribunda*. *Phytopathology*, 63:1435, 1973. (Abstract).
96. LOVISOLO, O. & CONTI, M. Identification of an aphid-transmitted cowpea mosaic virus. *Neth. J. Plant Pathol.*, 72:265-9, 1966.
97. LUISONI, E. Un nuovo virus del Sedano (*Apium graveolens* L). *Atti Accad. Sci., Torino*, 100:541-4, 1966.
98. MARGOLIASH, E.; NISONOFF, A.; REICHLIN, M. Immunological activity of cytochrome *c*. Precipitating antibodies to monomeric vertebrate cytochromes *c*. *J. Biol. Chem.*, 245:931-9, 1970.
99. MATSUMOTO, T. Some experiments with azuki-bean mosaic. *Phytopathology*, 12:295-7, 1922.
100. MC LEAN, D.L. Vector-virus relationships of severe isolate of the feathery mottle virus of sweet potato and the green peach aphid *Mizus persicae* (Sulzer). Berkeley, 1958. (Thesis, University of California) 107p.
101. MILNE, K.S. & GROGAN, R.G. Characterization of watermelon mosaic virus strains by serology and other properties. *Phytopathology*, 59:809-18, 1969.
102. MOKRÁ, V. & BRCÁK, J. Pokus o charakterizaci mozaiky a nekrózy Hyacintu v CSSR. (Attempt to characterize Hyacinth mosaic and necrosis in Czechoslovakia.) *Ochr. Rost.*, 6:313-16, 1970.
103. MURANT, A.F.; MUNTHE, T.; GOOLD, R.A. Parsnip mosaic virus, a new member of the Potato virus Y group. *Ann. Appl. Biol.*, 65:127-35, 1970.
104. NELSON, M.R. & WHEELER, R.E. A new virus disease of pepper in Arizona. *Plant Dis. Rep.*, 56:731-5, 1972.
105. NISONOFF, A.; REICHLIN, M.; MARGOLIASH, E. Immunological activity of cytochrome *c*. II. Localization of a major antigenic determinant of human cytochrome *c*. *J. Biol. Chem.*, 245:940-6, 1970.

106. NOME, S.F. Sweet potato vein mosaic virus in Argentina. *Phytopathol. Z.*, 77:44-54, 1973.
107. OLIVEIRA, A.R. Serologia aplicada ao estudo do vírus do anel do pimentão, Piracicaba, 1967, (Tese- Esc. Sup. de Agr. "Luiz de Queiroz") 40p.
108. OSMAN, F.M.; WEATHERS, L.G.; GUMPF, D.J. Purification and characterization of a virus causing a latent infection in *Gynura aurantiaca*. *Phytopathology*, 62:743-800, 1972. (Abstract).
109. PAGUIO, O.R. & KUHN, C.W. Purification of a mild mottle strain of peanut mottle virus. *Phytopathology*, 63:720-4, 1973.
110. PAPA, G.; MICHELIN-LAUSAROT, P.; CASETTA, A. Purification and properties of Alliaria mosaic virus. *Phytopathol. Z.*, 78:344-56, 1973.
111. PFANKUCH, E. & KAUSCHE, G.A. Uber Darstellung, Eigenschaften und quantitative Bestimmung von Tabakmosaikvirus und Kartoffel-X-Virus und ihre physikochemische Differenzierung. *Biochem. Z.*, 299:334-45, 1938.
112. PIRONE, T.P.; GOODING Jr., G.V.; SMILEY, J.H. Tobacco vein mottling virus on burley tobacco in Kentucky. *Plant Dis. Rep.*, 57:841-4, 1973
113. PLESE, NADA & MILICIC, D. Two viruses isolated from *Maclura pomifera*. *Phytopathol. Z.*, 77:178-83, 1973.
114. PURCIFULL, D.E. & GOODING Jr., G.V. Immunodiffusion tests for potato virus Y and tobacco etch viruses. *Phytopathology*, 60:1036-9, 1970.
115. PURCIFULL, D.E.; HIEBERT, E.; MC DONALD, J.G. Immunochemical specificity of cytoplasmic inclusions induced by viruses in the potato Y group. *Virology*, 56:275-9, 1973.
116. PURCIFULL, D.E. & SHEPHERD, R.J. Preparations of the protein fragments of several rod-shaped plant viruses and their use in agar-gel diffusion tests. *Phytopathology*, 54:1102-8, 1964.

117. QUANTZ, L. Untersuchungen über das Gewöhnliche Bohnenmosaikvirus und das Sojamosaikvirus. *Phytopathol. Z.*, 43:79-101, 1961.
118. RAYMER, W.B.; KAHN, R.P.; HIKIDA, H.R.; WATERWORTH, H.E. A new tomato virus from Peru. *Phytopathology*, 62:743-800, 1972.
119. REICHMANN, M.E. Potato X virus. III. Preparation and properties of purified nonaggregated virus from tobacco. *Can. J. Chem.*, 37: 4-10, 1959.
120. SCHECHTER, B.; SCHECHTER, I.; RAMACHANDRAN, J.; CONWAY-JACOBS, A.; SELA, M.; BENJAMINI, E.; SHIMIZU, M. Synthetic antigens with sequential and conformation-dependent determinants containing the same L-tyrosyl-L-alanyl-L-glutamyl sequence. *Eur. J. Biochem.*, 20: 309-20, 1971.
121. SCHMELZER, K. Nachweis des spezifischen Wassermelonenmosaik-Virus in Kuba. *Naturwissenschaften*, 53:619, 1966.
122. SCHMIDT, H.B. & SCHMELZER, K. Elektronmikroskopische Vermessung des Zwiebelgelbstreifen - Virus. *Phytopathol. Z.*, 50:919-5, 1964.
123. SCHMIDT, H.B. & SCHMELZER, K. Elektronenmikroskopische Darstellung und Vermessung eines saftübertragbaren Virus aus der Erdnuss (*Arachis hypogaea* L). *Phytopathol. Z.*, 55:92-6, 1966.
124. SCOTT, H.A. Partial purification and serology of common bean mosaic virus. *Phytopathology*, 52:162-6, 1962. (Abstract).
125. SELA, M. Antigenicity: Some molecular aspects. *Science*, 166: 1365-74, 1969.
126. SHEPARD, J.F. Serodiagnosis of PV-X in potato tuber sprouts. *Plant Dis. Rep.*, 53:845-8, 1969.
127. SHEPARD, J.F. A radial-immunodiffusion test for potato viruses S and X. *Phytopathology*, 60:1669-72, 1970.
128. SHEPARD, J.F. Gel-diffusion methods for the serological detection of potato viruses X, S and M. *Mont. Agric. Exp. Stn. Bull.*, 662: 1-72, 1972.

129. SHEPARD, J.F. & GROGAN, R.G. Celery mosaic virus. *Descrip. Plant Viruses*, (50):1971.
130. SHEPARD, J.F. & SECOR, GARY A. Detection of potato virus X in infected plant tissue by radial and double diffusion tests in agar. *Phytopathology*, 59 :1838-44, 1969.
131. SHEPARD, J.F.; SECOR, GARY A.; PURCIFULL, D.E. Immunochemical cross-reactivity between the dissociated capsid proteins of PVY group plant viruses. *Virology*, 58:464-75, 1974.
132. SHEPHERD, R.J.; FULTON, J.P.; WAKEMAN, R.J. Properties of a virus causing pokeweed mosaic. *Phytopathology*, 59:219-22, 1969.
133. SHEPHERD, R.J. & POUND, G.S. Purification of turnip mosaic virus. *Phytopathology*, 50:797-803, 1960.
134. SILBERNAGEL, M.J. Mexican strains of BCMV. *Phytopathology*, 59: 1809-12, 1969.
135. SILBERSCHMIDT, K.; ROSTOM, E.; ULSON, C.M. A strain of potato virus Y inducing local and systemic necrotic spots on leaves of tobacco White Burley. *Am. Potato J.*, 31:213-7, 1954.
136. SINGH, S.; VARMA, A.; CHENULU, V.V.; VERMA, V.S. Pigweed mosaic virus. *Phytopathol. Z.*, 75:82-5, 1972.
137. SKOYLAND, C.B. & BURKE, D.W. A seed-borne bean virus of wide host range. *Phytopathology*, 51:565-8, 1961.
138. SNYDER, W.C. A seed-borne mosaic of asparagus bean, *Vigna sesquipedalis*. *Phytopathology*, 32:518, 1942.
139. STACE-SMITH, R. & TREMAINE, J.H. Purification and composition of potato virus Y. *Phytopathology*, 60:1785-9, 1970.
140. STAPLES, R. & BRAKKE, M. Relation of *Agropyron repens* mosaic and wheat streak mosaic viruses. *Phytopathology*, 53:969-72, 1963.
141. STEERE, R.L. The purification of plant viruses. *Adv. Virus Res.*, 6:1-73, 1959.

142. STEVENSON, W.R. & HAGEDORN, D.J. Practical purification of the pea seed-borne mosaic virus. *Phytopathology*, 63:1346-52, 1973.
143. SUN, M.K.C. & HEBERT, T.T. Purification and properties of a severe strain of peanut mottle virus. *Phytopathology*, 62:832-9, 1972.
144. TAYLOR, R.H. & KIMBLE, K.A. Two unrelated viruses which cause woodiness of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.). *Aust. J. Agric. Res.*, 15:560-70, 1964.
145. TAYLOR, R.H. & PARES, R.D. The relationship between sugar-cane mosaic virus and mosaic viruses of maize and Johnson grass in Australia. *Aust. J. Agric. Res.*, 19:767-73, 1968.
146. TAYLOR, R.H. & SMITH, P.R. The relationship between bean yellow mosaic virus and pea mosaic virus. *Aust. J. Biol. Sci.*, 21:429-37, 1968.
147. TEAKLE, D.S. & WILDERMUTH, G.B. Host range and particle length of passionfruit woodiness virus. *Queensl. J. Agric. Anim. Sci.*, 24:173-86, 1967.
148. THOTTAPPILLY, G.; BATH, J.E.; FRENCH, J.V. Aphid transmission characteristics of pea enation mosaic virus acquired from a membrane-feeding system. *Virology*, 50:681-9, 1972.
149. TOMLINSON, J.A. Purification and properties of lettuce mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.*, 53:95-102, 1964.
150. TOMLINSON, J.A. & WALKEY, D.G.A. Effects of ultrasonic treatment on turnip mosaic virus and potato virus X. *Virology*, 32:267-78, 1967.
151. TOMLINSON, J.A.; WALKEY, D.G.A.; HUGHES, D.E.; WATSON, D.H. Multiple transverse breakage of filamentous particles of turnip mosaic virus by ultrasonic vibration. *Nature*, 207:495-7, 1965.
152. UYEMOTO, J.K.; PROVVIDENTI, R.; PURCIFULL, D.E. Host range and serological properties of a seed-borne cowpea virus. *Phytopathology*, 63:119-210, 1973. (Abstract).
153. UYEMOTO, J.K.; PROVVIDENTI, R.; SCHROEDER, W.T. Serological

- relationship and detection of bean common and bean yellow mosaic virus in agar gel. *Ann. Appl. Biol.*, 71:235-42, 1972.
154. VAN REGENMORTEL, M.H.V. Purification of plant viruses by zone electrophoresis. *Virology*, 23:495-502, 1964.
155. VAN REGENMORTEL, M.H.V. Plant virus serology. *Adv. Virus Res.*, 12:207-71, 1966.
156. VAN REGENMORTEL, M.H.V.; BRANDES, J.; BERCKS, R. Investigations on the properties of watermelon mosaic virus. *Phytopathol. Z.*, 45:205-16, 1962.
157. VAN SLOGTEREN, E. Serological diagnosis of plant virus diseases *Ann. Appl. Biol.*, 42:122-8, 1955.
158. VASCONCELOS, F.A.T. Contribuição para o estudo do vírus do mosaico da soja. *An. Inst. Super. Agron. Univ. Têc. Lisb.*, 26:181-221, 1964.
159. WEINTRAUB, M. & RAGETLI, H.W.J. Distribution of virus like particles in leaf cells of *Dianthus barbatus* infected with Carnation vein mottle virus. *Virology*, 40:868-81, 1970.
160. WETTER, C. Partielle Reinigung einiger gestreckter Pflanzenviren und ihre Verwendung als Antigene bei der Immunisierung mittels Freundschem Adjuvans. *Arch. Mikrobiol.*, 37:278-92, 1960.
161. ZAUMEYER, W.J. & GOTH, R.W. Red clover necrosis virus, the cause of a streak of peas. *Plant Dis. Rep.*, 47:10-4, 1963.
162. ZAUMEYER, W.J. & GOTH, R.W. A new severe symptom-inducing strain of common bean mosaic virus. *Phytopathology*, 54:1378-85, 1964.
163. ZETTLER, F.W.; FOXE, M.J.; HARTMAN, R.D.; EDWARDSON, J.R.; CHRISTIE, R.G. Filamentous viruses infecting dasheen and other araceous plants. *Phytopathology*, 60:983, 1970.
164. ZIMMER, K. & BRANDES, J. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über das Rübenmosaik-Virus. *Phytopathol. Z.*, 26:439, 1956.
165. ZITTER, T.A. Pepper virus strain identification in southern Florida. *Phytopathology*, 62:800, 1972a.



166. ZITTER, T.A. Naturally occurring pepper virus strains in South Florida. *Plant Dis. Rep.*, 56:586-90, 1972b.
167. ZITTER, T.A. & COOK, A.A. Inheritance of tolerance to a pepper virus in Florida. *Phytopathology*, 63:1211-2, 1973.
168. ZUCKERKANDL, E. & PAULING, L. In: KASHA, M. & PULLMAN, B. ed. *Horizons in Biochemistry*. New York, Academic Press, 1962 p.189.

Família	Vírus	dimensões da partícula(nm)	principal planta hospedeira	referências
Amarantaceae	"Pigweed mosaic virus"	700 - 725 x 14	<i>Amaranthus blitum</i> L	SING et alii, 1972
Amaryllidaceae	"Eucharis mosaic virus"	740	<i>Eucharis grandiflorus</i> PLANCH	BRANDES, 1964
	"Narcissus yellow stripe virus"	755 x 12	<i>Narcissus pseudonarcissus</i> L	BRUNT & ATKEY, 1967
	"Narcissus white streak virus"	755 x 12	<i>N. pseudonarcissus</i> L	BRUNT, 1970, 1971
	"Narcissus degeneration virus"	755 x 12	<i>N. pseudonarcissus</i> L	BRUNT, 1970, 1971
Araceae	"Dasheen mosaic virus"	750	<i>Colocasia esculenta</i> (L) Schott	ZETTLER et alii, 1970
		750 - 800		GOLLIFER & BROWN, 1972
Caricaceae	"Papaya ringspot virus"	800 ± 10 x 12	<i>Carica papaya</i> L	HEROLD & WEIBEL, 1962
Caryophyllaceae	"Carnation vein mottle virus"	790 x 12	<i>Dianthus caryophyllus</i> L	HOLLINGS & STONE, 1971
		750		WEINTRAUB & RAGETLI, 1970
Chenopodiaceae	"Beet mosaic virus"	730 x 13	<i>Beta vulgaris</i> L	ZIMMER & BRANDES, 1956
	vírus do mosaico do espinafre	750 x 15	<i>Spinacea oleracea</i> L	KITAJIMA & COSTA, 1971

APÊNDICE 1 - Relação dos vírus, considerados como membros do grupo do PVY, família e espécies das principais plantas hospedeiras, dimensões das partículas (nm) e referências na literatura.

Família	Vírus	dimensões da partícula(nm)	principal planta hospedeira	referências
Compositae	Vírus de <i>Gynura aurantiaca</i>	700 x 20	<i>Gynura aurantiaca</i> Sch.	OSMAN et alii, 1972
	Vírus do mosaico do picão ou "Bidens mottle virus"	720 x 15 700 - 760	<i>Bidens pilosa</i> L	KITAJIMA et alii, 1961 CHRISTIE et alii, 1968
	Vírus do mosaico da alface	750 x 13	<i>Lactuca sativa</i> L	TOMLINSON, 1964
	"Sweet potato vein mosaic virus"	761 x 13	<i>Ipomoea batatas</i> (L) Lam.	NOME, 1973
Convolvulaceae	Vírus do mosaico da batata doce	850 x 15	<i>Ipomoea batatas</i> (L) Lam.	COSTA et alii, 1973
	"Sweet potato feathery mottle virus" ou	850	<i>Ipomoea batatas</i> (L) Lam.	MC LEAN, 1958
	"Sweet potato russet crack virus" ou	800	<i>Ipomoea batatas</i> (L) Lam.	
	"Sweet potato internal cork virus"	844 376	<i>Ipomoea batatas</i> (L) Lam.	CAMPBELL et alii, 1972
	Cucurbitaceae	Vírus do mosaico da melancia	725 746 - 765	<i>Citrullus vulgaris</i> Schrad
"Turnip mosaic virus"		680		SHEPHERD & POUND, 1960
		722	<i>Brassica rapa</i> L	TOMLINSON & WALKEY, 1967
	754		BODE & BRANDES, 1958	
	"Alliaria mosaic virus"	745	<i>Alliaria officinalis</i> Andr.	PAPA et alii, 1973

Família	Vírus	dimensões da partícula(nm)	principal planta hospedeira	referências
Dioscoreaceae	Vírus de <i>Dioscorea floribunda</i>	690 - 755	<i>Dioscorea floribunda</i> Mart & Gal.	LAWSON et alii, 1973
Gramineae	"Sugarcane mosaic virus"	750	<i>Saccharum officinarum</i> L	BRANDES, 1964
	"Cocksfoot streak virus"	752 x 13	<i>Dactylis glomerata</i> L	BRANDES, 1959
	"Agropyron mosaic virus"	868-886 x 17,6-19,5	<i>Agropyron repens</i> Beauv.	GOLD et alii, 1954
		700 - 760		STAPLES BRAKKE, 1963
		700		BRAKKE, 1971
"Anthoxanthum mosaic virus"	740-760 x 13	<i>Anthoxanthum odoratum</i> L	CATHERALL, 1970	
Iridaceae	"Bulbous Iris mosaic virus"	760	<i>Iris danfordiae</i> Boiss, <i>I. reticulata</i> Bieb	BRUNT, 1968
	"Freesia streak virus"	840	<i>Freesia refracta</i> Klatt	CASPER & BRUNT, 1971
Leguminosae	Vírus do mosaico amarelo do feijoeiro	750 x 15	<i>Phaseolus vulgaris</i> L	BRANDES & QUANTZ, 1955
	Vírus do mosaico comum do feijoeiro	750 x 15	<i>Phaseolus vulgaris</i> L	BRANDES & QUANTZ, 1955
	"Pea mosaic virus"	750	<i>Pisum sativum</i> L	BRANDES, 1964
	Vírus do mosaico da soja	746	<i>Glycine soja</i> Sieb	QUANTZ, 1961; VASCONCELOS, 1964
	"Cowpea aphid-borne mosaic virus"	758	<i>Vigna unguiculata</i> (L) Walp.	BRANDES, 1964
		750		LOVISOLO & CONTI, 1966

Família	Vírus	dimensões da partícula(nm)	principal planta hospedeira	referências
Leguminosae (cont.)	"Peanut mottle virus" ou Vírus do mosaico do amendoim	763 x 15	<i>Arachis hypogaea</i> L	SCHMIDT & SCHMELZER, 1966
	"Wisteria vein mosaic virus"	774 750	<i>Wistaria floribunda</i> DC <i>W. sinensis</i> DC	BOS, 1970 CONTI & LOVISOLO, 1969
	"Pea necrosis virus"	750	<i>Pisum sativum</i> L	BOS, 1970
	"Pea leafroll mosaic virus" ou "Pea seed-borne mos. virus"	752	<i>Pisum sativum</i> L	BOS, 1970 KNESEK & HAMPTON, 1972
	"Clover yellow vein virus"	767	<i>Trifolium repens</i> L <i>T. pratense</i> L	GIBBS et alii, 1966
	"Lupin mottle virus"	759	<i>Lupinus polyphyllus</i> Lindl. <i>L. arboreus</i> Sims.	HULL, 1968
	"Red clover necrosis virus"	?	<i>Trifolium pratense</i> L	ZAUMEYER & GOTH, 1963
	"Bean western mosaic virus"	?	<i>Phaseolus vulgaris</i> L	SKOTLAND & BURKE, 1961 SILBERNAGEL, 1969
	Vírus de <i>Voandzeia subterranea</i>	754	<i>Voandzeia subterranea</i> Thou	BOCK, 1973b
	"Blackeye cowpea mosaic virus"	?	<i>Vigna unguiculata</i> (L) Walp	CORBETT, 1957 SHEPARD et alii, 1974
	"Cowpea seed-borne virus"	750	<i>V. unguiculata</i> (L)Walp	UYEMOTO et alii, 1973
Liliaceae	"Hyacinth mosaic virus"	783 x 13	<i>Hyacinthus orientalis</i> L	MOKRÁ & BRCÁK, 1970
	Vírus do mosaico em faixa da cebola ou "Onion yellow dwarf virus"	767 x 16 772 x 16 730 x 780	<i>Allium cepa</i> L	COSTA et alii, 1971 SCHMIDT & SCHMELZER, 1964 FISCHER & LOCKHART, 1974

Família	Vírus	dimensões da partícula(nm)	principal planta hospedeira	referências	
Liliaceae (cont.)	"Asparagus virus 1"	763	<i>Asparagus officinalis</i> L	HEIN, 1960; BRANDES, 1964	
	"Tulip breaking virus"	740 x 14	<i>Tulipa gesneriana</i> L	BRANDES & BERCKS, 1965	
	Vírus do "streak mottle" do lírio	750	<i>Lilium longiflorum</i> Thumb	ELSER & ALIEN, 1969	
	Vírus do mosaico do Nothoscordum	765-790 x 19,1-20,0	<i>Nothoscordum fragrans</i> (Vent) Kunth	GOLD et alii, 1957	
Malvaceae	"Malva vein clearing virus"	830 x 15	<i>Malva parviflora</i> L	KITAJIMA et alii, 1962	
Passifloraceae	"passion fruit woodiness virus"	670	<i>Passiflora coerulea</i> L	TAYLOR & KIMBLE, 1964	
		700 - 800 730 - 745	<i>P. edulis</i> L	GREBER, 1966 TEAKLE & WILDERMUTH, 1967	
Solanaceae	Vírus Y da batata	730 x 11	<i>Solanum tuberosum</i> L	DELGADO-SANCHEZ & GROGAN, 1970	
	Vírus "etch" do fumo	730 x 12-13	<i>Nicotiana tabacum</i> L	BRANDES & WETTER, 1959	
	Vírus A da batata	730 x 15	<i>Solanum tuberosum</i> L	BRANDES & PAUL, 1957	
	Vírus SB29	734	<i>Solanum phureja</i> Juz. & Bulk	BAGNALL, 1963	
	"Henbane mosaic virus"	724 850 800-900 x 12 13	<i>Hyoscyamus niger</i> L	L	BRANDES, 1959
		KITAJIMA & COSTA, 1973			
	"Colombian Datura virus"	721 ± 28	<i>Datura candida</i> L <i>Datura sanguinea</i> Ruiz & Pav.	L	KAHN & BARTELS, 1968
	Vírus do mosaico fraco de Atropa	950	<i>Atropa belladonna</i> L	L	HARRISON & ROBERTS, 1971
"Atropa mild mosaic virus"	925			KITAJIMA & COSTA, 1973	

Família	Vírus	dimensões da partícula(nm)	principal planta hospedeira	referências
Solanaceae (cont.)	"Tobacco vein mottling virus"	730 x 13 730 - 780	<i>Nicotiana tabacum</i> L, <i>var. Burley</i>	GOODING Jr. & SUN, 1972 PIRONE et alii, 1973
	"Peru tomato virus"	750	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	RAYMER et alii, 1972
	"Pepper veinal mottle virus"	770-850 x 12	<i>Capsicum annuum</i> L, <i>C. frutescens</i> L	BRUNT & KENTEN, 1971
	"Arizona pepper virus"	722 x 22	<i>C. annuum</i> L	NELSON & WHEELER, 1972
	"Pepper mottle virus"	?	<i>C. annuum</i> L	ZITTER, 1972a, 1972b ZITTER & COOK, 1973
Umbelliferae	"Celery mosaic virus"	784	<i>Apium graveolens</i> L <i>var. dulce</i>	SHEPARD & GROGAN, 1971
	Vírus do mosaico amarelo do salsaço	750 x 12-15	<i>Apium graveolens</i> L <i>var. dulce</i>	KITAJIMA & COSTA, 1968a, 1968b
	"Celery latent virus"	860	<i>A. graveolens</i> L var. <i>dulce</i>	LUISONI, 1966
	"Parsnip mosaic virus"	755 x 14	<i>Pastinacia sativa</i> L	MURANT et alii, 1970
	Vírus do mosaico da cenoura	752 760 x 15	<i>Daucus carota</i> L	CHOD, 1965 CAMARGO et alii, 1968
Urticaceae	Vírus de <i>Maclura pomifera</i>	700 - 800	<i>Maclura pomifera</i> (Raf) Robinson	PLESE & MILICIC, 1973