

Impl
Dez

**EFEITO TERAPÊUTICO DE VIRAZOLE SOBRE OS VÍRUS
CAUSADORES DO ENROLAMENTO DA FOLHA DA
VIDEIRA, ANEL DO PIMENTÃO E TRISTEZA DOS CITROS.**

CÉLIA REGINA BAPTISTA
-Bióloga-

Orientador: Prof. Dr. JORGE VEGA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas.
Área de concentração:
Fisiologia Vegetal.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida por (a) candidato a)
Célia Regina Baptista
e aprovada pela Comissão Julgadora.

27
07
95

CAMPINAS - SP
1995

95 21392

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	B 229e
V.	Ex
TOMBO BC	26173
PROC.	433/95
C	<input type="checkbox"/>
	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	01/12/95
N.º CPD	

CM-00081282-8

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

B229e	<p>Baptista, Celia Regina Efeito terapêutico de virazole sobre os virus causadores do enrolamento da folha, anel do pimentão e tristeza dos citros / Celia Regina Baptista. — Campinas, SP : [s.n.], 1995.</p> <p>Orientador: Jorge Vega. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Quimioterapia. 2. Ribavirin. 3. Virus de plantas. I. Vega, Jorge. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
-------	--

*À minha mãe e à
memória de meu pai*

DEDICO

*Ao Junior e aos
meus irmãos*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A todos que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização desta dissertação, em especial a:

- Dr. Jorge Vega
- Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira
- Dr. Gerd Walter Müller
- Dr. Hugo Kuniyuki
- Dr. Paulo Mazzafera
- Dr. Marcos A. Machado
- Dra. Elizabeth A.B. De Nardo
- Dr. Joaquim Teófilo Sobrinho
- Antonio Grassi Junior
- Edson Tobias Domingues
- Maria Luisa P. N. Targon
- Sandra Scagliusi
- José Luis Silvério
- Seção de Virologia do Instituto Agronômico de Campinas
- Centro de Citricultura Sylvio Moreira
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES
- Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa - FAEP

ÍNDICE

	PAG.
LISTA DE ABREVIATURA	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Virazole	3
2.1.1. Metabolismo do Virazole	5
2.1.2. Modo de ação do Virazole	5
2.2. Considerações gerais sobre o vírus do enrolamento da folha da videira.....	10
2.2.1. Transmissão.....	14
2.2.2. Plantas hospedeiras e Sintomatologia.....	14
2.3. Considerações gerais sobre o vírus do anel do pimentão.....	15
2.3.1. Propriedades gerais	15
2.3.2. Plantas hospedeiras e Sintomatologia.....	16
2.3.3. Composição da partícula	17
2.4. Considerações gerais sobre o vírus da tristeza dos citros.....	18
2.4.1. Transmissão	19
2.4.2. Plantas hospedeiras e Sintomatologia	20
2.4.3. Caracterização e Serologia	21
2.4.4. Propriedades da partícula	22

2.4.5. Caracterização de estirpes do vírus da tristeza dos citros.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Vírus do enrolamento da folha da videira	26
3.1.1. Cultura de calos "in vitro"	26
3.1.2. Meios de cultivo para obtenção de calos de videira.....	27
3.1.3. Condições de luz e temperatura	27
3.1.4. Tratamento de calos de videira com Virazole.....	29
3.2. Vírus do anel do pimentão	29
3.2.1. Inoculação do VAP em plantas de fumo e <i>G. globosa</i>	29
3.2.2. Culturas de calos "in vitro"	30
3.2.3. Tratamento com Virazolo em calos com VAP (Exp.1)	30
3.2.4. Tratamentos com Virazole durante a indução de calos em folhas com VAP (Exp. 2)	31
3.3. Vírus da tristeza dos citros	33
3.3.1. Plantas fonte de vírus da tristeza dos citros.....	33
3.3.2. Obtenção do porta-enxerto	33
3.3.3 Obtenção do ápice para enxerto	34
3.3.4. Enxertia <i>in vitro</i>	35
3.3.5. Estabelecimento das plantas obtidas em porta-enxertos desenvolvidos.....	39
3.4. Testes Serológicos	42
3.4.1. Eletroforese de proteínas totais e Western-blot	42
3.4.2. Microscopia eletrônica de imuno-adsorção (MEIAD)	43

3.4.3. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	44
3.5. Antissoros para os vírus em estudo utilizados nos testes serológicos	46
3.5.1. Vírus do enrolamento da folha da videira	46
3.5.2. Vírus do anel do pimentão	46
3.5.3. Vírus da tristeza dos citros	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1. Vírus do enrolamento da folha da videira	47
4.1.1. Efeito de diferentes combinações de reguladores de crescimento na indução de calos	47
4.1.2. Efeito de diferentes concentrações de Virazole no crescimento dos calos de videira e na concentração de vírus do enrolamento da folha da videira.....	49
4.2. Vírus do anel do pimentão	51
4.2.1. Efeito de diferentes concentrações de Virazole no crescimento de calos de fumo e <i>G. globosa</i> no conteúdo de vírus	51
4.2.2. Efeito de diferentes concentrações de Virazole na indução <i>in vitro</i> de calos de folhas de fumo e <i>G. globosa</i> e no conteúdo de vírus do anel do pimentão.....	53
4.3. Vírus da tristeza dos citros	59
5. CONCLUSÕES	67
Referências Bibliográficas	69

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4 - D	Ácido 2,4 - diclorofenoxiacético
2-Me	2- Mercaptoetanol
A	Adenosina
A 405	Absorbância a 405 nm
ABA	Ácido abscísico
AIA	Ácido indol acético
Ara-C	Citosina - A- β -D- arabino - furanoside - HCl
BAP	Benzil - aminopurina
BCIP	5. bromo - 4 chloro - 3 - indolyl phosphate
C	Citidina
CA	Isolado Califórnia do vírus de enrolamento da folha
CAM	Estirpe Campinas do vírus "rattle" do fumo
CEV	Citrus exocortis viroid
CIN	Cinetina
CIVV	Citrus infectious variegation virus
CMV	Cucumber mosaic virus
CP	Capa proteica
CTV	Citrus tristeza virus
DA - DHT	Diacetyldihydro-5- azauracil - DHT
DASI - ELISA	Double antibody sandwich indirect - ELISA
DHT	2.4 dioxohexahidro - 1,3,5 - triazina
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ds-RNA	RNA de fita dupla
ELISA	Enzime linked immunosorbent assay
Fud R	5. fluoro - deoxiuridina
G	Guanosina
GLRaV	Grapevine leafroll associated virus
GSP-AV	Grapevine stem pitting associated virus
IAC	Instituto Agronômico de Campinas

LISTA DE FIGURAS

	PAG.
1. Similaridade estrutural entre Virazole (A) e Guanosina (B)	4
2. Esquema do procedimento da purificação do VAP	32
3. A) Estaca de limão Galego cultivada em meio MS acrescido de Virazole B) Brotações da estaca	36
4. Preparo do porta-enxerto. A) Semente de <i>C. troyer</i> . B) Plântula obtida da semente germinada no escuro após 2 semanas. C) Plântula pronta para receber o enxerto.....	37
5. Obtenção da planta após cerca de 4 semanas da enxertia	38
6. Planta enxertada sobre porta-enxerto de limão Cravo	40
7. Esquema de purificação do VTC	41
8. Efeito de diversas concentrações de Virazole sobre o conteúdo de vírus do enrolamento da folha da videira em calos avaliado por ELISA.....	50
9. Efeito de diversas concentrações de Virazole sobre o conteúdo de VAP em calos de fumo avaliado por ELISA.....	52
10. Efeito de diversas concentrações de Virazole sobre o conteúdo de VAP em calos de <i>G. globosa</i> avaliado por ELISA.....	54
11. Efeito de diversas concentrações de Virazole sobre o conteúdo de VAP em explantes de fumo avaliado por ELISA.....	55
12. Microscopia eletrônica de imuno-adsorção (MEIAD) em calos de fumo infectados com VAP. A) Calos controle sem tratamento. B) Calos tratados com 100 ppm de Virazole C) Calos tratados com 200 ppm de Virazole.....	56

13. Efeito de diversas concentrações de Virazole sobre o conteúdo de VAP em explantes de <i>G. globosa</i> avaliado por ELISA.....	58
14. Efeito terapêutico de Virazole contra infecção pelo CTV em plantas de limão Galego. Plantas A e B apresentam paralisação de crescimento. A) Controle infectado que não recebeu tratamento. B) Planta tratada com 100 ppm de Virazole. C) Planta tratada com 200 ppm de Virazole. D) Controle sadio.....	61
15. Folhas de plantas de limão Galego infectadas com CTV. As folhas B e C apresentam-se menores em relação ao controle A e com sintomas de palidez das nervuras. A) Controle sadio. B) Controle infectado que não recebeu tratamento. C) Tratamento com 100 ppm de Virazole. D) Tratamento com 200 ppm de Virazole.....	62
16. Efeito de diversas concentrações de Virazole sobre o conteúdo de CTV em plantas de limão Galego infectadas, avaliado por ELISA.....	63
17. Western-blot da proteína do capsídeo de CTV. Ausência das bandas no controle sadio B e planta tratada com 200 ppm de Virazole E. A) Vírus da tristeza purificada. B) Limão Galego sadio. C) Limão Galego infectado sem tratamento. D) Limão Galego infectado tratado com 100 ppm de Virazole. E) Limão Galego infectado tratado com 200 ppm de Virazole.....	64

LISTA DE TABELAS

PAG.

1. Propriedades de Closterovírus isolados de videiras infectadas com enrolamento da folha.....	11
2. Composição dos meios utilizados para cultura de calos de videira <i>in vitro</i>	28
3. Efeito de diferentes combinações de reguladores de crescimento, adicionados ao meio MS na formação de calos, 8 semanas após a inoculação dos explantes.....	48

RESUMO

Com o objetivo de estudar o efeito quimioterápico de Virazole (1- β -D-ribofuranosil -1, 2, 4 - triazol -3 - carboxamida) *in vitro* sobre vírus de plantas, dois modelos de estudo foram realizados. No primeiro utilizou-se calos de videira *Vitis vinifera*, Seibel 2, infectados com o vírus do enrolamento da folha da videira (VEFV), e calos de fumo *Nicotiana tabacum* "TNN" e *Gomphrena globosa* L. infectados com o vírus do anel do pimentão (VAP). No segundo, foi utilizado um modelo aplicado, visando a obtenção de plantas de limoeiro Galego *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing) livres do vírus da tristeza dos citros "citrus tristeza virus" (CTV). Os objetivos específicos foram: 1) Testar o efeito do Virazole em calos cultivados *in vitro*, comparando: a) diferentes tipos de vírus (closterovirus e tobnavirus) e b) efeito do Virazole sobre um mesmo vírus em duas espécies de plantas hospedeiras. 2) Avaliar a possibilidade do uso de Virazole para obtenção de plantas cítricas livres do CTV por mini-enxertia realizada *in vitro*.

Os resultados mostraram que o Virazole inibiu a multiplicação dos 3 vírus em estudo (VEFV, VAP e CTV), pertencentes a dois grupos distintos: closterovirus (VEFV e CTV) e tobnavirus (VAP).

A utilização de calos infectados com vírus e tratados com Virazole *in vitro*, mostrou ser um modelo de estudo eficiente para avaliar o efeito desse composto quimioterápico sobre vírus de planta. A indexação serológica das amostras coletadas a cada subcultura dos calos permitiu acompanhar a evolução do conteúdo de vírus no decorrer de várias subculturas sucessivas. Os resultados mostraram de modo geral, que a quantidade de vírus presente varia muito pouco nas culturas de calos mantidas em ausência de Virazole. As concentrações mais baixas utilizadas não inibiram a multiplicação dos vírus, ao passo que concentrações mais altas do produto provocaram uma diminuição progressiva da concentração de vírus a cada subcultura até que as partículas virais não foram mais detectadas nos testes serológicos. O desenvolvimento da cultura foi afetado por concentrações altas de Virazole, sendo que algumas concentrações foram fitotóxicas, dependendo da planta e do tecido tratado.

Em calos de videira infectados com VEFV o Virazole inibiu de maneira significativa a replicação do vírus. A inibição foi proporcional à concentração do produto

utilizada. À 50 ppm não foram detectadas partículas virais nos testes serológicos. O Virazole atuou rapidamente em diminuir a concentração do VEFV à um nível baixo em calos em proliferação, porém, um longo período de incubação foi necessário para obter completa supressão dos vírus. Esses resultados são consistentes com a possibilidade de que a atividade antiviral do Virazole se manifesta por sua ação na síntese de novas partículas mais do que uma inativação direta dos vírus existentes.

O Virazole foi capaz de inibir a multiplicação do VAP em calos de fumo, mas não em calos de *G. globosa*. Em fumo a concentração de 200 ppm eliminou os vírus presentes nos calos, enquanto que em calos de *G. globosa* o Virazole não foi efetivo em nenhuma das concentrações testadas. Possivelmente essas plantas apresentam vias metabólicas alternativas para a replicação do RNA viral (e não aquela inibida pelo Virazole).

A eficiência do Virazole em eliminar o VAP foi também dependente do estágio de desenvolvimento dos tecidos tratados. O Virazole inibiu a multiplicação de vírus quando pedaços de folhas foram utilizados como explantes, porém, ocorreu pouca ou nenhuma inibição quando células de calos não organizados foram tratadas com Virazole.

O Virazole inibiu a multiplicação do CTV à concentração de 200 ppm. Essa inibição foi verificada pela ausência de sintomas específicos do vírus da tristeza nas plantas obtidas. As plantas cresceram tão bem quanto as plantas saudáveis. O Virazole não foi efetivo à 100 ppm. Nessa concentração o vírus provocou paralisação do crescimento das plantas e as folhas apresentaram sintomas de palidez das nervuras, específicos da doença. Esses resultados foram confirmados por ELISA e "Western-blot".

Com bases nesses resultados, conclui-se que o Virazole é um quimioterápico eficiente para a obtenção de plantas livres de vírus, dependendo da espécie vegetal, do vírus envolvido e das condições de tratamento.

1. INTRODUÇÃO

As doenças causadas por vírus e viróides podem ser um fator limitante para culturas economicamente importantes. Nas culturas anuais, ou cujo ciclo produtivo dura alguns anos, os problemas causados por vírus são geralmente minimizados pela utilização de formas de resistência genética, que é incorporada nas novas variedades. Neste caso os vírus espalham-se principalmente através do inseto vetor, já que as plantas obtidas de sementes verdadeiras são geralmente livres de vírus. Já no caso de culturas perenes, onde a multiplicação vegetativa das plantas é largamente utilizada, a principal via de infecção por vírus é através da perpetuação em materiais propagados vegetativamente. Um dos meios de evitar os danos causados por vírus, que não possuem vetor eficiente é o controle preventivo, isto é, a utilização de material propagativo sadio. No caso do vírus da tristeza dos citros "citrus tristeza virus" (CTV), que possui vetor eficiente, é importante se dispor de material livre do vírus para testar outras possíveis soluções, como a proteção cruzada.

Os principais métodos utilizados para a eliminação de vírus são a termoterapia, a quimioterapia e a cultura de tecidos, que têm sido usados tanto sozinhos ou em combinação. Tradicionalmente esses métodos têm sido aplicados em plantas envasadas. Tendências atuais consistem em aplicar procedimentos terapêuticos para material vegetal mantido *in vitro* (SPIEGEL *et al.*, 1993).

Entre as principais técnicas disponíveis para a erradicação de vírus em plantas, a quimioterapia é a mais nova e a menos utilizada, em grande parte pela dificuldade de se encontrar compostos com amplo espectro de ação, capacidade de inibir completamente a replicação viral e possuir índice quimioterápico elevado.

Os estudos sobre quimioterapia antifitoviral foram iniciados na década de cinquenta (MATHEUS & SMITH, 1955), mas somente a partir de 1970 tomaram um novo impulso com a descoberta de enzimas codificadas pelos vírus, que diferem em muitos aspectos de enzimas análogas presentes em células não infectadas (VICENTE & DE FAZIO, 1982, 1987; SCHUSTER, 1984). Tendo como alvo o bloqueio dessas enzimas codificadas por vírus, novos agentes antivirais têm sido sintetizados nos últimos anos (BILLIAU & DE CLERQ, 1981).

Uma variedade de compostos naturais e sintéticos, muitos dos quais são de interesse em virologia animal e vegetal, têm sido testados quanto ao seu potencial para eliminar vírus, tanto de RNA como de DNA, em plantas.

Os compostos mais estudados têm sido os antimetabólitos, substâncias capazes de bloquear a síntese do ácido nucléico viral. Entre eles estão os análogos das bases purínicas (8-azaguanina, ribavirin, tiazofulin e selenazofulin) e os análogos das bases pirimidínicas (2 -

tiouracil, 5 - azadihidroxiuracil, 2,4 - dioxohexahidro - 1,3,5 - triazina = DHT). Além desses compostos foram testados fungicidas sistêmicos, herbicidas e reguladores de crescimento, que têm mostrado uma certa atividade antiviral. (VICENTE & DE FAZIO, 1987). As pesquisas têm sido concentradas no Ribavirin (Virazole), DHT e, recentemente, em um derivado do DHT, diacetyldihydro - 5 - azauracil-DHT (DA - DHT) (SCHUSTER, 1988).

Os compostos químicos podem ser pulverizados ou injetados em plantas infectadas, ou mesmo incorporados em meio nutritivo nos quais as plantas crescem *in vitro*. (HANSEN, 1989; SCHUSTER, 1988).

Vírus de diferentes grupos e em diferentes hospedeiras têm sido eliminados com sucesso em brotos jovens tratados com Virazole, DHT e DA - DHT.

O presente trabalho teve como objetivo geral testar o efeito terapêutico do Virazole aplicado em materiais cultivados *in vitro*, técnica que permite um controle eficiente da dosagem do composto aplicado nos tecidos. Para isto foram realizados dois modelos de estudo. No primeiro utilizou-se calos de videira *Vitis vinifera*, Seibel 2, infectados com o vírus do enrolamento da folha (VEFV), e calos de fumo *Nicotiana tabacum*, "TNN" e *Gomphrena globosa* L. infectados com vírus do anel do pimentão (VAP). No segundo foi utilizado um modelo aplicado, visando a obtenção de plantas de limoeiro Galego (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing.) livres do vírus da tristeza dos citros (CTV).

Os objetivos específicos foram:

1. Testar o efeito do Virazole em calos cultivados *in vitro*, comparando:
 - a) diferentes tipos de vírus: closterovirus e tobnavirus.
 - b) efeito do Virazole sobre um mesmo vírus em duas espécies de plantas hospedeiras.
2. Avaliar a possibilidade de uso do Virazole para obtenção de plantas cítricas livres do CTV por mini-enxertia realizada *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA.

2.1. Virazole.

Virazole é o nome comercial do ribavirin ou 1- β -D-ribofuranosil-1,2,4,-triazol-3-carboxamida, o qual constitui o primeiro agente antiviral de síntese, não indutor de interferon, que apresenta um amplo espectro de ação (WITKOWSKI *et al.*, 1972). É um pó branco cristalino, muito solúvel em água, que em representação bidimensional aparece como análogo de base pirimidínica. Todavia, a análise precisa de sua estrutura por difração aos raios X mostrou que, com respeito a geometria de sua função carboxamida, a estereoquímica do ribavirin é muito próxima daquela da guanosina (base purínica constituinte dos ácidos nucleicos, RNA e DNA) (PRUSINER & SUNDARALINGAM, 1973) (Fig. 1).

Existe, além disso, evidências biológicas (reversão do efeito do ribavirin pela guanosina, xantosina e, em uma menor medida, inosina) indicando que o ribavirin simula a guanosina e que seu modo de ação deve ser em relação ao metabolismo de nucleotídeos derivados da guanosina (STREETER *et al.*, 1973).

O Virazole é uma substância antiviral que apresenta um amplo espectro de ação. A substância inalterada, e seus metabólitos inibem um certo número de processos bioquímicos, conduzindo ao bloqueio da síntese e da translocação de partículas virais. Trata-se de um processo virostático, não viricida, com respeito ao qual, os vírus não deveriam desenvolver resistência rapidamente (SMITH, 1980), ou seja, o Virazole atua sobre a síntese de novas partículas virais e não sobre os vírus já existentes.

O Virazole é um agente ativo contra numerosos vírus, tanto de RNA como de DNA do homem e de animais (SIDWELL *et al.*, 1972). É interessante notar que certos vírus, tal como o vírus da poliomielite (e de outros picornavírus), não são afetados pela presença do Virazole (SIDWELL *et al.*, 1972).

O fato do Virazole não ser igualmente eficaz com relação a todos os vírus, sugere que sua ação antiviral se refira a um acontecimento específico do metabolismo viral ou da relação existente entre a célula hospedeira e o vírus. O Virazole apresenta, além disso, efeitos citostáticos e mesmo citotóxicos em concentrações que dependem da origem e do tipo de células empregadas.

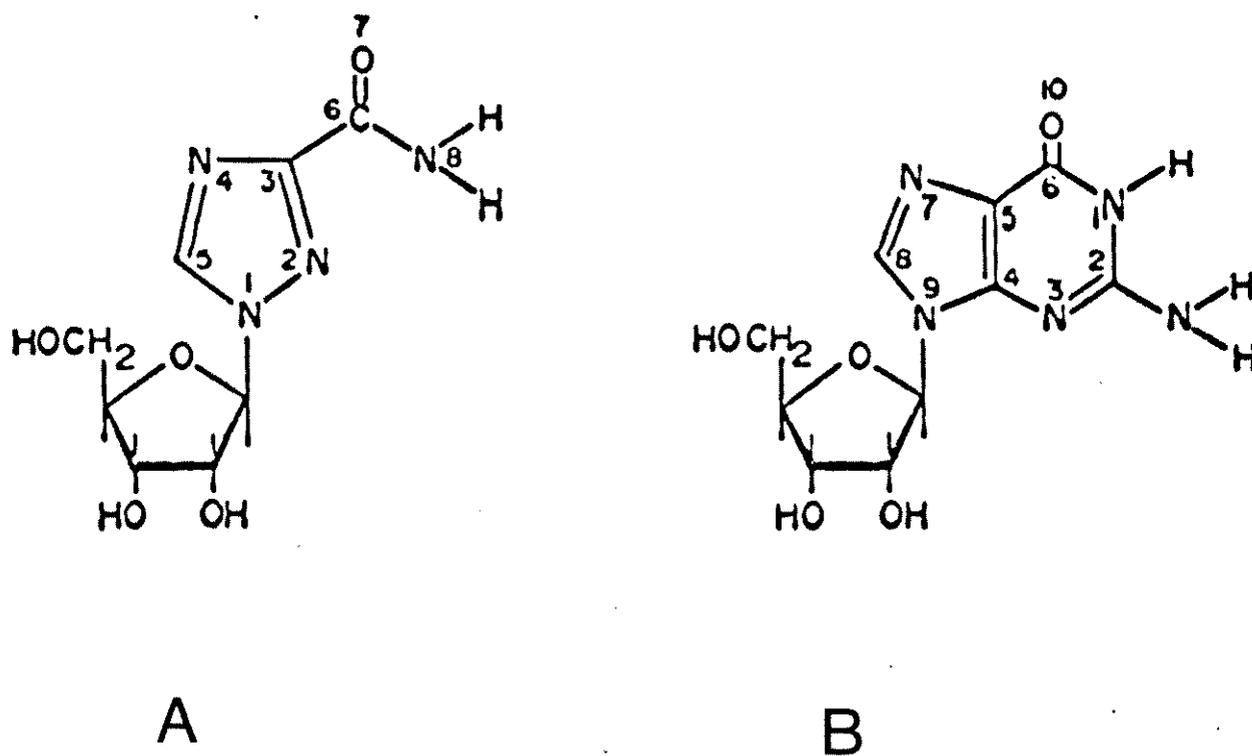


Fig. 1. Similaridade estrutural entre Virazole (A) e Guanosina (B).

2.1.1. Metabolismo do Virazole.

Os primeiros estudos do metabolismo do Virazole em mamíferos mostraram que o grupo carboxamida era facilmente hidrolisado em ácido livre. Depois, foi estabelecido que esta hidrólise podia se produzir, seja antes, seja após o desligamento da ribose (MILLER *et al.*, 1977). Entre estes metabólitos não fosforilados, somente o ribavirin e sua base não ribosilada (1,2,4-triazol-3-carboxamida) apresentam uma atividade antiviral nas células animais; o ácido carboxílico livre não é ativo como um antiviral.

Estudos do "pool" interno de ribavirin na célula viva mostraram que uma proporção importante do produto é fosforilada rapidamente *in vitro* em sua forma trifosfato. A proporção entre tri, di e monofosfato é de 25:5:1. Dessa maneira é esperado que o ribavirin intracelular se encontre principalmente sob a forma trifosfato (ZIMMERMANN & DEEPROSE, 1978).

2.1.2. Modo de ação de Virazole.

O Virazole monofosfato é um inibidor competitivo potencial da inosina monofosfato desidrogenase (IMP - desidrogenase), (STREETER *et al.*, 1973), e como esta enzima está envolvida nas últimas etapas da síntese da guanosina monofosfato, pode-se esperar disso que o Virazole monofosfato exerça um maior efeito sobre o "pool" de nucleotídeos derivados da guanosina. A inibição de IMP- desidrogenase está efetivamente demonstrada em culturas de células animais.

Embora a atividade do Virazole monofosfato sobre a IMP- desidrogenase e sobre o "pool" de nucleotídeos derivados da guanosina possa explicar sua atividade antiviral, é mais provável que esta última esteja ligada a um mecanismo mais específico. De fato, se o único efeito sobre a IMP- desidrogenase for responsável pela atividade antiviral do ribavirin, o efeito citotóxico seria igual ao efeito antiviral (salvo se vias metabólicas alternativas existissem para a síntese da guanosina trifosfato celular e não para aquela utilizada pelo vírus). Não se poderia então, explicar a falta de atividade do ribavirin sobre certos vírus (picornavirus), assim como a ausência de ação antiviral de outros derivados triazólicos, os quais inibem a IMP- desidrogenase (KUMMERT & TOUSSAINT, 1984).

Considerando que o Virazole é um análogo de nucleosídeos, pode-se supor que ele poderia ser incorporado na estrutura fosfodiéster primária do DNA ou do RNA. Estudos exaustivos mostraram, todavia, que o Virazole não é incorporado de maneira significativa no DNA, e somente mais fracamente, em uma fração co-purificada com RNA celular, mas que

consiste, em um material de baixíssimo peso molecular, separável dos RNA celulares por eletroforese. Como o Virazole intracelular se encontra principalmente sob a forma de ribavirin trifosfato (RTP), é razoável supor que é sob esta forma que ele exerce sua atividade de antiviral. (ZIMMERMANN & DEEPROSE, 1978).

Os primeiros trabalhos acerca da atividade antiviral do Virazole mostraram que a RNA polimerase do vírus de Influenza A é inibida pelo RTP e que se trata de uma inibição competitiva da guanosina trifosfato e adenina trifosfato (ERIKSSON *et al.*, 1977); o mesmo RTP é inativo, com respeito a outras RNA-polimerases de vírus animais ou bacterianos (SMITH *et al.*, 1980).

Os RNA mensageiros de um grande número de vírus, assim como aqueles de células de organismos eucariontes, são processados depois da síntese pela elaboração de uma estrutura "cap", consistindo em uma guanosina metilada em C7, ligada por seu grupamento 5 hidroxila ao grupamento 5 hidroxila do penúltimo nucleotídeo, por uma ponte trifosfato. Ensaios efetuados com o vírus da vacina mostraram que o RTP apresenta um poderoso efeito inibidor sobre a reação de guanilação da extremidade 5' hidroxila do RNA mensageiro viral sintetizado *in vitro* (GOSWAMI *et al.*, 1979). Resultados preliminares indicam que para o RNA mensageiro do vírus da vacina, o Virazole é incorporado no "cap" em substituição à guanosina monofosfato terminal impedindo a sua multiplicação. Essa inibição da multiplicação resulta-se de uma diminuição da eficácia do RNA mensageiro em sistema de tradução de proteínas. Por outro lado, o RNA do vírus da encefalite do cavalo, que não possui o "cap", multiplica-se em células tratadas pelo ribavirin.

O exame de efeitos bioquímicos de ribavirin mostra claramente que esta substância interfere em numerosas vias metabólicas do vírus e da célula. Seus modos de ação são, aparentemente, múltiplos, geralmente alterando o "pool" dos nucleotídeos e inibindo a formação pós-transcricional do "cap" de RNA mensageiros (SMITH, 1980).

2.1.2.1. Virazole em plantas.

Os eventos bioquímicos que levam à erradicação de vírus de plantas por compostos químicos não são bem compreendidos. Pouco se conhece sobre o mecanismo de ação do Virazole na inibição da multiplicação de vírus em plantas. A maioria das pesquisas realizadas até o momento, têm sido feitas em condições de laboratório, com hospedeiras experimentais.

Segundo KLUGE & MARCINKA (1979), o mecanismo de ação do Virazole em plantas parece ser similar ao descrito para viroses animais, envolvendo a inibição da enzima

IMP-desidrogenase e conseqüentemente reduzindo o suprimento de nucleotídeos, bloqueando a multiplicação do vírus (STREETER *et al.*, 1973). O Virazole pode ser ativo na sua forma trifosfato, que inibe o "capping" do RNA viral (DAWSON & LOZOYA -SALDANA, 1984). Por isso a droga é de ação seletiva não mostrando efeito inibidor sobre o "tobacco necrosis virus" (TNV), que não possui a estrutura 5' "cap" (LEARCH, 1987).

Recentemente, foi concluído que o Virazole e DHT inibem a replicação do vírus X da batata "potato virus X" (PVX) num estágio inicial, pela diminuição da síntese de RNA-polimerase RNA-dependente e num estágio posterior pela diminuição da síntese de capa proteica (SCHUSTER & HUBER, 1991).

LEARCH (1977) testou a eficiência do Virazole em plantas de fumo infectadas com PVX, em tratamento com solução hidropônica. Os resultados mostraram uma redução no conteúdo de vírus nas folhas inoculadas de plantas tratadas com Virazole no 5º e 8º dia após a inoculação. Essas plantas apresentaram-se mais vigorosas do que os controles não tratados. Houve também um decréscimo na quantidade de partículas virais com o aumento da distância do sítio de inoculação. Nas folhas mais altas não foi detectado nenhuma partícula. As plantas aparentemente cresceram sem vírus. Segundo o autor, o primeiro efeito representa uma inibição da multiplicação dos vírus, sem interferência no processo de translocação. A diminuição do conteúdo de vírus nas folhas mais altas pode ser devido a um atraso na translocação dos vírus, concomitante com sua biossíntese inibida. Alternativamente, o Virazole ou seu metabólito poderia se acumular nas folhas mais jovens resultando em uma inibição mais forte.

CASSELLS & LONG (1980) obtiveram regeneração de plantas de fumo livres do vírus Y da batata "potato virus Y" (PVY) e vírus do mosaico do pepino "cucumber mosaic virus" (CMV), *in vitro*, a partir de brotos adventícios tratados com Virazole. SHEPARD (1977) obteve regeneração de plantas de fumo livres de PVX a partir de protoplastos de folhas infectadas e tratadas com Virazole, *in vitro*. O produto adicionado ao meio de cultura não erradicou efetivamente os vírus de calos em proliferação, obtidos a partir de protoplastos. Entretanto, quando os calos foram tratados com Virazole em meio de cultura que induz brotação resultou na ausência de infecção das plantas regeneradas. Os autores sugeriram um efeito do Virazole na restrição do movimento dos vírus para tecidos jovens em desenvolvimento.

SIMPKINS *et al* (1981) testaram a eficiência do Virazole sobre o CMV em tecidos cultivados *in vitro*. Os resultados mostraram uma rápida diminuição no conteúdo de vírus nos tecidos, porém, um longo período de incubação com o produto foi necessário para obter completa supressão dos vírus. Foi sugerido que o Virazole inibiu a síntese de novas partículas e que períodos mais longos foram necessários para a degradação das partículas já existentes.

O Virazole quando aplicado imediatamente após a inoculação provou ser eficiente no controle da infecção sistêmica causada pelo vírus do vira cabeça do tomateiro ("tomato spotted wilt virus" TSWV- Tospovirus), em plantas de fumo e tomate (DE FAZIO *et al.*, 1980). A concentração que se mostrou mais eficiente para controlar ou atrasar a infecção sistêmica causada pelo TSWV foi de 250 mg/l, quando aplicada entre 1 ou 4 dias antes da inoculação do vírus. Verificou-se que o Virazole além de inibir a multiplicação viral, atrasou a translocação do vírus no interior das plantas de fumo.

Resultados similares foram obtidos por BITTNER *et al.* (1989), que conseguiram eliminar o vírus S da batata (PVS) de explantes de 5 cultivares de batatas infectadas, após 3 passagens em meio nutritivo contendo Virazole. Os resultados confirmaram que PVS não pode ser eliminado por um único tratamento com Virazole, uma vez que essa substância não elimina o vírus já sintetizado e sim a replicação de novas partículas.

STEVENSON & MONETTE (1983) trabalhando com cultura *in vitro* de *Vitis vinifera* "Liemberger" infectadas com o vírus do enrolamento da folha (VEFV) e tratadas com Virazole, verificaram que a concentração de 100 mg/l adicionada ao meio de cultura atrasou de maneira significativa o aparecimento de sintomas da doença. Enquanto os controles não tratados exibiram sintomas típicos 37-41 dias após os brotos terem sido colocados em meio para enraizamento das culturas *in vitro*, as plantas originadas dos brotos submetidos a tratamento com Virazole exibiram sintomas 75-110 dias após a transferência para o meio de enraizamento.

Desses resultados foi concluído que o efeito de Virazole sobre o VEFV é transitório, ele não elimina os vírus do material original infectado. Se isso for verdadeiro, o efeito virostático da droga pode ter tornado menos pronunciado uma vez que os explantes foram removidos do meio contendo Virazole e o título do vírus pode ter aumentado dentro da planta até que sintomas típicos de enrolamento da folha apareceram.

BELLÉS *et al.* (1986) estudaram o efeito protetor e terapêutico de Virazole contra infecção causada pelo viróide da exocorte dos citros "citrus exocortis viroid" (CEV) em plantas de *Gynura aurantiaca* DC. Foi verificado que aplicações de Virazole em plantas expressando sintomas, começando 25 dias após a inoculação levou a uma redução gradual na severidade de sintomas nas folhas jovens formadas, até o quase desaparecimento dos sintomas nas folhas formadas cerca de 3 semanas após o início do tratamento. Todas as concentrações de Virazole entre 300 e 1.400 mg/l foram igualmente efetivas. Concentrações menores de 300 mg/l não foram efetivas, enquanto que sintoma de fitotoxicidade (enfazamento das plantas e epinastia das folhas) ocorreu com tratamentos à concentrações de 1.600, 1.800 e 2.000 mg/l.

Os autores sugeriram que Virazole exerceu efeito no processo replicativo do viróide, uma vez que a infectividade e patogenicidade das moléculas do viróide não foram afetadas por

exposição direta do produto. Este efeito estaria relacionado com a inibição da síntese de guanosina pelo Virazole. Como CEV é relativamente rico em guanosina é concebível que o Virazole afeta a replicação do viróide mais severamente do que a produção de ácido nucléico do hospedeiro.

A resposta para químicos antivirais em citros foi dependente do antiviral, sua concentração e a espécie usada como hospedeira. GREÑO *et al.* (1990) obtiveram alguns tipos de respostas quando 5 compostos antivirais (citosina - 1-b-D- arabino-furanoside-HCl (Ara-C); 8-azaguanina; 5-fluoro-deoxiuridina (FudR); Virazole e 2-tiouracil) foram usados em meio de cultura para crescimento de explantes a partir de fontes infectadas. Somente alguns dos tratamentos resultaram em plantas livres de vírus. Dos patógenos estudados ("citrus tristeza virus" - CTV, "citrus infectious variegation virus" - CIVV e o viróide da exocorte "citrus exocortis virus" - CEV), o CTV foi o mais sensível aos químicos antivirais testados. Esse efeito foi notável com uma estirpe fraca infectando laranja doce. Os resultados obtidos com estirpe severa foram difíceis de interpretar. Enquanto os resultados de ELISA indicaram que 3 dos químicos testados exerceram algum efeito sobre vírus, o pobre desenvolvimento das culturas e sua deficiência para enraizar assemelharam-se ao desempenho de culturas infectadas. Entretanto, considerando a efetividade de Virazole contra a estirpe fraca infectando lima ácida e laranja doce, e a recuperação real de plantas livres de CTV parece razoável assumir que o efeito observado contra a estirpe severa reflete uma inibição real de CTV, embora mascarada pela resposta da hospedeira que é muito sensível a esta estirpe.

Experimentos realizados para controlar o TSWV em plantas de fumo mostraram que o Virazole além de reduzir substancialmente o conteúdo de vírus, também induziu mudanças na fisiologia das plantas, que poderiam ser atribuídas a uma alteração no nível endógeno de citocininas. (DE FAZIO *et al.*, 1984). Ensaio com plantas de fumo comprovadamente sadias foram realizados a fim de verificar o efeito do Virazole sobre o crescimento e a senescência das plantas, o crescimento do tecido de calo de fumo *in vitro*, o enraizamento secundário e a reversão do efeito do Virazole pelo ácido abscísico (ABA). Os resultados mostraram que o Virazole a 500 mg/l induziu um maior número de gemas laterais, como consequência da quebra de dominância apical, aumentou o conteúdo de clorofila nas folhas, aumentou o crescimento em calos de fumo e inibiu a formação de raízes que pôde ser revertido pelo ABA.

GREÑO *et al.* (1990) verificaram que a adição de Virazole em meio de cultura afetou o desenvolvimento de explantes de citros. Houve um aumento no número de brotações na gema contida nos explantes cultivados na presença de Virazole. Esses explantes produziram brotos maiores que os controles cultivados em meio padrão. O aumento de vigor como um resultado de tratamento com Virazole também tem sido descrito para *Nicotiana tabacum* sob

condições de casa de vegetação (LEARCH, 1977; SCHUSTER, 1979) e culturas *in vitro* de *N. rustica* (SYMPKINS *et al.*, 1981).

2.2. Considerações gerais sobre o vírus do enrolamento da folha da videira (VEFV).

O enrolamento da folha "grapevine leafroll" é uma das principais doenças da videira, afetando-a à nível mundial (GOHEEN, 1988). Ela está amplamente disseminada em todas as áreas vitícolas do mundo, infetando muitas cultivares de copas e porta-enxertos, causando danos econômicos como redução no conteúdo de açúcar dos frutos, diminuição da produção e declínio generalizado das plantas, entre outros.

A primeira indicação de sua possível natureza viral foi relatada já no início do século, por SCHEU (1936), devido a doença ser transmitida por enxertia. Entretanto, diferentes vírus têm sido descritos associados ao enrolamento da folha, dificultando qualquer conclusão sobre seu agente causal. Eles incluem vírus do tipo isométrico (CASTELLANO *et al.*, 1983; GUGERLI *et al.*, 1984), potyvirus (TANNE *et al.*, 1977) e partículas tipo closterovirus (NAMBA *et al.*, 1979; CONTI *et al.*, 1980; GUGERLI *et al.*, 1984; MILNE *et al.*, 1984; ROSCIGLIONE & GUGERLI, 1986; ZEE *et al.*, 1987; ZIMMERMANN *et al.*, 1988; BOSCIA *et al.*, 1990; HU *et al.*, 1990).

Um determinado número desses closterovirus têm sido parcialmente caracterizados quanto a massa molecular da proteína da capa, perfil de RNA (ds RNA) e morfologia da partícula (GUGERLI *et al.*, 1984; BOSCIA *et al.*, 1990; HU *et al.*, 1990). Existem tipos de closterovirus serologicamente distintos e são referidos como I, II, III, IV e V (ROSCIGLIONE *et al.*, 1986; HU *et al.*, 1990; WALTER & ZIMMERMAN 1990; GUGERLI & RAMEL, 1993) (Tab.1).

NAMBA *et al.* (1979) encontraram partículas semelhantes a closterovirus com comprimento de 1.000 nm em cortes finos de tecidos do floema e em preparações "leaf-dip" de videiras infectadas com enrolamento da folha, mas não em plantas saudáveis.

Tab. 1 Propriedades de Closterovirus isolados de videiras infectadas com enrolamento da folha.

ISOLADO	PARTÍCULA nm	PROTEÍNA MM 10 ³	RNA MM 10 ⁶	REFERÊNCIA
GLRaV Japão	1000			NAMBA, et al. 1979
GLRaV I GLRaV II	2200 1800			GUGERLI et al. 1984
GLRaV	1400		ds RNA 8	MOSSOP et al. 1985
NY-1 (GLRaV III)	1800-1900	43	ds RNA 10	ZEE et al. 1987 HU & GONSALVES, 1988
CA-5 (GLRaV II)		36		BOSCIA et al. 1990
GLRaV I GLRaV II GLRaV III		38 36 43		GUGERLI et al. 1990
GLRaV I GLRaV II GLRaV III GLRaV IV GLRaV V	2.250 1.750 1.950 36 1.650	39 26 43 36 36	ds RNA 10- 12	ZIMMERMANN et al. 1990 WALTER and ZIMMERMANN, 1990
GLRaV I GLRaV II GLRaV III GLRaV IV GLRaV V		38.8 26.5 44.3 34.7 35.6		GUGERLI and RAMEL, 1993

GUGERLI *et al.* (1984) purificaram partículas associadas à closterovírus, com 2.200 nm de comprimento, a partir de folhas de videiras infectadas com enrolamento da folha. Posteriormente foi produzido o primeiro antissoro policlonal específico, o que levou ao uso de testes ELISA para diagnósticos de rotina. Dois sorotipos com partículas de 2.200 nm (tipo I) e 1.800 nm (tipo II) foram identificados e fortemente relacionados com sintomas de enrolamento da folha em diversas cultivares de videira. Por outro lado, MOSSOP *et al.* (1985) encontraram partículas semelhantes a closterovírus com 1.400 nm de comprimento a partir de videiras infectadas com enrolamento de folha. A massa molecular de ds-RNA era de aproximadamente 8×10^6 .

ROSCIGLIONE & GUGERLI (1986) utilizaram antissoros para partículas do tipo I e II para análises serológicas de 40 amostras de videiras com enrolamento da folha, provenientes da Itália. Não houve reação com cerca de 50% das amostras, indicando assim, a presença de um terceiro sorotipo (Tipo III), de partículas tipo closterovirus associadas com o enrolamento da folha.

ROSCIGLIONE & GUGERLI (1989) demonstraram que GLRaV III era serologicamente relacionado ou idêntico ao isolado NY-1 de videiras provenientes dos USA, infectadas com enrolamento da folha. ZEE *et al.*, (1987) confirmaram a presença de partículas semelhantes à closterovirus e vesículas características em células de tecido floemático de videiras com enrolamento da folha provenientes da Califórnia e Nova Iorque. As partículas purificadas apresentaram 1.800 e 1.900 nm. Um antissoro para o isolado Nova Iorque (NY-1) foi produzido e reagiu com GLRaV III da Europa (ROSCIGLIONE & GUGERLI, 1986, 1989).

HU & GONSALVES (1988) produziram anticorpos monoclonais específicos para closterovirus NY-1 (GLRaV III). A massa molecular da proteína da capa de NY-1 foi de 43×10^3 . Um RNA específico (ds RNA), com massa molecular de 10×10^6 foi consistentemente extraído de videiras com enrolamento da folha. Segundo os autores este seria provavelmente a forma replicativa do RNA genômico.

BOSCIA *et al.* (1990) produziram um antissoro para o isolado da Califórnia (CA-5) de GLRaV II e determinou que a massa molecular da proteína da capa era de 36×10^3 .

GUGERLI *et al.* (1990) produziram anticorpos monoclonais para GLRaV I e GLRaV III. Usando esses anticorpos determinaram a massa molecular da proteína da capa como sendo de 38×10^3 e 43×10^3 , respectivamente. Em preparações infectadas com GLRaV II foi encontrada uma proteína dominante com massa molecular de 36×10^3 usando antissoro policlonal.

HU *et al.* (1990) testaram sete isolados do enrolamento da folha quanto a suas relações serológicas através de testes de microscopia eletrônica de imuno adsorção (MEIAD).

Os resultados indicaram que havia sorotipos serologicamente distintos e que infecções mistas de videiras com diferentes sorotipos I, II, III e IV foi proposto. Os isolados CA-3 e CA-4 da Califórnia, USA, foram designados sorotipo IV.

ZIMMERMANN *et al.* (1990) isolaram GLRV I, GLRV II, GRL III e GLRV IV, a partir de videiras com enrolamento da folha. Anticorpos policlonais foram produzidos e utilizados para caracterização e diagnóstico. O capsídeo das partículas apresentou uma única espécie de proteína com massa molecular ao redor de 39, 26, 43 e 36 x 10³, respectivamente. Análises serológicas de muitas videiras mostraram uma estreita correlação entre a presença dessas partículas com enrolamento da folha em *Vitis vinifera* Pinot noir.

WALTER & ZIMMERMANN (1990) produziram antissoro policlonal específico para GLRaV I, II, III e IV, os quais foram utilizados em testes ELISA e imuno microscopia eletrônica. Não ocorreu reação cruzada entre as quatro viroses. GLRaV I, GLRaV II e GLRaV III e GLRaV IV reagiram com antissoro tipo I, II, III e CA-4, respectivamente. GLRaV III também reagiu com NY-1. Foram encontradas videiras detectadas positivas em testes de indexação, que continham partículas semelhantes à closterovirus que não reagiram com nenhum desses antissoros. Essas partículas foram chamadas de GLRaV V. Os autores determinaram o comprimento das partículas do tipo I, II, III e V como sendo 2.200 - 2.300 nm; 1.700 - 1.800 nm; 1.800 - 2.100 e 1.400 - 1.700 nm, respectivamente. A massa molecular das proteínas do capsídeo foi estimado em 39 x 10³ para GLRaV I, 26 x 10³ para GLRaV II, 43 x 10³ para GLRaV III e 36 x 10³ para GLRaV V. Foi detectado ds RNA com massa molecular ao redor de 10 a 12 x 10⁶ em videiras infectadas com GLRaV.

GUGERLI & RAMEL (1993) produziram antissoro monoclonal para GLRaV II e verificaram que em testes de microscopia eletrônica de imunoprecipitado (IPEM), ocorreu variável grau de decoração, indicando uma infecção mista. Algumas partículas decoraram enquanto que outras não. O componente que foi reconhecido pelo antissoro monoclonal foi designado GRLaV II b e o componente não identificado de GLRaV II a. Em análises de "Western blot" a proteína do capsídeo de GLRaV II apresentou massa molecular de 26.5 x 10³. Os autores determinaram também a massa molecular da proteína da capa dos sorotipos I, III, IV, V e GVA, como sendo 38.8, 44.3, 34.7, 35.6 e 25.1 x 10³, respectivamente, utilizando anticorpos monoclonais.

Recentemente esforços têm sido desenvolvidos no sentido de elucidar o agente causal da doença. Em relação aos trabalhos mencionados acima, existem evidências suficientes de que partículas tipo closterovirus, com comprimento máximo de 1.800 a 2.200 nm, estão significativamente associadas com o enrolamento da folha em videiras. Entretanto, outros vírus podem interferir na doença, tornando assim a etiologia mais complicada.

2.2.1. Transmissão.

O enrolamento da folha é convencionalmente transmitido por vários métodos de enxertia. (KUNIYUKI, 1978; ZIMMERMANN *et al.*, 1990). Vetores afídeos não são conhecidos na natureza entretanto, os vírus podem ser transmitidos por espécies de cochonilha branca ("mealy bug").

ROSCIGLIONE & GUGERLI (1986), transmitiram GLRaV I e GLRaV II por *Pseudococcus longispinus*, enquanto que ROSCIGLIONE & GUGERLI (1989) conseguiram a transmissão de GLRaV III de videira com enrolamento da folha para videira sadia, pelo mesmo vetor. Em Israel, o isolado NY-1 (GLRaV III) foi transmitido de videira infectada para sadia por *Pseudococcus longispinus*. As plantas inoculadas desenvolveram sintomas característicos 4 meses após a inoculação (TANNE *et al.*, 1989). Tentativas de transmissão do vírus do enrolamento da folha por inoculação mecânica para plantas testes herbáceas e para videiras deram resultados negativos (KUNIYUKI, 1978; BARBA *et al.*, 1989).

WOODHAN & KRAKE (1983) obtiveram sucesso em transmitir o enrolamento da folha de uma videira para outra por cuscuta (*Cuscuta campestris* L.). Os sintomas obtidos foram idênticos aqueles de transmissão por enxertia. Esses autores, entretanto, não conseguiram transmitir a doença de videiras para plantas herbáceas utilizando esse método. O vírus não é transmitido pela semente (BOUBALS, 1969; KUNIYUKI, 1978). A presença do vírus nos vinhedos ocorre através da propagação vegetativa de plantas infetadas de copa, cavalo ou ambos (KUNIYUKI, 1978).

2.2.2. Plantas Hospedeiras e sintomatologia.

O enrolamento da folha pode ocorrer em todas as espécies do gênero *Vitis* causando sintomas diversos de acordo com a cultivar, o isolado do vírus e as condições ambientais.

Os sintomas incluem folhas enroladas para baixo, rugosas e quebradiças, sendo que variedades com frutos escuros apresentam folhas com as áreas internervais avermelhadas, enquanto que variedades com frutos claros desenvolvem clorose internerval. Ocorre diminuição na produtividade e redução do conteúdo de açúcar, devido ao atraso da maturação dos frutos

(GOHEEN, 1970).

Existem variedades de copas que não mostram sintomas evidentes, ou mesmo não o apresentam quando infetadas (CHAMBERLAIN *et al.*, 1970). Em muitas variedades de porta-enxertos a infecção pelo vírus é latente (GOHEEN, 1970).

O enrolamento da folha é diagnosticado através de enxertia em videiras indicadoras sensíveis, uma vez que muitas variedades tradicionais não mostram sintomas em campo. Além disso, sintomas de avermelhamento e amarelecimento, assim como enrolamento das folhas podem ser provocados por outros fatores, dificultando o diagnóstico. (KUNIYUKI, 1978). Atualmente existem muitas variedades de videira que são utilizadas como plantas indicadoras nos testes de indexação, mostrando sintomas típicos dentro de 6-18 meses. Entre elas estão as variedades Cabernet, Cinsaut, Gamay, Mission, Pinot noir e o híbrido LN-33 (GOHEEN *et al.*, 1959, 1970; HEWITT, 1963; BOVEY, 1965, citado por KUNIYUKI (1978). Segundo KUNIYUKI (1978) nenhuma variedade cultivada em São Paulo serve como indicadora, utilizando-se assim, as mesmas variedades usadas no estrangeiro. As variedades Pinot noir e LN-33 foram as melhores indicadoras nas condições do Estado de São Paulo, sendo que a detecção de vírus foi mais segura quando a leitura de sintomas foi feita em folhas maduras dos ramos originados da brotação de primavera seguinte à enxertia (KUNIYUKI, 1978). Atualmente testes ELISA e MEIAD têm sido utilizados para diagnóstico mais rápido da doença.

2.3. Considerações gerais sobre o vírus do anel do pimentão (VAP).

2.3.1. Propriedades gerais.

Uma moléstia de vírus em pimentão (*Capsicum annum* L.), encontrada no município de São Carlos, SP, em 1960, foi denominada anel ou mancha anular do pimentão. De acordo com as propriedades biológicas, bem como dados preliminares sobre a morfologia e serologia do vírus do anel do pimentão (VAP), COSTA *et al.* (dados não publicados) permitiram sua inclusão no grupo "rattle" do fumo (*Nicotiana tabacum* L.).

Durante muitos anos os isolados foram classificados como sorotipo III (estirpe CAM) do grupo do vírus "rattle" do fumo (VRF), porém, foi considerado mais tarde como um vírus separado.

O vírus do anel do pimentão, juntamente com os vírus "rattle" do fumo e "pea early-browning virus" (PEBV) foram, a princípio, agrupados sob o nome de netuvirus (partículas tubulares transmitidas por nematóides), mais tarde, o nome do grupo foi mudado para tobavirus "**Tobacco Rattle Virus**" (HARRISON *et al.*, 1971).

Os vírus pertencentes à esse grupo são caracterizados como tendo um genoma dividido em duas espécies de RNA de fita simples (ss RNA) de polaridade positiva, RNA 1 e RNA 2 contidas respectivamente em partículas longas e curtas com forma de bastonetes rígidos, de dois comprimentos específicos.

As partículas longas por si próprias são infectivas, enquanto que as curtas não são (HARRISON & NIXON, 1959; SILVA, 1965; OLIVEIRA, 1967). As partículas curtas carregam o gene para a capa proteica (GHABRIAL & LISTER, 1973).

Isolados que produzem partículas normais são chamados de tipo M. Outros isolados, tipo N-M, não possuem RNA 2 e não produzem partículas virais. São mantidos em plantas pela replicação de RNA 1. Tais infecções podem se disseminar de célula para célula mas aparentemente não via floema, e causam sintomas que tipicamente são mais severos do que aqueles induzidos pelos isolados tipo M da mesma estirpe do vírus.

A transmissão do vírus do anel do pimentão ocorre através de um vetor natural, o nematóide *Trichodorus christiei* (SALOMÃO, 1969), embora outras espécies de família *Trichodoridae* não foram testadas. COSTA e KITAJIMA (1968), obtiveram até 30% de transmissão do VAP através da semente de tomateiros infectadas. O vírus também ocorre no grão de pólen (CAMARGO *et al.*, 1969; GASPAR, 1980).

2.3.2. Plantas Hospedeiras e Sintomatologia.

O VAP é o único representante do grupo na América do Sul. Ele foi registrado somente no Brasil infectando tomateiros (*Lycopersicon esculentum* Mill.) em Jacutinga, MG e Itapeva, SP. Mais recentemente o VAP foi constatado no Estado do Paraná (LIMA *et al.*, 1983) em plantações comerciais de tomateiros do Distrito Federal (CUPERTINO *et al.*, 1991). As principais doenças causadas pelo vírus são a mancha anular do pimentão (KITAJIMA *et al.*, 1969), faixa amarela no tomateiro (SILBERSCHMIDT, 1963), e faixa amarela na alcachofra (CHAGAS *et al.*, 1972).

O VAP possui uma ampla variedade de hospedeiras, embora nenhum estudo sistêmico tem sido descrito. De acordo com HARRISON & WOODS (1966) e KITAJIMA *et al.* (1969) as principais hospedeiras são:

- *Chenopodium amaranticolor* - causa lesões locais necróticas, algumas tendem a se propagar, se desenvolvem em 3-5 dias; não é sistêmico.
- *Nicotiana clevelandii* - as folhas inoculadas permanecem sem sintomas; as infectadas sistemicamente desenvolvem um discreto "white netting" ou permanecem sem sintomas.
- *Nicotina tabacum* L. cv. Samsun TNN (fumo): as folhas inoculadas permanecem sem sintomas; folhas infectadas sistemicamente desenvolvem um leve mosqueado.
- *Phaseolus vulgaris* L. - desenvolve lesões locais necróticas em 2-4 dias; não sistêmico.
- *Pisum sativum* L. (ervilha) e *Vicia faba* - pequenas lesões necróticas locais; não sistêmico.

2.3.3. Composição da partícula.

2.3.3.1. Ácido nucléico.

O ácido nucléico do VAP que representa 5% da massa da partícula (SILVA, 1965), é RNA de fita simples, linear, composto de duas espécies genômicas, RNA 1 e RNA 2, encapsidadas separadamente em partículas longas (200 nm) e curtas (55 nm) respectivamente, (KITAJIMA 1967, KITAJIMA *et al.*, 1969). O RNA 1 possui massa molecular de $2,5 \times 10^6$ e o RNA 2 de $0,7 \times 10^6$. São constituídos de 25,5% G; 29,5% A; 16,5% C e 28,5% U e de 24,3% G; 26,1% A; 17,6% C e 32,0% U, respectivamente (MINSON & DARBY, 1973).

ABOU HAIDAR & HIRTH (1977) mostraram que a estrutura terminal 5' de 70-75% de moléculas de RNA 2 do VAP era $m^7G^{5'}ppp5'AP$, porém, não encontraram uma estrutura "cap" similar em RNA 1. A tradução de ambas espécies de RNA genômico de VRF é inibida pelo quepe análogo m^7GTP (PELHAM, 1979) sugerindo que ambas possuem "cap".

A sequência de RNA 2 do VAP é conhecida, compreende 1.799 bases. Os primeiros resultados de sequenciamento de RNA 1 mostraram que 460 bases no terminal 3' são idênticos aquelas em RNA 2; não possuem cauda poli A⁺. Esses resultados concordam com os obtidos por MINSON & DARBY (1973), que mostraram que uma sequência ou sequências totalizando cerca de 500 bases nucleotídicas são substancialmente a mesma nas duas espécies de RNA do VAP.

A replicação do RNA 1 em plantas sem o RNA 2, indica que provavelmente contém um cístron para a síntese de uma RNA replicase ou componente da replicase. Essa idéia é suportada pelo fato de que duas variantes do VAP com mutações no RNA 1, que as tornam

sensíveis à temperatura, falharam em sintetizar RNA viral à temperatura não permissiva (ROBINSON, 1974). Em infecções por RNA 1 sozinho, nenhuma partícula proteica é produzida, sugerindo que o gene da capa proteica está em RNA 2.

Ambas espécies de RNA contêm genes que afetam os tipos de sintomas produzidos em plantas infectadas. A morfologia das lesões induzidas por pseudo-recombinantes em *N. tabacum* cv. *Xanthi* - nc era sempre aquela do isolado que doou RNA 1. Entretanto, os tipos de sintomas sistêmicos em *N. clevelandii* infectados com isolados pseudo-recombinantes foram aqueles característicos de isolados do qual RNA 2 foi derivado (ROBINSON, 1977). Em alguns casos, o tipo de sintoma é afetado pelos determinantes em ambas partes do genoma. Em *C. amaranticolor* infectada com VAP (FROST *et al.*, 1967), as lesões que contêm partículas virais (RNA 1 + RNA 2) aparecem menos necróticas do que aquelas que não têm. Assim, RNA 1 carrega um determinante para a produção de lesão nesta hospedeira, enquanto que um determinante em RNA 2 modifica o tipo de lesão.

2.3.3.2. Proteína da capa.

A partícula do VAP é constituída de 95% de proteína (SILVA, 1965). Em gel desnaturante de poli-acrilamida - SDS, proteínas da partícula migram como uma única banda, e as proteínas das partículas longas e curtas são indistinguíveis (COOPER & MAYO, 1972). Estimativa da massa molecular foi de 21 KDa e 22KDa para três estirpes de VRF, 23 KDa para o VAP e 21 KDa para o PEBV. A composição de aminoácidos tem sido determinada para proteínas de algumas estirpes do VRF e do VAP (MIKI & OKADA, 1970). A maioria é compatível com uma massa molecular entre 21 KDa e 23 KDa (MAYO & ROBINSON, 1975).

2.4. Considerações gerais sobre o vírus da Tristeza dos citros (CTV)

A tristeza causada pelo CTV é a doença economicamente mais importante dos citros no mundo (BAR. JOSEPH *et al.*, 1989; MULLER & COSTA, 1993).

O nome tristeza foi empregado para designar uma moléstia de natureza então desconhecida que afetava combinações de laranjas doce (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) enxertadas em laranja azeda (*C. aurantium* L.), observada desde 1937, em pomares de citros do vale do Paraíba, SP, Brasil e inicialmente denominado "a doença dos citros no vale do Paraíba"

(BITANCOURT, 1940, citado por MULLER & COSTA, 1993). Anteriormente, já havia registros de sintomatologia da tristeza em outras partes do mundo. O primeiro foi de uma incompatibilidade em laranja doce enxertada em azeda, observada na África do Sul no início do século. A tristeza recebeu denominações tais como "podredumbre de las raicillas de los citros" na Argentina (ZEMAN, 1930); Citrus quick decline virus (FAWCETT & WALLACE, 1946); Lime die-back virus (HUGHES & LISTER, 1953) e Grapefruit stem pitting virus (OBERHOLZER *et al.*, 1949).

Assim que a doença apareceu, um vírus foi suspeito ser o patógeno (BITANCOURT, 1940), porém, até 1946 a tristeza não tinha sido transmitida experimentalmente por afídeos (MENEHINI, 1946), nem por enxertia (FAWCETT & WALLACE, 1946). Testes comparativos de transmissão sugeriram que os problemas ocorridos em cada país eram todas manifestações da mesma doença (GRANT *et al.*, 1951, citado por BAR-JOSEPH *et al.*, 1989).

2.4.1. Transmissão.

A transmissão do vírus da tristeza, por enxertia, é conhecida há bastante tempo e pode ser feita através de borbulhas, garfos, pedaços de folhas e raízes. O vírus pode ainda ser transmitido por cuscuteira.

Embora a transmissão mecânica fosse considerada quase impossível pela dificuldade de introduzir o vírus no floema (PRICE, 1968), GARNSEY *et al.* (1977), conseguiram efetuarla através de cortes transversais no caule, com lâmina de corte contaminada. Neste tipo de transmissão a concentração viral no inóculo é um fator importante. A eficiência de transmissão é baixa quando o processo de contaminação da lâmina é feito através de corte de uma planta infectada, porém, pode alcançar 100% quando o inóculo é obtido de uma preparação purificada do vírus (GARNSEY *et al.*, 1977; MULLER & GARNSEY, 1984). Esses últimos autores consideram pouco provável a ocorrência de transmissão mecânica acidental por meios de instrumentos de poda, quer pelo pequeno número de cortes geralmente feitos, quer pela baixa concentração de inóculo.

Em condições naturais os principais vetores são diversas espécies de afídeos: *Toxoptera citricidus* Kirk., *T. aurantii* (B. de F.), *Aphis gossypii* (Glov.), *A. citricola*, *A. craccivora* (Koch.), *Myzus persicae* Sulz. e *Dactynotus jaceae* L. O pulgão preto *T. citricidus* Kirk. é praticamente o único vetor eficiente em nossas condições, podendo um único afídeo transmitir o vírus com eficiência da ordem de 17% (BAR. JOSEPH *et al.*, 1980). Segundo esses

autores, a relação vírus-vetor é do tipo não circulativo, de maneira semi-persistente. Os períodos mínimos de aquisição e de inoculação são da ordem de 30 minutos. A eficiência de transmissão é crescente para tempos de aquisição até 24 horas e de inoculação até 6 horas. O afídeo deixa de ser virulífero em menos de 48 horas e a existência de um período de jejum antes da aquisição não afeta eficiência de transmissão.

2.4.2. Plantas hospedeiras e Sintomatologia.

O vírus da tristeza infecta a maioria das espécies, cultivares e híbridos de citros. Outras Rutáceas não cítricas (que não pertencem aos gêneros *Fortunella*, *Poncirus* e *Citrus*) podem também ser hospedeiras dos citros: *Aeglopsis chevalieri* Swing., *Afraegle paniculata* (Schum.) Engl., e *Pamburus missiones* (Wt) Swing. (WALLACE, 1978). As únicas hospedeiras conhecidas que não pertencem à família Rutacea são certas espécies de *Passiflora* (MULLER *et al.*, 1974; ROISTACHER & BAR. JOSEPH, 1987).

A reação de diferentes espécies de citros, híbridos e gêneros afins à infecção por CTV, varia consideravelmente. Algumas plantas tais como *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., alguns híbridos entre *P.trifoliata* e laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) ou *P. trifoliata* e pomelos (*C. paradisi*), assim como *Severinia buxifolia* e *Swinglea glutinosa* são resistentes à CTV (GARNSEY *et al.*, 1987). Ocasionalmente, *P. trifoliata* ou seus híbridos mostraram sintomas de CTV, embora o vírus não foi verificado como agente causal (CALAVAN *et al.*, 1972).

A expressão de sintomas varia, via de regra, com a espécie hospedeira e a severidade do isolado da tristeza. Em geral, as tangerinas têm alta tolerância à tristeza. Laranjas doces e o limão Cravo (*C. limonia* Osb.) de uma maneira geral não são afetadas pelos vírus, mas podem sofrer danos quando infectadas com isolados fortes. O vírus afeta tipos de citros com tecidos intolerantes como as limas ácidas, pomelos, algumas laranjas-doces mais sensíveis como a Pera, outros de menor importância econômica, e também outros gêneros de Rutaceas (MULLER & COSTA, 1993).

Os sintomas de tristeza na sua concepção clássica, isto é, aquele observado em combinações de citros suscetíveis ao vírus tendo como porta-enxerto a laranja azeda, são caracterizados por folhas ligeiramente bronzeadas, aspecto coriáceo, quebradiças, em alguns casos, amarelecimento da nervura principal, ou amarelecimento total das folhas velhas, declínio rápido da planta, seca gradativa dos galhos a partir extremidades, necrose dos tubos crivados da laranja azeda, podridão das radículas e morte da planta, em muitos casos.

Árvores afetadas podem apresentar caneluras invertidas na face interna da casca do cavalo de azeda. Um espessamento da casca pode ser observado nessa região. Algumas vezes as plantas declinam rapidamente, outras vezes, ficam enfezadas e cloróticas, não perecendo.

Plantas afetadas apresentam redução e, nos casos mais graves paralisação do crescimento. Algumas vezes encontram-se plantas de aspecto normal com um ou mais galhos afetados, outras vezes observam-se galhos que se destacam pelo seu vigor do resto da copa afetada.

Nas folhas de limas ácidas, do *Aeglopsis chevalieri* Swing., *Afraegle paniculata* (Schumm.) Enlg., *Pamburus messiones* (Wt.) Swing., *Citrus combava* Raf., *C. histrix* D.C. e possivelmente outrass Rutaceas, observam-se sintomas considerados como característicos para a presença da tristeza, apresentando palidez das nervuras que se mostram translúcidas quando observadas contra luz (WALLACE, 1968). Esses sintomas ocorrem principalmente em folhas jovens e podem desaparecer quando elas amadurecem. As folhas apresentam-se com tamanho reduzido, acanoadas, com extremidade distal voltada para cima. Algumas vezes ocorre amarelecimento total da folhagem.

Árvores afetadas apresentam redução na produtividade. Os frutos são pequenos, de coloração verde pálida, vulgarmente denominados "coquinho". Tais frutos apresentam baixo teor de suco e acidez elevada.

Quando a casca dessas árvores são retiradas, observam-se sintomas denominados caneluras "stem-pitting", que são depressões rasas e alongadas que ocorrem no lenho. As caneluras podem ser encontradas no tronco como também nos galhos mais finos.

2.4.3. Caracterização e Serologia do CTV.

O CTV é um vírus limitado ao floema, possui partículas alongadas, flexuosas, de simetria helicoidal, com dimensões aproximadas de 2.000 nm x 11 nm (KITAJIMA *et al.*, 1963; BAR. JOSEPH *et al.*, 1979). KITAJIMA *et al.*, (1963) demonstraram a associação entre manifestações patológicas e a presença de partículas virais filamentosas "thread like particles". A partir daí, muitos trabalhos foram feitos visando purificar essas partículas (PRICE, 1966; SILVA *et al.*, 1965).

BAR. JOSEPH *et al.*, (1970) conseguiram a caracterização parcial do CTV. Foi criado o grupo dos closterivírus, englobando o CTV e outros vírus filamentosos de diversos tamanhos e hospedeiras muito distintas (BAR. JOSEPH & HULL, 1974). Desde então, muitas modificações no processo tornaram possível uma purificação mais rápida e a preservação de

partículas inteiras (BAR. JOSEPH *et al.*, 1985; GONSALVES *et al.*, 1978; LEE *et al.*, 1987; TSUCHIZAKI *et al.*, 1978).

Os primeiros antissoros para o CTV foram obtidos por OLIVEIRA, 1964; SILVA *et al.*, 1965. OLIVEIRA *et al.*, (1969) obtiveram um título 1:1024 para antissoros, utilizando como antígeno preparações parcialmente purificados do vírus, em testes de micro-precipitina e de tubo.

A obtenção de antissoros suficientemente específicos para o CTV é relativamente recente e relaciona-se com a melhoria das técnicas de purificação conseguida no final dos anos setenta. Consequentemente, diversas técnicas serológicas foram desenvolvidas para o estudo do CTV. Dessas incluem imunodifusão SDS (GARNSEY *et al.*, 1979); Enzyme - linked immunosorbant assay - ELISA (BAR. JOSEPH *et al.*, 1979); Radioimunoensaio RIA (LEE *et al.*, 1981), Microscopia eletrônica de imuno-adsorção- MEIAD (GARNSEY *et al.*, 1980); Imunofluorescência (TSUCHIZAKI *et al.*, 1978) e Western-blot (ZEINEH *et al.*, 1986).

Os anticorpos mono e policlonais até agora obtidos têm reagido com a maioria dos isolados com que foram testados, incluindo muitos de origem geográfica bastante distintas (BAR. JOSEPH *et al.*, 1979, 1980; CAMBRA *et al.*, 1979; GARNSEY *et al.*, 1979; VELA *et al.*, 1986). Assim, como foi sugerido para alguns isolados parece confirmar-se que a maioria dos isolados apresentam determinantes antigênicos comuns (TSUCHIZAKI *et al.*, 1978).

2.4.4. Propriedades da partícula do CTV.

2.4.4.1. Proteína da Capa.

Tem sido feitas diversas estimativas da massa molecular da proteína da capa, por eletroforese em gel de poliacrilamida, após degradação dos vírus em SDS, apontando para valores próximos de 25×10^3 (BAR. JOSEPH *et al.*, 1972; GONSALVES *et al.*, 1978; NAGEL *et al.*, 1982). Estas estimativas foram obtidas por diferentes estirpes do CTV.

Posteriormente, proteínas do capsídeo de cinco estirpes do CTV, da Flórida, foram parcialmente caracterizadas e apresentaram duas bandas (LEE & CALVERT, 1987; LEE *et al.*, 1988). Uma proteína maior (CP1), apresentou massa molecular de 23×10^3 e outra menor (CP2), presente em menor quantidade, com massa molecular de 21×10^3 . A razão de CP1: CP2 em vírus purificado foi de 5:1. Ambas CP1 e CP2 originaram reações serológicas positivas. Mapas polipeptídicos de CP1 e CP2, após digestão com várias enzimas proteolíticas

e eletroforese em SDS-PAGE, foram similares, sugerindo que CP2 seja provavelmente um produto de degradação de CP1. Anteriormente já havia sido detectada, além da proteína de 25×10^3 , outra de menor massa molecular, interpretada como um produto de degradação da primeira (GONSALVES *et al.*, 1978).

Recente caracterização de proteínas da capa de estirpes do CTV que ocorrem na Espanha e Israel indicaram que alguns isolados apresentaram CP1 com massa molecular de 28×10^3 e CP2 com 26×10^3 (GUERRI *et al.*, 1990).

2.4.4.2. Ácido Nuclêico.

O vírus da tristeza contem exclusivamente RNA, com massa molecular entre $6,3$ a $6,9 \times 10^6$ (BAR. JOSEPH *et al.*, 1976). A eletroforese em RNA de agarose permitiu concluir tratar-se de um genoma não dividido, de fita simples e confirmar aquela ordem de grandeza para massa molecular (DODDS & BAR. JOSEPH, 1983; GUMPH *et al.*, 1981). Essa massa molecular corresponde a cerca de 21.000 nucleotídeos (ROSNER & BAR. JOSEPH, 1984). Outra estimativa aponta para massa molecular entre $5,4$ e $6,5 \times 10^6$ (BAR. JOSEPH *et al.*, 1985). Um genoma dessa ordem de grandeza é o maior genoma de RNA de cadeia simples não dividida, conhecido em virologia vegetal (DODDS & BAR. JOSEPH, 1983; DODDS *et al.*, 1984). O RNA é "positive sense", ou seja, é funcional como RNA mensageiro (LEE *et al.*, 1988). Não possui cauda poli-A na extremidade 3' (BAR. JOSEPH *et al.*, 1989).

Outros closterovírus já caracterizados apresentam cerca de 4 nucleotídeos por cada unidade proteica do capsídeo (BAR. JOSEPH *et al.*, 1980). Considerando a estimativa de um genoma de 21.000 nucleotídeos (ROSNER & BAR. JOSEPH, 1984), obtem-se também para o CTV um valor próximo de 4 nucleotídeos por unidade proteica.

ROSNER *et al.* (1983) prepararam vários clones de DNA complementares de diversas regiões do genoma do CTV, por transcrição reversa seguida de recombinação genética num plasmídeo de *E.coli*. De alguns desses clones foram obtidas sondas radioativas, que foram utilizadas para hibridização com RNA viral, por "Northern blot". Várias dessas sondas, além de hibridizarem com o RNA genômico, reagiram também com diversas bandas, discretas, de RNA de menor peso molecular. Os autores sugeriram que essas bandas poderiam corresponder a RNA sub-genômico encapsidado em vírus de tamanho normal, embora não se pudesse excluir a possibilidade de fragmentação específica dos vírus em determinados locais, tal como acontece com outro closterovírus (BAR. JOSEPH & HULL, 1974).

DODDS & BAR. JOSEPH (1983) através de fracionamento por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), do RNA de dupla fita (ds- RNA) obtido de tecidos infectados, detectaram uma banda de ds-RNA com massa molecular de $13,3 \times 10^6$ duas vezes o tamanho do RNA genômico, interpretada como a forma replicativa do genoma, e outras diversas bandas de ds-RNA com menor massa molecular. Segundo os autores essas bandas poderiam representar suportes de transcrição de RNA sub-genômico. Essa hipótese foi reforçada pelo fato de, através de "Northern - blot", após denaturação, ter sido verificado que existia homologia e semelhança de massas moleculares entre algumas dessas bandas e algumas das bandas de RNA viral detectadas por ROSNER *et al.* (1983).

DODDS *et al.* (1987) verificaram que a intensidade de bandas em laranja doce, é variável no tempo, começando a decrescer cerca de um mês antes do título antigênico determinado por ELISA, sugerindo que o ds- RNA não é um produto final da replicação viral, e que é principalmente produzido antes do acúmulo dos vírus.

2.4.5. Caracterização das estirpes do CTV.

Não existe uniformidade quanto aos hospedeiros que são usados na caracterização biológica dos isolados. Geralmente o limão Galego é o mais utilizado, porém, possui pequeno poder discriminatório. Em pequenos casos são utilizados a laranja azeda para caracterização quanto à sintomatologia SY e a laranja doce sobre a azeda para tristeza.

BALAMARAN & RAMAKRISHNAN (1980), propuseram a normalização da caracterização biológica através de um conjunto de hospedeiras que consideram diferenciais, tais como *Citrus reshni*, *C. wilsonii*, *C. shunkokan*, *C. aurantifolia*, *C. sinensis* Barão e Rubi, *C. canaliculata*, *C. paradisi* Marsh e *C. grandis*.

Esforços têm sido feitos no sentido de determinar outras características detectáveis nos vírus ou nos tecidos infectados que possibilitem distinguir entre estirpes e relacionar tais características com a sintomatologia. Atualmente a serologia ainda não pôde ser aplicada com esse objetivo uma vez que não tem sido possível distinguir entre isolados com base nas reações serológicas. Os estudos iniciais de hibridização molecular com sondas de DNA não têm mostrado grande poder de resolução (ROSNER *et al.*, 1986).

Atualmente novas técnicas vêm sendo aplicadas para a identificação de estirpes do CTV. Entre elas, as que parecem mais promissoras são o mapeamento peptídico da capa proteica do vírus e a análise do padrão de bandas de ds-RNA extraído de tecidos infectados e fracionados por PAGE (DODDS *et al.*, 1984).

Em análise de mapeamento de peptídeos são observadas diferenças na sensibilidade de proteínas da capa à digestão enzimática e o número e tamanho dos peptídeos gerados. Reação com anticorpos monoclonais algumas vezes permite diferenciar peptídeos com mobilidade eletroforética similares. Por esse procedimento é possível distinguir isolados de CTV que diferem por suas propriedades biológicas e/ou perfil ds-RNA, assim como alguns isolados com características biológicas similares e o mesmo perfil ds-RNA.

O método de detecção de ds-RNA baseia-se no fato de que as plantas não infectadas com vírus de RNA não apresentam quantidades apreciáveis de RNA de fita dupla (DODDS *et al.*, 1984).

O diagnóstico do CTV consiste na detecção de três segmentos de ds-RNAs subgenômicos com massa molecular de 13; 1,9 e 0,9 x 10⁶, presentes em todas as estirpes analisadas, que parecem ser características do vírus (DODDS *et al.*, 1987). Foram detectados também outros dois ds-RNAs subgenômicos de 1,7 x 10⁶ e 0,5 x 10⁶ associados com estirpes do CTV que causam "seedlings yellows" e "stem pitting", respectivamente.

Algumas vantagens desse método é que ele não depende de prévia obtenção de soros ou ácido nucléico, é rápido (48 horas) e possibilita que no mesmo ensaio se detectem todos os vírus presentes, mesmo sem capsídeo, desde que seja previamente conhecido o padrão de bandas de ds-RNA que originam (DODDS *et al.*, 1984).

3. MATERIAL E MÉTODOS.

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de cultura de tecidos da Seção de Virologia Fitotécnica do Instituto Agrônomo de Campinas, Estado de São Paulo.

3.1. Vírus do enrolamento da folha da videira (VEFV).

Para o presente estudo foram utilizadas plantas de videira, variedade Seibel 2, infectadas com VEFV, sorotipo III (VEGA & SCAGLIUSI, comunicação pessoal), e livres do vírus obtidas por termoterapia. Estes materiais foram cedidos pelo Dr. Hugo Kuniyuki e mantidas em casa de vegetação da Seção de Virologia do IAC.

Nesse experimento foi utilizado como modelo de estudo, calos em crescimento ativo, obtidos *in vitro*, a partir de brotações jovens das plantas infectadas ou não.

3.1.1. Cultura de calos *in vitro*.

Os trabalhos de cultura de tecido foram feitos em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar (VECO).

Pontas apicais de ramos jovens com cerca de 2cm foram coletadas à medida em que as plantas brotavam.

A assepsia dos ápices caulinares foi obtida por tratamento em solução de hipoclorito de sódio a 0,2% durante dez minutos, seguida de três lavagens com água destilada estéril. Em seguida, em condições assépticas e com auxílio de pinça e bisturi, os ápices caulinares foram seccionados em pequenos segmentos de aproximadamente 5,0 mm e colocados em meio de cultura.

Os meios de cultivo constituíram-se basicamente dos sais minerais de MURASHIGE & SKOOG (1962) suplementado com diferentes combinações de reguladores de crescimento. Os meios foram solidificados com 7 g/l de ágar e o pH ajustado para 5,8. Posteriormente foram autoclavados a 121°C e distribuídos em placas de petri, com 9,0 cm de diâmetro (20 ml/placa)

em câmara de fluxo laminar. O delineamento experimental utilizado em todos os experimentos foi o inteiramente casualizado.

3.1.2. Meios de cultivo para obtenção de calos de videira.

Esses estudos foram realizados com a finalidade de escolher um meio de cultura com maior capacidade para formação de calos, e de mantê-los em proliferação.

Foram comparados quatro meios de cultura (A,B,C,D) constituídos de meio básico MS suplementado com 30 g/l de sacarose, 1 g/l de caseína, cinetina (CIN), ácido indolil acético (AIA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e benzilaminopurina (BAP) em diferentes concentrações. (Tab. 2).

Foram isolados 6 a 8 explantes por placa de cultura. Cada tratamento teve em média cinco repetições. As culturas foram mantidas no mesmo meio de cultivo até a avaliação, após 8 semanas de cultivo.

Foram obtidas as porcentagens de explantes que formaram calo em cada tratamento, assim como avaliações do crescimento e morfologia dos calos. As culturas contaminadas foram descartadas.

3.1.3. Condições de luz e temperatura.

Visando observar possíveis diferenças que poderiam existir em relação à temperatura e luminosidade sobre o crescimento dos calos e na concentração de vírus, parte da cultura foi mantida no escuro, à temperatura aproximada de 24°C e parte sob fotoperíodo de 16 horas luz (1.000 lux) à temperatura aproximada de 27°C.

Tab.2 Composição dos meios utilizados para a cultura de calos de videira *in vitro*.

Meio	A	B	C	D
MS (1962)	+	+	+	+
mg/l				
AIA	0,3	0,3	-	2,0
2,4-D	-	1,0	-	-
CIN	0,3	0,3	2,5	0,2
BAP	-	-	1,0	-
g/l				
Caseina 1.0	+	+	+	+
Sacarose 30.0	+	+	+	+

3.1.4. Tratamentos de calos de videira com Virazole.

Os calos obtidos em meio de cultura MS suplementado com 0,3 mg/l de AIA; 0,3 mg/l de cinetina e 1,0 mg/l de 2,4-D (meio de cultura B, Tab. 2) foram utilizados para tratamentos com Virazole.

Os calos foram transferidos individualmente para frascos de cultura de 60 x 30 mm contendo 10 ml do mesmo meio de cultura B, acrescido de Virazole nas concentrações de 1,10, 50 e 100 ppm.

O tratamento foi feito *in vitro*, adicionando-se o produto, por filtração, através de membrana de acetato de celulose (Millipore 0,2 mm) ao meio de cultura já esterilizado. Cada tratamento teve em média cinco repetições. Como controle foram utilizados calos infectados com VEFV, mantidos em meio de cultura sem adição de Virazole e calos saudáveis. As culturas foram mantidas sob condições de escuro à temperatura aproximada de 24°C.

A cada 30 dias os calos eram transferidos para meio de cultivo fresco, contendo a mesma concentração de Virazole, quando então, eram feitas as avaliações, ou seja, a cada 30, 60, 90, 120 e 150 dias em cultura. As culturas contaminadas foram descartadas.

O crescimento dos calos foi determinado através de avaliação visual do diâmetro, morfologia, coloração e textura dos calos.

A concentração de VEFV nos calos foi determinada através de testes serológicos ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) e MEIAD (Microscopia eletrônica de imuno-adsorção).

3.2. Vírus do anel do pimentão (VAP)

3.2.1. Inoculação do VAP em plantas de fumo e *G. globosa*.

O vírus do anel do pimentão foi inoculado mecanicamente em plantas saudáveis de fumo *Nicotiana tabacum*, "TNN" e *Gomphrena globosa* L., com idade de quatro semanas.

Empregou-se como fonte de inóculo folhas de fumo infectadas com VAP, apresentando lesões locais e sintomas sistêmicos, específicos do vírus, pertencentes à coleção da Seção de Virologia do Instituto Agrônomo de Campinas.

As folhas foram maceradas em almofariz, em presença de tampão fosfato de potássio 0,02 M pH 7,0, acrescido de sulfito de sódio na mesma molaridade.

As inoculações foram feitas nas folhas mais jovens das plantas, previamente polvilhadas com carborundo malha 500, que funcionou como abrasivo, friccionando-se aquelas com indicador umedecido na solução de inóculo. Em seguida as folhas foram lavadas com água para retirar o excesso de abrasivo e inóculo existentes.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação como fonte de vírus do anel do pimentão.

3.2.2. Cultura de calos *in vitro*.

Os calos foram obtidos a partir de folhas das plantas fonte de vírus. As folhas foram imersas em álcool 70% durante dois minutos, seguida de três lavagens com água destilada esteril. Posteriormente foram colocadas em solução composta de 0,2 % hipoclorito de sódio durante cinco minutos e novamente lavadas 3 vezes com água destilada esteril.

Após a assepsia as folhas foram cortadas em pequenos segmentos (4-5 mm²) e colocadas verticalmente em placas de petri contendo 20 ml de meio de cultura B (Tab. 2), perfazendo um total de 10 explantes por placa.

As culturas foram mantidas sob condições de escuro, à temperatura aproximada de 24°C, durante 8 semanas.

3.2.3 Tratamentos com Virazole em calos infectados com VAP (Experimento 1).

Calos de fumo e *G. globosa* obtidos como descrito em 3.2.2, com aproximadamente oito semanas em cultura foram utilizados para tratamento com Virazole, conforme descrito em 3.1.4. As concentrações de Virazole utilizadas nesse experimento foram de 10, 20, 30, 40, 50 e 100 ppm.

Os calos foram transferidos individualmente para os frascos de cultura contendo 10 ml de meio. Cada tratamento teve em média cinco repetições. Como controle foram utilizados calos infectados com VAP, mantidos em meio de cultura sem tratamento e calos sadios. As culturas foram mantidas sob condições de escuro, com temperatura de aproximadamente 24°C.

A cada 30 dias os calos foram transferidos para meio de cultura fresco, contendo a mesma concentração de Virazole, quando eram feitas as avaliações, ou seja, após 30, 60, 90, 120 e 150 dias em cultura.

O crescimento dos calos foi avaliado como descrito em 3.1.4. A concentração de vírus nos calos foi determinada através de testes ELISA e MEIAD.

3.2.4. Tratamentos com Virazole durante a indução de calos em folhas com VAP (Experimento 2).

Este experimento foi feito com a finalidade de verificar se o Virazole aplicado no meio de cultura na fase de indução do calo seria mais eficiente do que quando aplicado em calos já formados (Experimento 1).

Neste ensaio as folhas das plantas de fumo e de *G. globosa* infectadas com VAP foram esterilizadas superficialmente e seccionadas como descrito anteriormente. Em seguida foram colocadas em meio de cultura visando a indução de calos (meio de cultura B-Tabela 2), acrescido de Virazole nas concentrações de 50, 100, 200, 250 e 500 ppm. Como controle foram utilizadas folhas de plantas infectadas com VAP e folhas de plantas sadias, em meio sem Virazole.

Os explantes foram colocados individualmente em frascos de cultura contendo 10 ml de meio, com 5 repetições por tratamento. O cultivo se realizou sob condições de escuro com temperatura aproximada de 24°C, durante 150 dias.

Parte da cultura foi transferida para meio de cultivo fresco, contendo a mesma concentração de Virazole, a cada 30 dias; a outra parte foi transferida a cada 15 dias, visando verificar se um período de tempo mais curto entre as aplicações de Virazole poderia melhorar seu efeito sobre a multiplicação de vírus.

As avaliações foram feitas a cada transferência dos explantes para meio de cultura fresco. O crescimento dos calos foi avaliado como descrito em 3.1.4. e a concentração dos vírus nos calos foi determinada através de testes ELISA e MEIAD.

Para obter um padrão de concentração do VAP nos tecidos avaliados, o vírus foi purificado a partir de folhas de fumo "TNN", sistemicamente infectadas, coletadas cerca de 14 dias após a inoculação mecânica do vírus, conforme esquema da Fig. 2.

Nos testes ELISA foi incluído uma curva padrão de concentração de vírus purificado utilizando-se 3 concentrações de VAP conhecida. (Fig. 11 e 13).

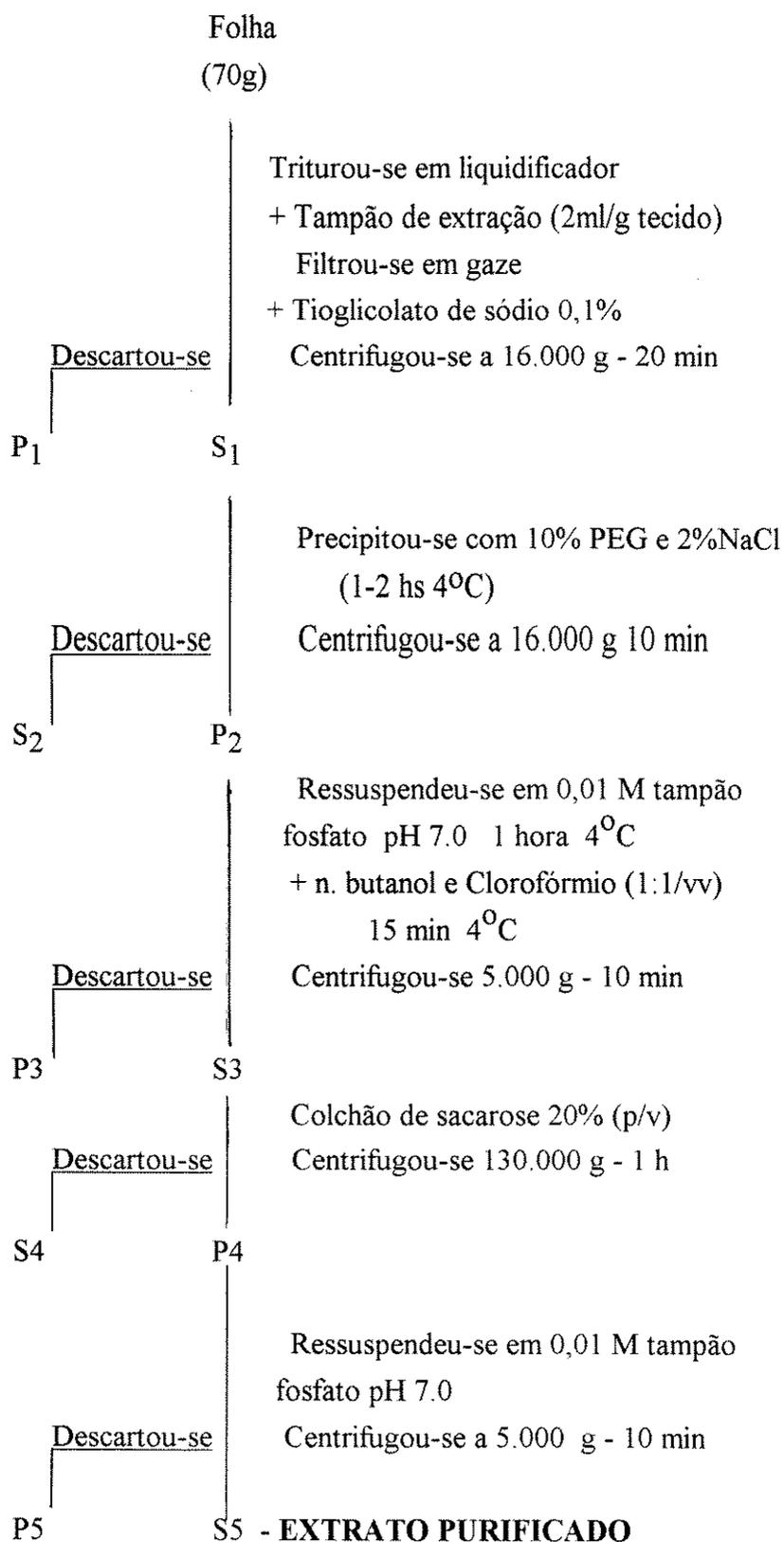


FIGURA 2 : Esquema do procedimento da purificação do VAP.

3.3. Vírus da Tristeza dos citros (CTV).

Neste experimento o efeito terapêutico do Virazole sobre o vírus da tristeza foi testado através de mini-enxertia *in vitro*.

3.3.1. Plantas fonte de vírus da tristeza dos citros.

Como fonte de vírus da tristeza foram utilizadas plantas de limão Galego (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing.), mostrando sintomas fortes de palidez das nervuras, mantidas em casa de vegetação da Seção de Virologia/IAC. Dessas plantas foi obtido material para tratamento com Virazole.

3.3.2. Obtenção do porta - enxerto.

3.3.2.1. Coleta, preparo e germinação de sementes utilizadas como porta-enxerto

Os porta-enxertos utilizados foram obtidos a partir de sementes de *Citrangue troyer* (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. X *Citrus sinensis* (L.) Osbeck), germinadas *in vitro*.

As sementes foram coletadas de frutos maduros, sadios, obtidos no Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis - SP. Posteriormente, foram retiradas dos frutos e submetidas a um tratamento com água quente a 50°C por dez minutos e colocadas para secar à sombra.

A assepsia das sementes foi realizada em solução de 0,2% de hipoclorito de sódio durante dez minutos. Em seguida, em condições assépticas, foram feitas três lavagens com água destilada estéril.

Após a assepsia as sementes foram colocadas para germinar em tubos de ensaio (1 semente/tubo) nas dimensões de 25 x 150 mm, contendo cerca de 15 ml de meio de cultura esterilizado, composto pelos sais minerais de MS, solidificado com 1% de agar e o pH ajustado para 5,7.

Os tubos foram mantidos no escuro com temperatura ao redor de 25°C .

3.3.3. Obtenção do ápice para enxerto.

Como copa foram utilizados brotos em crescimento ativo obtidos de estacas de limão Galego infectadas com CTV e estacas de plantas sadias, cultivadas *in vitro*.

Estacas de ramos jovens, com cerca de 10 cm de comprimento, contendo pelo menos 5 gemas dormentes, foram coletadas das plantas.

As estacas foram preparadas retirando-se as folhas e espinhos e lavadas em água corrente. Em seguida foram mergulhadas durante 5 minutos em solução contendo fungicida Benlate (1mg/l) .

A assepsia foi feita em álcool 75% durante três minutos. Em seguida foram colocadas em solução composta de uma parte de detergente Movadol e três partes de água destilada, por cinco minutos. Posteriormente as estacas foram colocadas em solução de 2% de hipoclorito de sódio durante cinco minutos e lavadas três vezes com água destilada estéril.

3.3.3.1. Tratamento das estacas com diferentes concentrações de Virazole.

O tratamento foi feito *in vitro* e consistiu em colocar as estacas para brotação das gemas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 15 ml de meio de cultura composto pelos sais minerais de MS, solidificado com 1% de agar e o pH ajustado para 5,7.

O Virazole foi acrescido ao meio de cultura já esterilizado, através de filtração em membrana Millipore 0,2 mm, em câmara de fluxo laminar.

As concentrações do produto testadas foram de 100, 200, 300, 400 e 500 ppm. Cada tratamento teve em média cinco repetições.

Como controle foram utilizadas estacas infectadas com CTV colocadas para brotar nas mesmas condições acima mencionadas, porém, em meio de cultura sem Virazole e estacas sadias.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas (1.000 lux) e temperatura de aproximadamente 27°C até o desenvolvimento das brotações. (Fig .3)

3.3.4. Enxertia *in vitro*.

Com o auxílio de pinça e bisturi, e sob estéreio-microscópio, a plântula germinada *in vitro* (3.3.2.2), foi preparada para receber o enxerto cortando-se o epicótilo cerca de 3cm acima do ponto de inserção dos cotilédones e a raiz reduzida a cerca de 6cm. (Fig. 4).

Uma inserção na forma de T invertido foi feita na extremidade do epicótilo. As bordas foram levemente levantadas para receber o enxerto. Brotos axililares obtidos em 3.3.3.1., medindo cerca de 1cm de comprimento, foram enxertados sobre o porta-enxerto preparado.

As plantas recém enxertadas foram colocadas individualmente em tubos de ensaio contendo 15-20 ml de meio de cultura líquido, composto pelos sais e vitaminas de MS, acrescido de 75g/l de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8.

Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas (1.000 lux) à temperatura aproximada de 27°C, durante 3-4 semanas (Fig.5). As plantas que não apresentaram pegamento de enxerto foram descartadas.

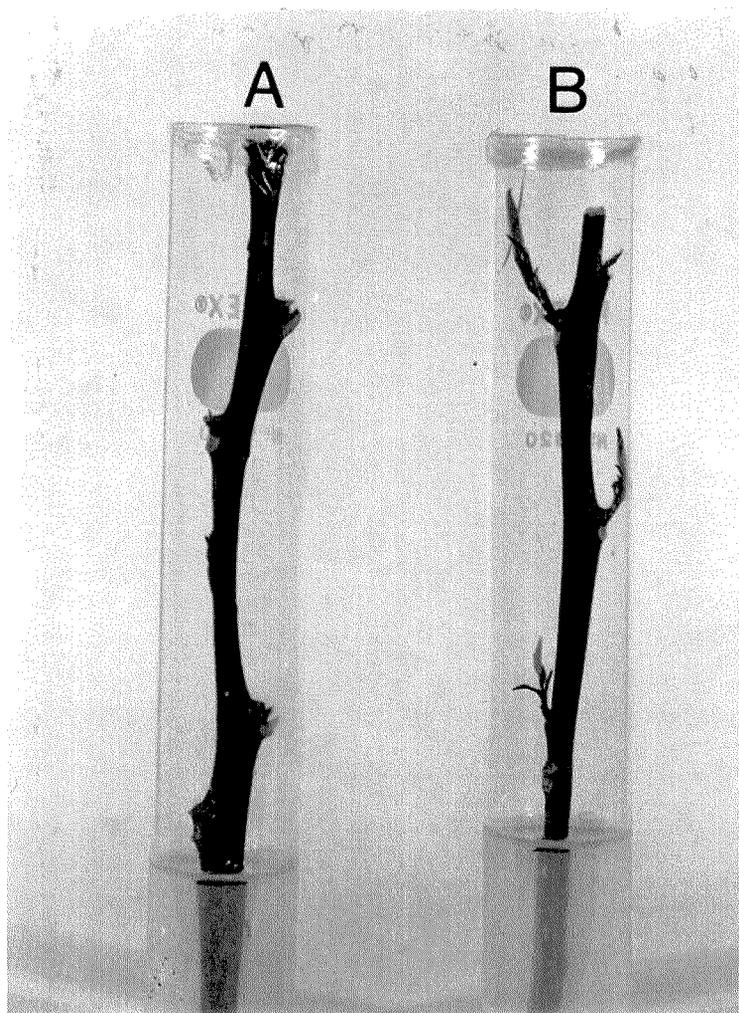


Fig. 3. A) Estaca de limão Galego cultivada em meio MS acrescido de Virazole. B) Brotações da estaca.

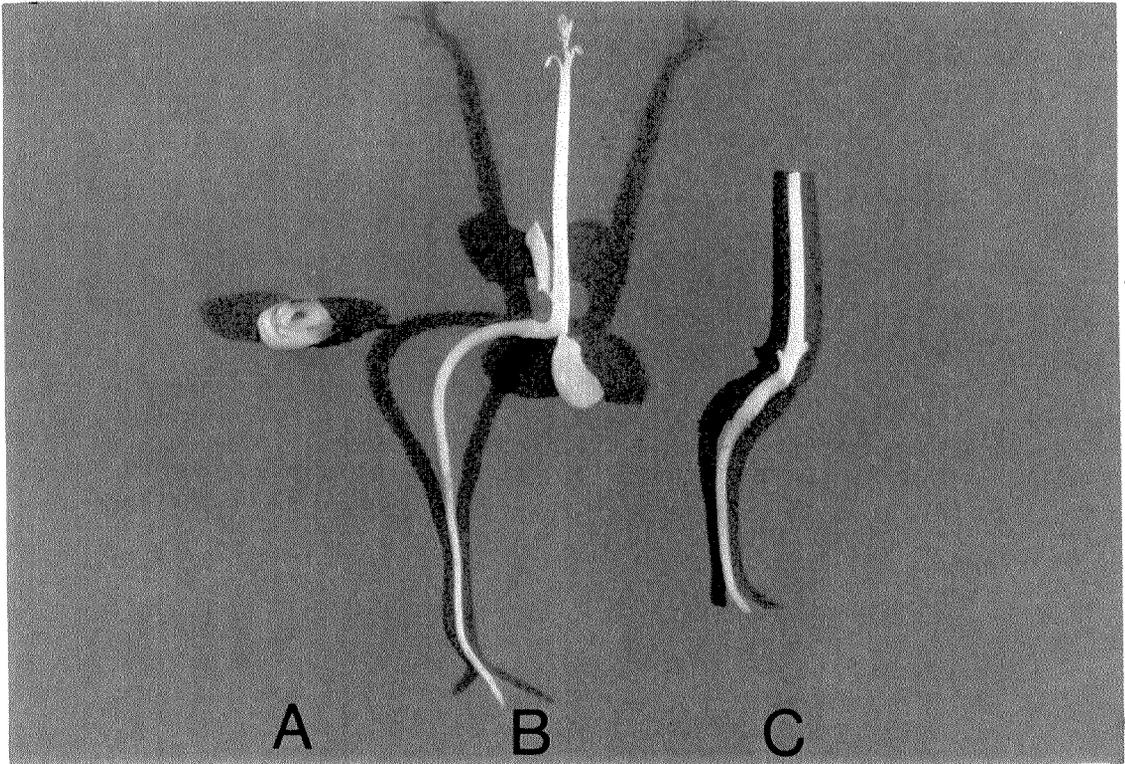


Fig. 4. Preparo do porta-enxerto. A) Semente de *C. troyer*. B) Plântula obtida da semente germinada em ambiente escuro após 2 semanas. C) Plântula pronta para receber o enxerto.

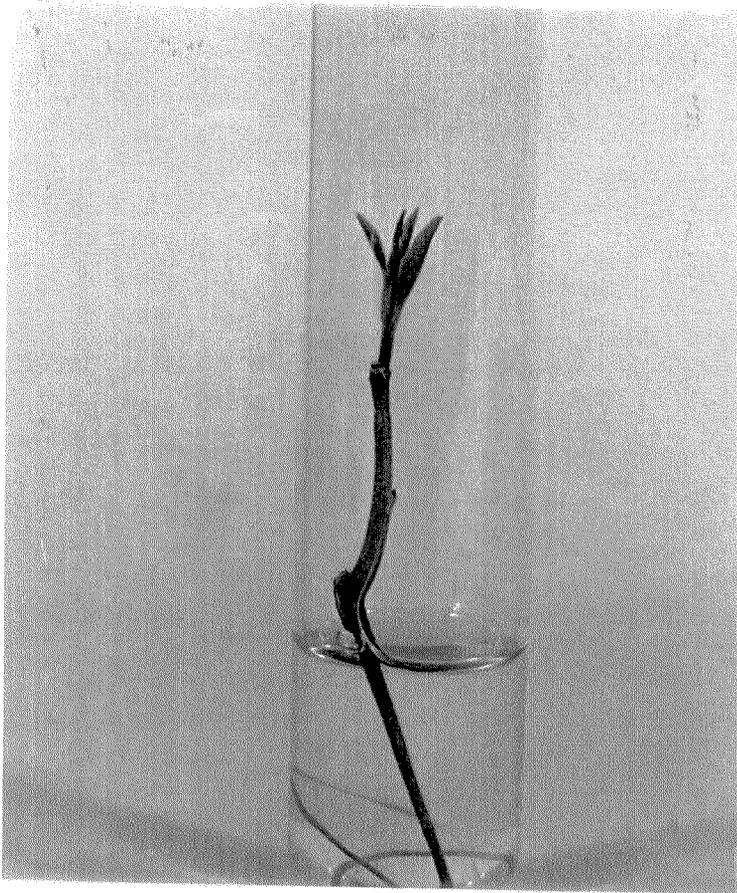


Fig. 5. Obtenção da planta após cerca de 4 semanas da enxertia.

3.3.5. Estabelecimento das plantas obtidas em porta-enxerto desenvolvido.

A fim de acelerar o crescimento, as plantas obtidas em 3.3.4. foram retiradas dos tubos de ensaio e enxertadas, por garfagem, em porta-enxertos de limão Cravo (*Citrus limonia* Osb), com 5-10 mm de diâmetro, obtidos de sementes, em casa de vegetação. Posteriormente, foram cobertas com sacos-plásticos e aclimatadas em casa de vegetação durante 15 dias (Fig.6).

A avaliação do efeito terapêutico do Virazole sobre o CTV foi feita através de leitura direta de sintomas das plantas obtidas, uma vez que o limão Galego é utilizado como planta indicadora desse vírus, mostrando sintomas específicos de palidez das nervuras que se tornam translúcidas quando observadas contra a luz, redução no tamanho das folhas e paralisação do crescimento (MULLER & COSTA, 1993). Foram também realizados testes serológicos ELISA e "Western-blot". Os resultados foram avaliados estatisticamente através da análise de variância e teste de Tukey para as médias ao nível de significância de 5%.

Visando obter um padrão de concentração do CTV nos tecidos avaliados, o vírus foi purificado de acordo com metodologia descrita por BAR. JOSEPH *et al.*, 1985; LEE *et al.*, 1987, 1988, conforme esquema da Figura 7.

As frações contendo CTV foram dialisadas durante 18 horas em tampão 0,015 M fosfato de potássio pH 8.0. As preparações não utilizadas imediatamente após a diálise foram adicionadas de 5% de sacarose e armazenadas a -20°C.

Nos testes ELISA foi incluído uma curva padrão de concentração do vírus purificado utilizando-se 3 diferentes concentrações de CTV conhecidas (Fig. 16).



Fig. 6. Planta enxertada sobre porta-enxerto de limão Cravo.

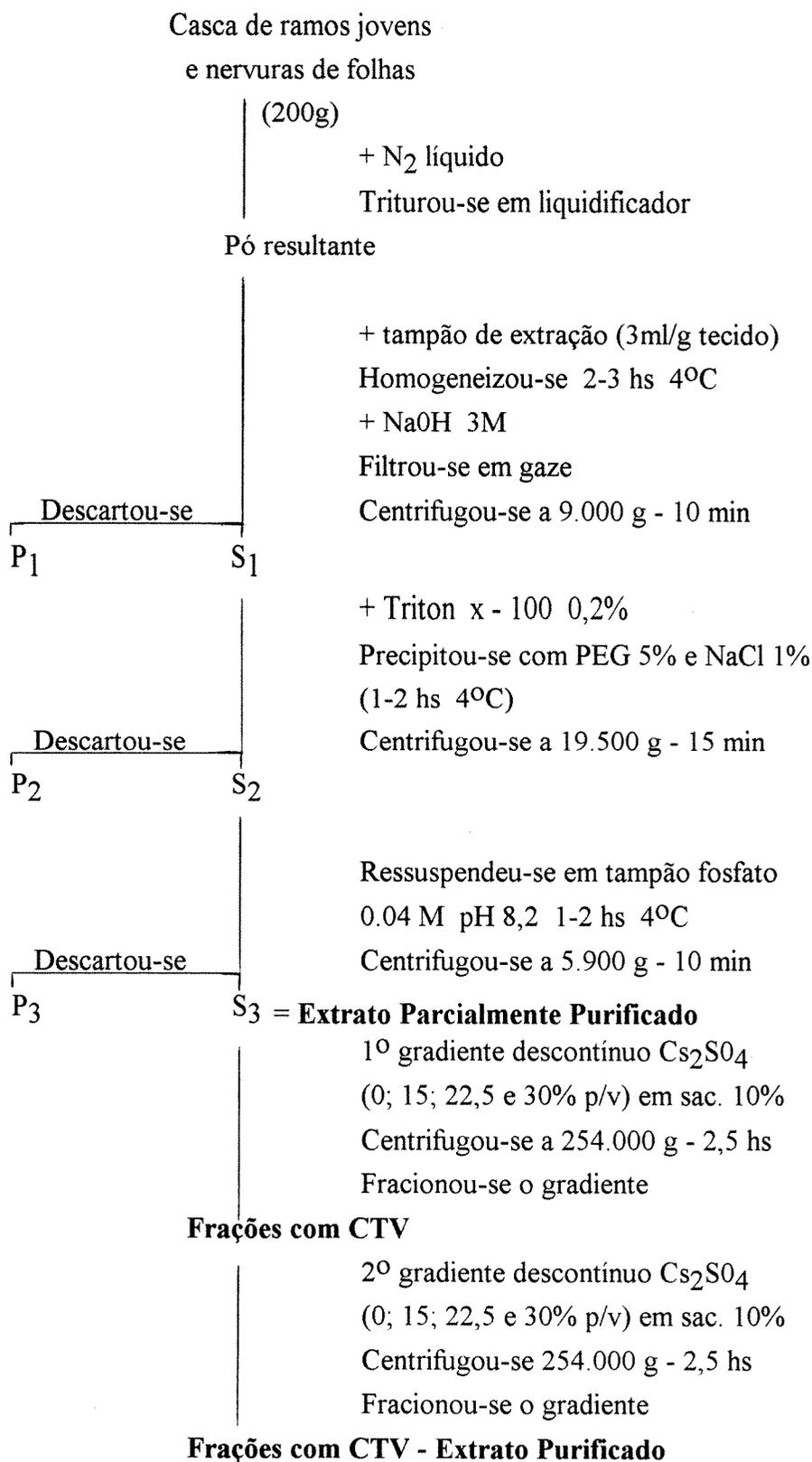


Figura 7. Esquema da purificação do CTV.

3.4. Testes serológicos.

3.4.1. Eletroforese de proteínas totais e "Western - blot.

A técnica de "Western - blot" foi feita para verificar se houve efeito terapêutico do Virazole sobre o CTV.

3.4.1.1. Extração de proteínas totais de folhas de plantas de limão Galego infectadas com CTV e tratadas com Virazole.

As proteínas totais foram extraídas de folhas de plantas de limão Galego infectadas com CTV e tratadas com Virazole (3.3.5.) e de seus respectivos controles, plantas infectadas com CTV sem tratamento e plantas saudáveis.

As folhas foram trituradas em almofariz com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó bem fino. A cada 50mg de tecido foram adicionados 500 ml de tampão de extração (63 mM Tris-HCl pH 7.0; 5% 2-Me; 2% SDS; 10% glicerol), e as amostras foram bem homogeneizadas. Em seguida foram colocadas em banho fervente durante três minutos e resfriadas em gelo. Posteriormente as amostras foram centrifugadas durante dez minutos a 12.000 rpm e o sobrenadante foi coletado e mantido a - 20°C.

3.4.1.2. Análise de proteínas através de gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE).

As proteínas extraídas como descrito em 3.4.1.1. foram analisadas através de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), gradiente 5-20%, de acordo com modificações da metodologia descrita por LAEMMLI (1970). Os géis foram preparados em placas de vidro de 16 x 20 cm, com auxílio de um formador de gradiente BioRad e uma bomba peristáltica. Foram utilizados como padrão de massa molecular, marcadores da BioRad, preparados de acordo com as instruções do fabricante: fosforilase b de músculo de coelho ($97,4 \times 10^3$); soroalbumina bovina ($66,2 \times 10^3$); ovoalbumina ($42,7 \times 10^3$); inibidor de tripsina da soja ($21,5 \times 10^3$) e lisozima ($14,4 \times 10^3$).

O tampão de corrida consistiu de : 25 mM Trisma base; 0,192 M glicina pH 8,3; 0,1% SDS. Após a aplicação das amostras a corrida eletroforética foi feita à temperatura ambiente, a 100 volts, até que a frente de azul de bromofenol atingisse o fim do gel.

3.4.1.3. "Western blot".

As análises de "Western blot" foram feitas utilizando-se um aparelho Multiphor II Novablot (LKB) de acordo com as especificações do fabricante.

A transferência das proteínas foi feita em membranas de nitrocelulose, a 0,8 mA/cm². Posteriormente incubou-se durante 3 horas em TBS (0,1 M Tris - HCl pH 7,5; 0,9% NaCl) contendo 5% de leite em pó desnatado. Em seguida as membranas foram incubadas com antissoro policlonal específico para CTV, diluído 1:10.000 em TBS contendo 0,1% Tween 20 e 3% BSA durante 2 horas, seguido de 3 lavagens com TBS-T. As membranas foram incubadas em TBS-T e o conjugado "anti-rabbit" IgG-fosfatase alcalina (SIGMA) diluído 1:7.000, durante 1 hora à temperatura ambiente. Lavou-se como descrito acima. Revelou-se em uma solução contendo 100 ml de tampão (0,1 M Tris - HCl pH 9.5; 0,1 M NaCl; 5 mM MgCl₂); 8 mg de BCIP (5-bromo - 4 - chloro - 3-indolyl phosphate); 16 mg de NBT (nitroblue tetrazolium). Colocou-se a membrana em água quando a coloração desejada foi obtida.

3.4.2. Microscopia eletrônica de imuno-adsorção - MEIAD.

Visando verificar se houve efeito viricida do Virazole sobre o VEFV e o VAP, foram realizados testes de microscopia eletrônica. Os testes foram feitos retirando-se duas amostras de cada repetição por tratamento, após cada troca dos calos para meio de cultura fresco.

A metodologia utilizada foi aquela descrita por VEGA *et al.* (1982), como segue:

Grades 200-300 "mesh" com filme parlodium/carbono foram tratadas com antissoro policlonal específico para os vírus em estudo, com diluição adequada em 0,06 M tampão fosfato de potássio pH 7.4, por trinta minutos à temperatura ambiente, e após lavagem, incubadas durante trinta minutos para captura de partículas nas amostras testadas, diluídas 1:10 no mesmo tampão. Em seguida foram lavadas 3 vezes com água destilada e contrastadas com 1% de acetato de uranila.

As amostras foram examinadas ao microscópio eletrônico Zeiss EM-10C com aumentos de 10.000 a 30.000 vezes.

3.4.3. Enzyme linked immunosorbent assay - ELISA.

Os testes ELISA foram realizados com objetivo de avaliar se houve efeito terapêutico do Virazole sobre o VEFV, VAP, e CTV.

Para o VEF e VAP foi utilizada a metodologia PTA- ELISA ("Plate Trapped Antigen" ELISA) e para o CTV foi utilizada DASI-ELISA ("Double antibody sandwich indirect" ELISA).

3.4.3.1. PTA-ELISA.

A metodologia adotada para o PTA-ELISA foi aquela descrita por MOWAT & DAWSON (1987), como segue:

- Extrato dos calos diluído 1:20 (p/v) em tampão carbonato (0,015 M Na_2CO_3 ; 0,035 M NaHCO_3 , pH 9,6) foram colocados em microplacas de poliestireno (Corning 29860) e incubadas durante 60 minutos a 37°C.
- Foi adicionado tampão PBS (0,02 M KH_2PO_4 ; 0,15 M NaCl, pH 7,4) contendo 5% de leite em pó desnatado. Incubou-se por 15 minutos a 37°C.
- As placas foram incubadas com tampão PBS-T (PBS + 0,5 ml Tween-20/l) contendo antissoro policlonal específico para cada vírus, na diluição adequada, durante 60 minutos a 37°C.
- Adicionou-se tampão PBS-T contendo o conjugado anti-rabbit IgG-fosfatase alcalina (SIGMA) diluído 1:7.000. Incubou-se durante 60 minutos a 37°C.
- Foi adicionado substrato p-nitrofenil fosfato (PNPP- SIGMA 104) diluído 1mg/ml em tampão substrato (10% dietanolamina, pH 9,8). Incubou-se no escuro, à temperatura ambiente durante 2 horas.
- Mediu-se a absorbância a 405 nm em um leitor de placas de ELISA (BIORAD 3550)

O mesmo volume (100 ml/poço) foi usado para todos os reagentes. As amostras testadas foram ensaiadas em duplicata. Entre cada passo lavou-se as placas 3 vezes com PBS-T. Os anticorpos utilizados para o VEF e VAP e suas diluições estão descritos em 3.5.1. e 3.5.2., respectivamente.

3.4.3.2. DASI-ELISA.

Os testes foram feitos utilizando-se anticorpo policlonal (PAb) na cobertura da placa e, posteriormente, uma mistura de anticorpos monoclonais (MAb) de amplo espectro, que foram detectados através de conjugado anti-mouse IgG-fosfatase alcalina. A metodologia foi feita de acordo com trabalho descrito por CAMBRA *et al.*, 1991, como segue:

- Microplacas de poliestireno (Corning 29860) foram cobertas com anticorpo policlonal específico para o CTV, diluído 1:1.000 em tampão carbonato e incubadas durante 2 horas a 37°C.
- Extrato das folhas ensaiadas, diluído 1:20 (p/v) em tampão PBS foram colocados nas placas e incubados durante 1 hora a 37°C.
- Tampão PBS contendo 2% de leite em pó desnatado foi adicionado nas placas. Incubou-se durante 15 minutos a 37°C.
- Anticorpos monoclonais específicos diluídos 1: 1.000 em tampão PBS foram adicionados e as placas incubadas durante 1 hora a 37°C.
- Adicionou-se tampão PBS contendo conjugado anti-mouse IgG-fosfatase alcalina (Sigma A 5153) na diluição de 1:9.000 e incubou-se por 1 hora a 37°C.
- As placas foram incubadas com substrato p.nitrofenil fosfato (PNPP-Sigma 104) diluído em tampão de dietanolamina (1 mg/ml), durante 1 hora no escuro, à temperatura ambiente.
- Mediu-se a absorbância a 405 nm em leitor de placas de ELISA (BIORAD 3550).

O mesmo volume (100 ml/poço) foi usado para todos os reagentes. As amostras foram ensaiadas em duplicata. As placas foram lavadas entre cada passo 3 vezes com PBS-T. Os anticorpos para CTV utilizados nesse teste e suas diluições estão descritos em 3.5.3.

3.5. Antissoros específicos para os vírus em estudo utilizados nos testes serológicos.

3.5.1. Vírus do enrolamento da folha da videira (VEF).

Teste: MEIAD/ELISA - PTA

Antissoro: PAb GLRV III

Procedência: Laboratório do Dr. Gugerli, Nion, Suíça

Diluição: 1:1.000

3.5.2. Vírus do anel do pimentão (VAP).

Teste: MEIAD/ELISA - PTA

Antissoro: PAb 67 (77)

Procedência: Seção de Virologia /IAC, São Paulo, Brasil

Diluição: 1:1.000

3.5.3. Vírus da tristeza do citros (CTV)

Teste: ELISA - DASI

Antissoro: PAb 879

Procedência: Laboratório do Dr. Garnsey, Flórida, USA

Diluição: 1:1.000

Antissoro: MAb 3CA5 + MAb 3DF1

Procedência: Laboratório do Dr. Cambra, Valência, Espanha

Diluição: 1:1.000

Teste: Western - blot

Antissoro: PAb 1006

Procedência: Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, São Paulo, Brasil

Diluição: 1:10.000

4. Resultados e Discussão

4.1. Vírus do enrolamento da folha da videira (VEFV).

4.1.1. Efeito de diferentes combinações de reguladores de crescimento na indução de calos.

Os resultados obtidos com uso de diferentes reguladores de crescimento estão apresentados na tabela 3. A avaliação foi feita 8 semanas após o isolamento dos explantes em meio de cultura. De uma maneira geral, todos os tratamentos utilizados apresentaram alto índice de formação de calos. A maior porcentagem (96,5%) foi obtida no meio de cultura MS acrescido de 0,3 mg/l de CIN, 0,3 mg/l AIA e 1,0 mg/l 2,4-D (meio de cultura B), e a menor porcentagem (65%) foi obtida no meio de cultura MS suplementado com 2,5 mg/l CIN e 1,0 mg/l BAP (meio de cultura C). Os resultados mostraram também que durante esse período, os calos apresentaram maior velocidade de crescimento no meio de cultivo B. Após 15 dias de cultivo foi observada uma grande proliferação celular nas extremidades dos explantes e aos 60 dias de cultura os calos estavam formados. Esses resultados confirmaram o efeito benéfico desses reguladores de crescimento na indução de calos (ZHANAO *et al.*, 1989).

Os calos mantidos sob condições de escuro, com temperatura de aproximadamente 24°C formaram-se por toda a superfície dos explantes, como uma massa de células de coloração esbranquiçada e textura friável, em todos os tratamentos realizados. A indução de calos na presença da luz propiciou a formação de calos verdes e com textura compacta para todos os meios analisados.

O meio de cultivo que apresentou melhores resultados quanto à indução de calos em videira foi o meio de cultura B (MS+AIA+2,4-D+CIN) e as condições de crescimento foi sob condições de escuro, com temperatura aproximada de 24°C.

Tab. 3 Efeito de diferentes combinações de reguladores de crescimento, adicionados ao meio MS, na formação de calos, 8 semanas após a inoculação dos explantes.

Tratamento (mg/l)	Proliferação de calos (%)
A. CIN 0,3 + AIA 0,3	85,0
B. CIN 0,3 + AIA 0,3 + 2,4 D 1.0	96,5
C. CIN 2,5 + BAP 1.0	65,0
D. CIN 0,2 + AIA 2.0	89,0

4.1.2. Efeito de diferentes concentrações de Virazole no crescimento de calos de videira e na concentração de VEFV.

O Virazole interferiu de maneira significativa no crescimento dos calos, nas concentrações mais altas utilizadas. À concentração de 50 ppm os calos apresentaram-se relativamente menores, com proliferação mais lenta e à 100 ppm os calos tornaram-se escuros, indicando efeito fitotóxico. Os tratamentos utilizando 1 e 10 ppm do produto não interferiram no crescimento dos calos *in vitro*. Os calos mantidos nessas concentrações apresentaram-se friáveis, de coloração clara, semelhantes aos calos controles infectados que não receberam tratamento com Virazole e calos sadios.

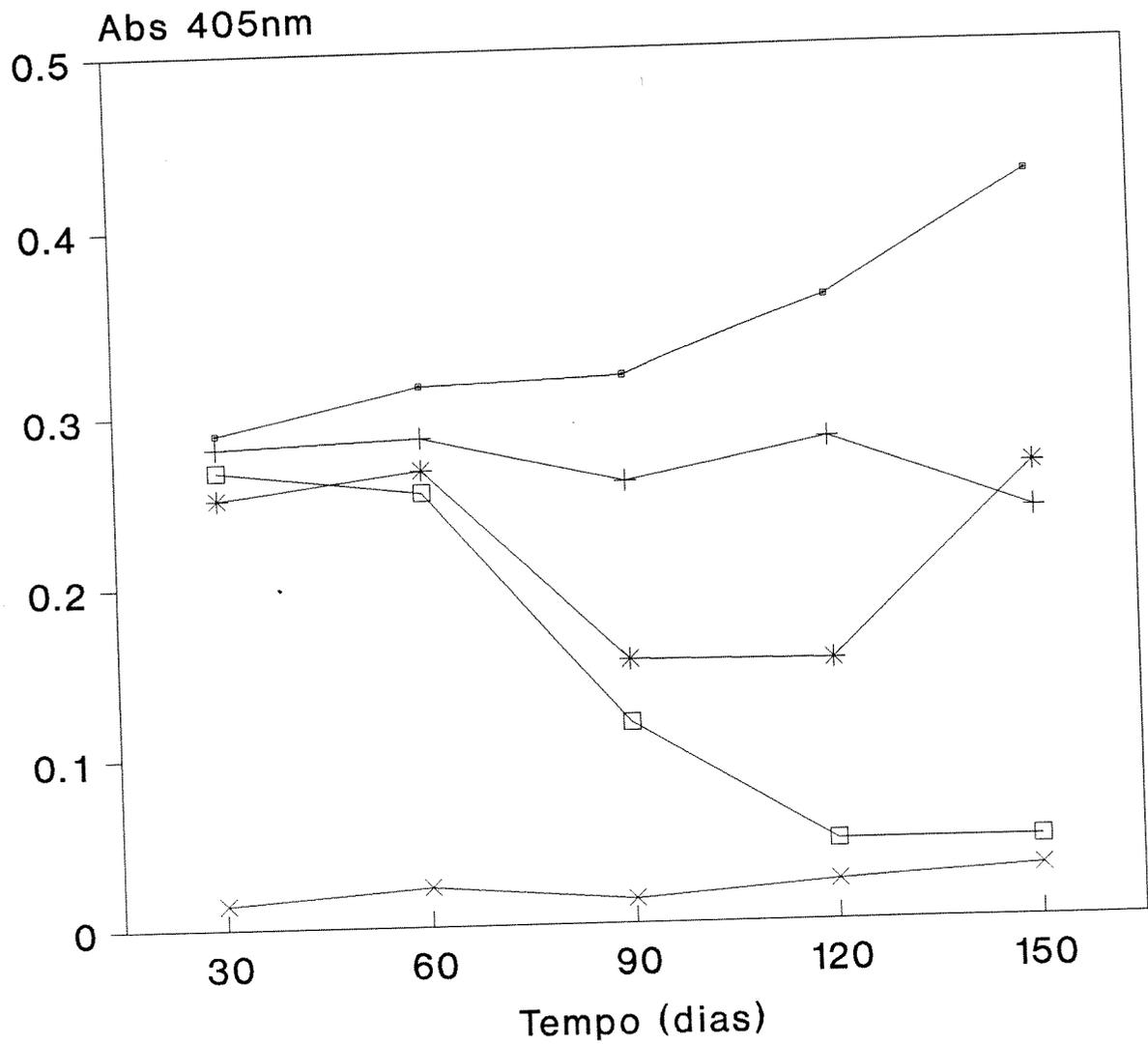
Em testes ELISA foi verificado que o Virazole inibiu de maneira significativa a replicação do VEFV. A inibição foi proporcional à concentração do produto (Fig. 8). Em todas as concentrações testadas houve diminuição no conteúdo de VEFV em calos cultivados *in vitro*, a partir de 60 dias em cultura.

Aos 90 dias de tratamento ocorreu uma redução drástica no conteúdo de vírus em calos tratados com 10 e 50 ppm de Virazole, porém, à concentração de 10 ppm o conteúdo de vírus aumentou a partir de 120 dias de tratamento. Em testes ELISA os valores médios de absorvância a partir de 120 dias em calos tratados com 50 ppm de Virazole ($A_{405} = 0,047$) apresentaram-se muito próximos aos controles sadios ($A_{405} = 0,030$), indicando que os calos estavam livres do VEFV. Nos testes de MEIAD verificou-se resultados consistentes com os de ELISA. O maior número de partículas foi observado nos calos controle (sem Virazole) e menor número apareceu nos tratamentos de 1 e 10 ppm. No tratamento com 50 ppm não foi possível observar partículas do VEFV, confirmando que este tratamento eliminou o vírus dos calos.

O Virazole atuou rapidamente em diminuir a concentração do VEFV a um nível baixo em calos em proliferação, porém, um longo período de incubação foi necessário para obter supressão completa dos vírus. No caso do tratamento com 10 ppm houve inibição nos 120 dias iniciais, mas a recuperação posterior indica que a inibição não é permanente nessa dosagem. É possível que nesta concentração o Virazole permite o aparecimento de vias alternativas de síntese de nucleotídeos.

Esses resultados confirmam os anteriormente encontrados por LEARCH (1977), SIDWELL *et al.* (1972) e BITTNER *et al.* (1989), que os vírus não podem ser eliminados por um único tratamento com Virazole uma vez que essa substância não elimina os vírus já sintetizados, mas só temporariamente inibe a replicação dos vírus.

Fig. 8. Efeito de diversas concentrações de Virazole sobre o conteúdo de VEFV em calos de videira avaliados por ELISA.



Virazole (ppm)

—●— 0

—+— 1

—*— 10

—□— 50

—×— sadia

Os resultados do presente trabalho são consistentes com a possibilidade de que a atividade antiviral do Virazole se manifesta por sua ação na síntese de novas partículas mais do que uma inativação direta dos vírus existentes (SMITH, 1980). Conseqüentemente, períodos relativamente longos podem ser necessários para erradicar vírus em tecidos uniformemente infectados durante o qual Virazole atua direta ou indiretamente inibindo a síntese de novas partículas enquanto os vírus são degradados durante sua ontogenia.

SIMPKINS *et al.* (1981), verificaram que o Virazole diminuiu o conteúdo de CMV em tecido meristemático em proliferação, porém, a erradicação completa dos vírus só foi conseguida após um longo período de incubação.

No presente trabalho o Virazole foi efetivo para eliminar o VEFV de calos infectados quando utilizou-se 50 ppm do produto.

4.2. Vírus do anel do pimentão (VAP).

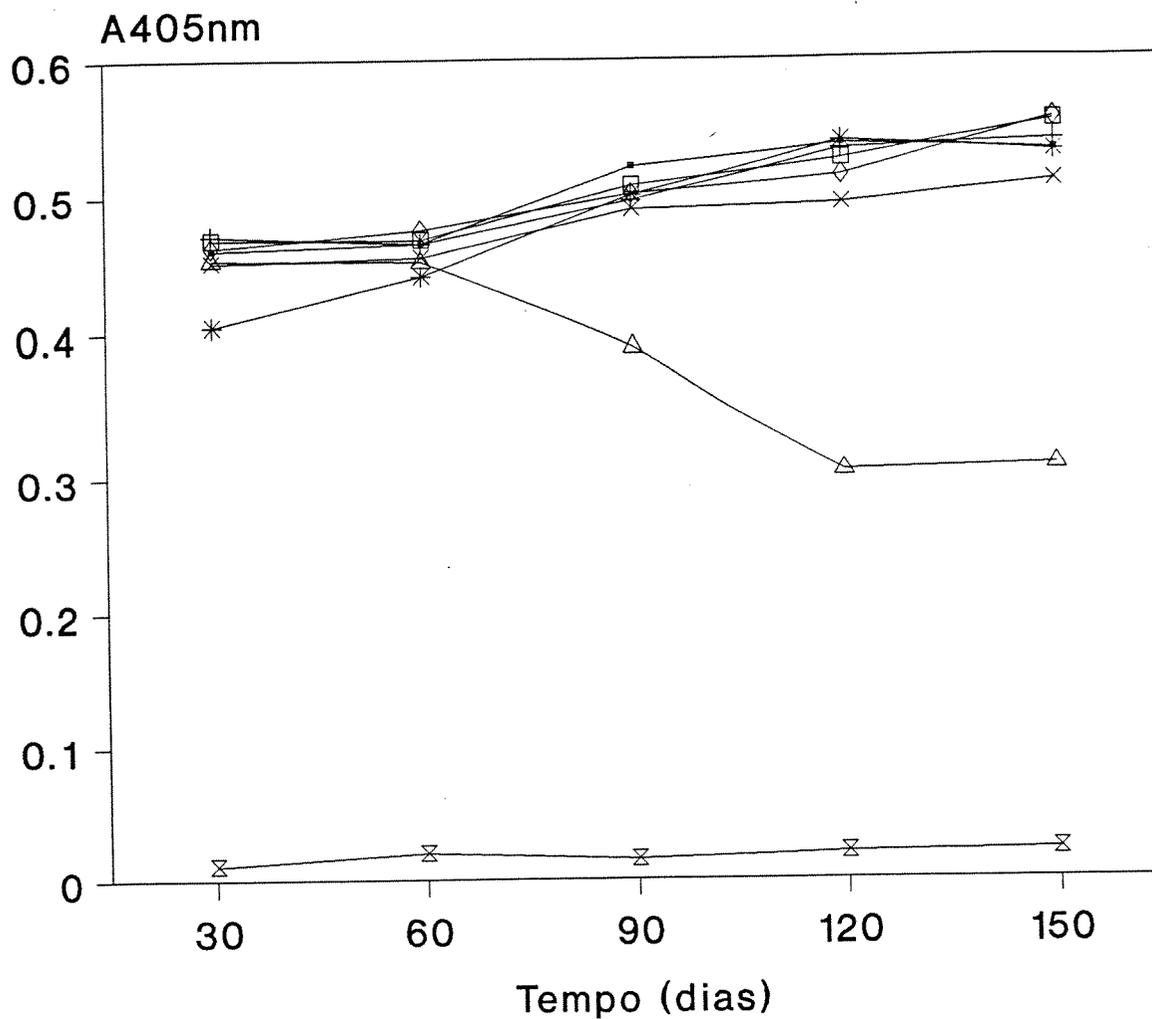
4.2.1. Efeito de diferentes concentrações de Virazole no crescimento dos calos de fumo e *G. globosa*, e no conteúdo de VAP (Exp. 1).

O mesmo meio e condições de cultura utilizados para calos de videira (Tab.2) foram eficientes para a obtenção de calos de fumo e *G. globosa*, e por isso adotados nos experimentos com esses materiais vegetais.

Neste experimento o Virazole não interferiu no crescimento dos calos em concentrações de 1 a 50 ppm, tanto para os calos de fumo como para os de *G. globosa*. Os calos apresentaram-se esbranquiçados, de proliferação rápida e textura friável. À concentração de 100 ppm a proliferação dos calos foi mais lenta; os calos apresentaram-se menores que os controles nas cinco repetições testadas. Concentrações maiores que 100 ppm, testadas em experimentos preliminares, foram fitotóxicas, causando oxidação dos calos.

Os testes ELISA mostraram que em calos de fumo somente a concentração de 100 ppm de Virazole mostrou efeito inibitório sobre a multiplicação do VAP (Fig. 9). Nessa concentração ocorreu diminuição no conteúdo de vírus nas células em proliferação a partir de 90 dias em cultura e se estabilizou em níveis relativamente altos ($A_{405} = 0,306$) nas amostras tomadas a 120 e 150 dias.

Fig. 9. Efeito de diversas concentrações de Virazole sobre o conteúdo VAP em calos de fumo avaliados por ELISA.



Virazole (ppm)			
—●—	0	—+—	10
—*—	20	—□—	30
—x—	40	—◇—	50
—△—	100	—x—	sadia

Em MEIAD foi notada uma diminuição no conteúdo de partículas virais a 100 ppm de Virazole mas não em concentrações mais baixas do produto. O VAP não foi erradicado em nenhuma das concentrações testadas, indicando que o tratamento com Virazole em calos já formados só permite inibição parcial da replicação do VAP.

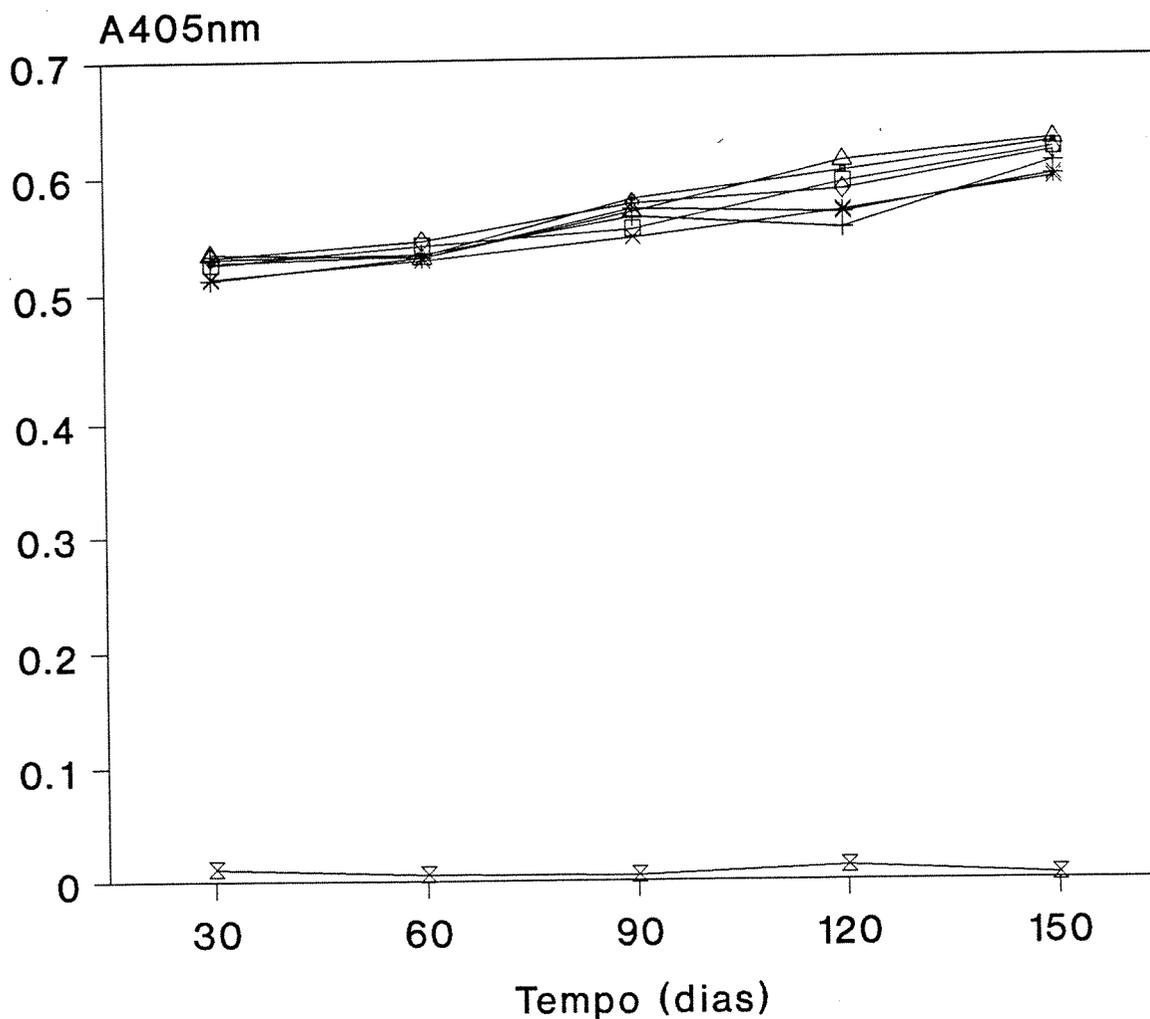
O Virazole não apresentou efeito terapêutico sobre a multiplicação do VAP em calos de *G. globosa*, em nenhuma das concentrações testadas durante 150 dias de cultivo *in vitro*. Os testes ELISA mostraram valores médios de absorbância para todas as concentrações testadas similares aos controles que não receberam tratamento (Fig.10). Em MEIAD as partículas do VAP foram detectadas em todos os tratamentos.

4.2.2. Efeito de diferentes concentrações de Virazole na indução *in vitro* de calos de folhas de fumo e *G. globosa*, e no conteúdo de VAP (Experimento 2).

O Virazole apresentou um leve efeito inibitório sobre a indução de calos à concentração de 100 e 200 ppm. Explantes provenientes de folhas sadias e folhas infectadas que não receberam tratamento, assim como aquelas submetidas à tratamento de 50 ppm de Virazole, começaram a formar calos em 2 semanas de cultivo, enquanto que explantes mantidos em tratamentos a 100 e 200 ppm, a indução de calos ocorreu em 6 e 8 semanas, respectivamente. Concentrações acima de 200 ppm foram fitotóxicas; os explantes tornaram-se escuros e não houve indução de calos. Esses resultados foram obtidos tanto para plantas de fumo como para *G. globosa*.

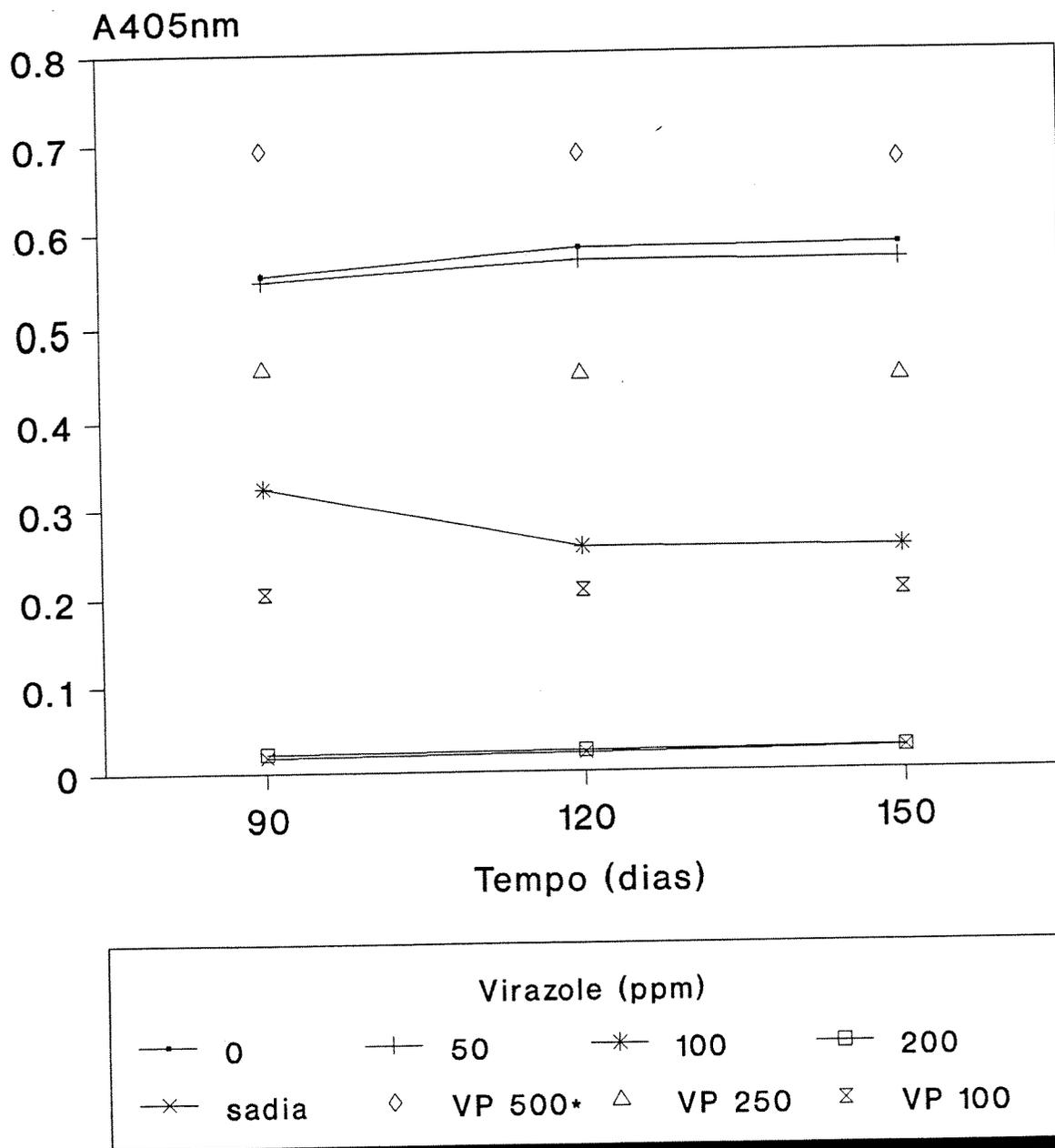
Em calos de fumo repicados a cada 30 dias para meio de cultura fresco, a concentração de Virazole mais eficiente para controlar o VAP foi de 200 ppm. Nessa concentração o valor médio de absorbância ($A_{405\text{ nm}}$), em ELISA, foi igual ao obtido com os calos sadios em avaliações feitas aos 90, 120 e 150 dias de cultivo (Fig. 11). O tratamento com 100 ppm de Virazole apresentou uma diminuição no conteúdo de vírus aos 90 dias de cultivo, comparando aos controles não tratados, e aos 120 dias a redução foi em torno de 50%. Ainda que a concentração do VAP nos calos tratados com 100 ppm de Virazole foi sempre mais baixa que nos calos controles, sua multiplicação não foi completamente inibida. Aos 150 dias de cultivo a quantidade de vírus presente nos tecidos era em torno de 124 ng/ml. O Virazole não mostrou efeito terapêutico sobre o VAP em tratamentos com 50 ppm. Nessa concentração a quantidade de vírus aos 150 dias de cultivo foi bastante elevada, em torno de 418 ng/ml, muito próxima a do controle que não recebeu tratamento que foi em torno de 430 ng/ml. Em testes de MEIAD não foram detectadas partículas virais à concentração de 200 ppm de Virazole (Fig. 12).

Fig.10. Efeito de diversas concentrações de Virazole sobre o conteúdo de VAP em calos de *G. globosa* avaliado por ELISA.



Virazole (ppm)			
—●—	0	—+—	10
—*—	20	—□—	30
—×—	40	—◇—	50
—△—	100	—⊗—	sadia

Fig.11. Efeito de diversas concentrações de Virazole sobre o conteúdo de VAP em explantes de fumo avaliados por ELISA.



* VP=vírus purificado diluído a 500, 250 e 100 ng/ml.

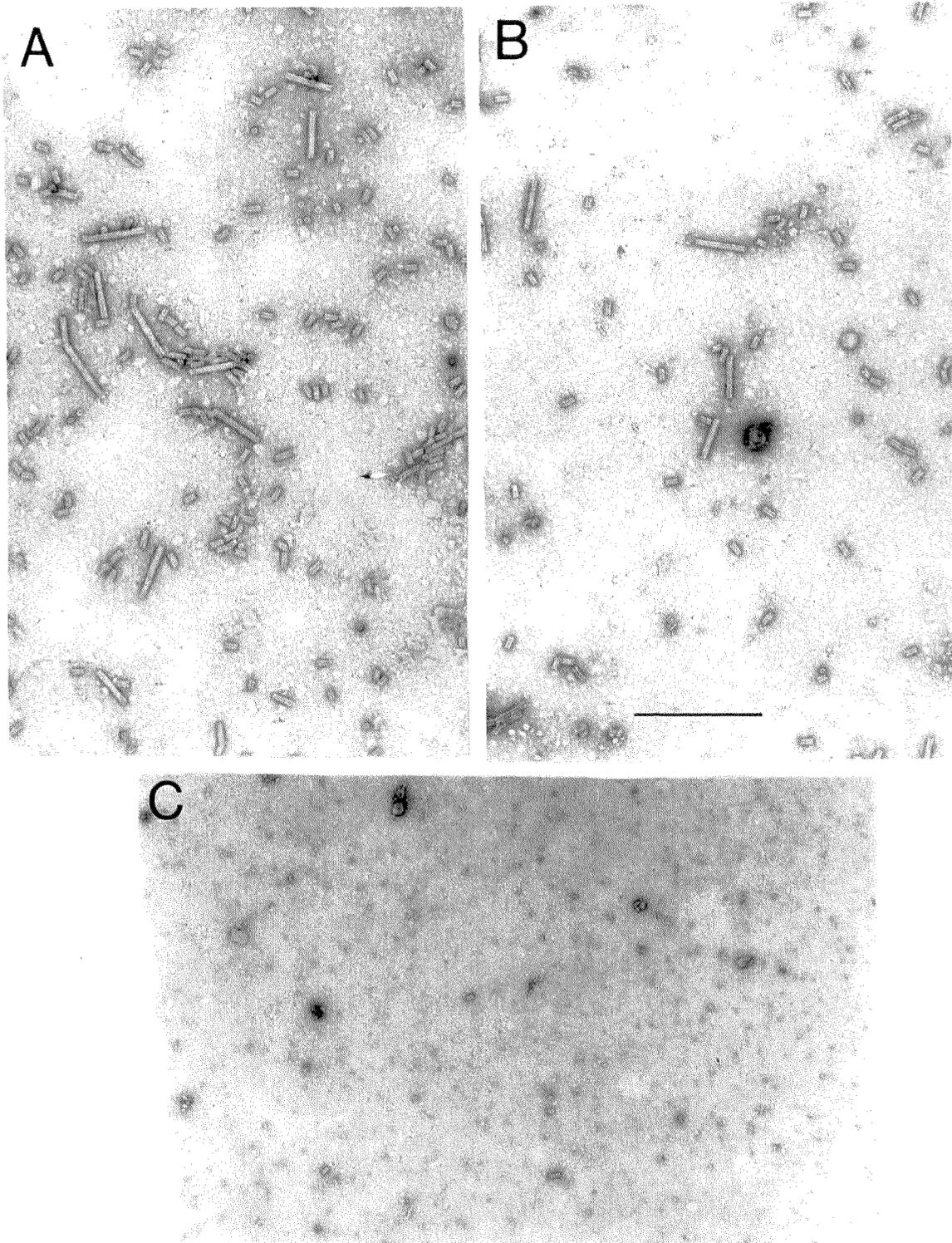


Fig. 12. Microscopia eletrônica de imuno-adsorção (MEIAD) em calos de fumo infectados com VAP (Exp. 2). Barra = 500 nm. A) Calos controle sem tratamento. B) Calos tratados com 100 ppm de Virazole. C) Calos tratados com 200 ppm de Virazole.

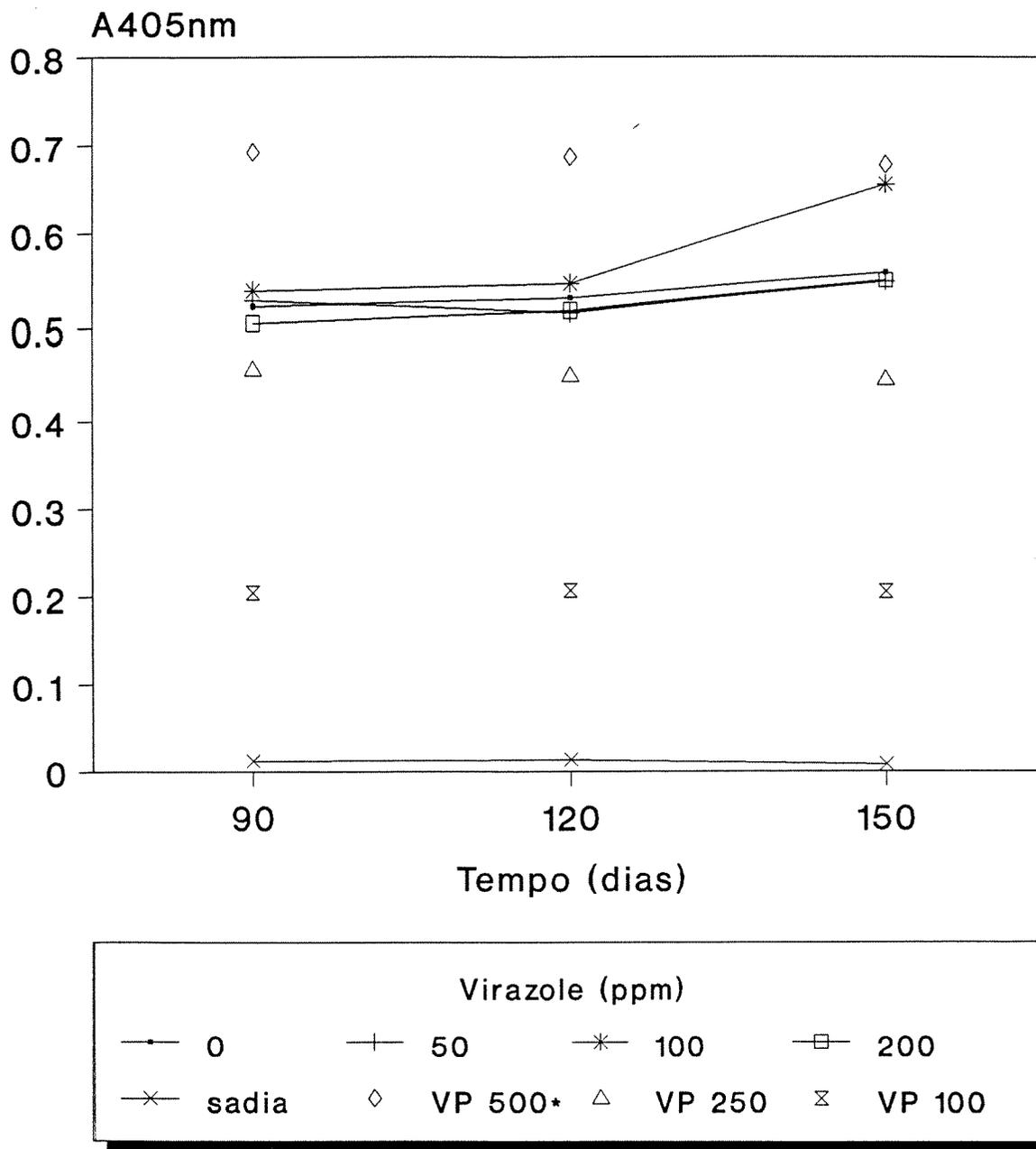
Para calos de *G. globosa*, obtidos *in vitro*, o Virazole não foi efetivo em nenhuma das concentrações testadas (Fig. 13). Os resultados dos testes ELISA mostraram que o conteúdo de vírus nos calos obtidos em todos os tratamentos foi similar aqueles dos calos controles não tratados. À 100 ppm de Virazole a concentração de vírus aumentou com o tempo. Esses resultados também foram observados em testes de microscopia eletrônica confirmando assim, a não eficácia do Virazole sobre a multiplicação do VAP em calos de *G. globosa*.

A diminuição no intervalo de tempo entre as repicagens para meio fresco, de 30 para 15 dias, não aumentou a eficiência do Virazole, sobre a multiplicação do VAP, tanto em fumo como em *G. globosa*, e foi tóxica nas concentrações a partir de 100 ppm. Nessas concentrações não houve formação de calos e os explantes tornaram-se necrosados após a 3ª passagem para meio de cultura fresco, ou seja, após 45 dias de cultivo.

Dos resultados desses experimentos foi observado que o Virazole reduz de maneira significativa o conteúdo de VAP em calos cultivados *in vitro*, quando o tratamento é renovado a cada 30 dias, embora seu efeito seja dependente da concentração utilizada e da planta hospedeira. Em calos de fumo a concentração de 200 ppm de Virazole foi capaz de reduzir consideravelmente o conteúdo de vírus à níveis não detectáveis nos testes serológicos, enquanto que em calos de *G. globosa*, o Virazole não foi efetivo em nenhuma das concentrações testadas. Esses resultados são consistentes com aqueles obtidos por DE FAZIO *et al.* (1980), num modelo experimental diferente, utilizando-se em o vírus do vira cabeça do tomateiro ("tomato spotted wilt virus" - TSWV) em plantas de tomate e fumo pulverizadas com Virazole. Foi verificado que em tomateiro somente uma alta concentração de Virazole como 500 mg/l foi capaz de controlar TSWV, enquanto que em fumo 100 mg/l foi suficiente para controlar infecção sistêmica do vírus. Além disso, as plantas de fumo, que normalmente são hospedeiras sistêmicas do TSWV, após tratamento com Virazole apresentaram apenas reação local, sugerindo uma mudança de comportamento da planta em relação ao vírus.

A quantidade real de Virazole absorvida ou retida pelas células é desconhecida mesmo em dada concentração. Além disso, não é conhecido como Virazole é distribuído nas células após a absorção e como ele é metabolizado. Possivelmente plantas de *G. globosa* apresentam vias metabólicas alternativas para a replicação do RNA viral (e não aquela inibida pelo Virazole), possibilitando a síntese de novas partículas virais ou porque o metabolismo do Virazole nessa espécie é diferente.

Fig.13. Efeito de diversas concentrações de Virazole sobre o conteúdo de VAP em explantes de *G.globosa* (ELISA).



* VP=vírus purificado diluído a 500, 250 e 100 ng/ml.

Os dados desses experimentos mostram que a eficácia de Virazole contra viroses de plantas é dependente também do estágio de desenvolvimento das células e tecidos tratados. O Virazole inibiu efetivamente a multiplicação do VAP quando pedaços de folhas obtidos de fumo infectado foram utilizados como explante (Exp. 2). Quando células de calos não organizados foram tratados com Virazole, houve pouca ou nenhuma inibição da multiplicação dos vírus (Exp. 1).

Em geral, tecidos menos organizados foram mais sensíveis ao Virazole. Células de folhas puderam se desenvolver em concentrações mais altas do produto do que células de calos não organizados.

LOZOYA-SALDANA *et al.* (1984), observaram que o Virazole foi capaz de inibir a multiplicação do vírus do mosaico do fumo "tobacco mosaic virus" (TMV) em células foliares de fumo quando o tratamento começou logo após a inoculação, porém não foi eficaz em calos não diferenciados inoculados com o mesmo vírus.

O Virazole reduziu de maneira significativa a incidência de infecção pelo vírus x da batata "potato virus X" (PVX) nas populações de plantas regeneradas quando adicionado em meio de cultura que induz o desenvolvimento de brotos axilares, mas não em meio de proliferação de células (SHEPARD, 1977).

O uso de calos infectados com vírus e tratados com diferentes concentrações de Virazole *in vitro*, mostrou ser um método eficiente para avaliar o efeito terapêutico do produto.

4.3. Vírus da tristeza dos citros (CTV).

O desenvolvimento de brotos axilares obtidos de estacas de limão Galego infectadas com CTV e cultivadas *in vitro*, foi afetado pelo conteúdo de Virazole no meio de cultura.

Tratamentos com 500 ppm da substância apresentaram efeitos fitotóxicos que foram manifestados através de necrose e morte das estacas. Nas concentrações de 400 e 300 ppm as estacas permaneceram verdes, porém, os brotos em desenvolvimento pararam de crescer e morreram.

Estacas tratadas com 200 e 100 ppm de Virazole emitiram o mesmo número de brotações que os controles não tratados e sadios. O desenvolvimento dos brotos começou após 10-12 dias de cultura e atingiram 1 cm cerca de 30 dias após o início do tratamento.

O Virazole inibiu a multiplicação do CTV à concentração de 200 ppm. Essa inibição foi verificada pela ausência de sintomas específicos do vírus da tristeza nas plantas obtidas. As plantas cresceram tão bem quanto as plantas sadias (Fig. 14). O Virazole não foi efetivo à 100 ppm. Nessa concentração o vírus provocou paralisação do crescimento das plantas e as folhas também apresentaram sintomas de palidez nas nervuras e redução do tamanho, semelhantes às plantas infectadas que não receberam tratamento (Fig. 15).

Nos testes ELISA foram obtidos valores muito baixos ($A_{405} = 0,009$) nas plantas tratadas com 200 ppm de Virazole aos 60, 150 e 330 dias após a enxertia (Fig. 16). As plantas tratadas com 100 ppm de Virazole apresentaram conteúdo de vírus bastante elevado, em torno de 2.800 ng/ml aos 330 dias após a enxertia. Esse valor foi próximo ao das plantas controle que não receberam tratamento, que foi em torno de 2.960 ng/ml.

O efeito terapêutico de Virazole sobre o CTV também foi verificado em "Western blot" pela ausência de bandas correspondentes às proteínas do capsídeo do vírus, nas plantas tratadas com 200 ppm de Virazole (Fig. 17). As plantas tratadas com 100 ppm do produto apresentaram padrão de bandas similar ao controle que não recebeu tratamento e ao padrão de bandas do vírus purificado. Considerando que o teste de "Western blot" é mais sensível que o de ELISA, este resultado confirma a eliminação total do CTV nos brotos obtidos de estacas tratadas com Virazole.

Observações visuais das plantas de limão Galego indicaram que o tratamento *in vitro* de estacas infectadas com 200 ppm de Virazole previniu completamente o desenvolvimento de sintomas do CTV. Os testes serológicos confirmaram que os brotos desenvolvidos estavam livres de vírus. Após um ano do início do tratamento as plantas ainda permaneceram sadias. Esses resultados revelam experimentalmente a eficácia deste composto quimioterápico sobre a multiplicação do CTV. O Virazole, além de exercer efeito sobre as vias de síntese de ácidos nucleicos, deve comprometer o processo de tradução de proteínas do CTV, detectado experimentalmente pela ausência de bandas correspondentes às proteínas do capsídeo do vírus em testes de Western blot.

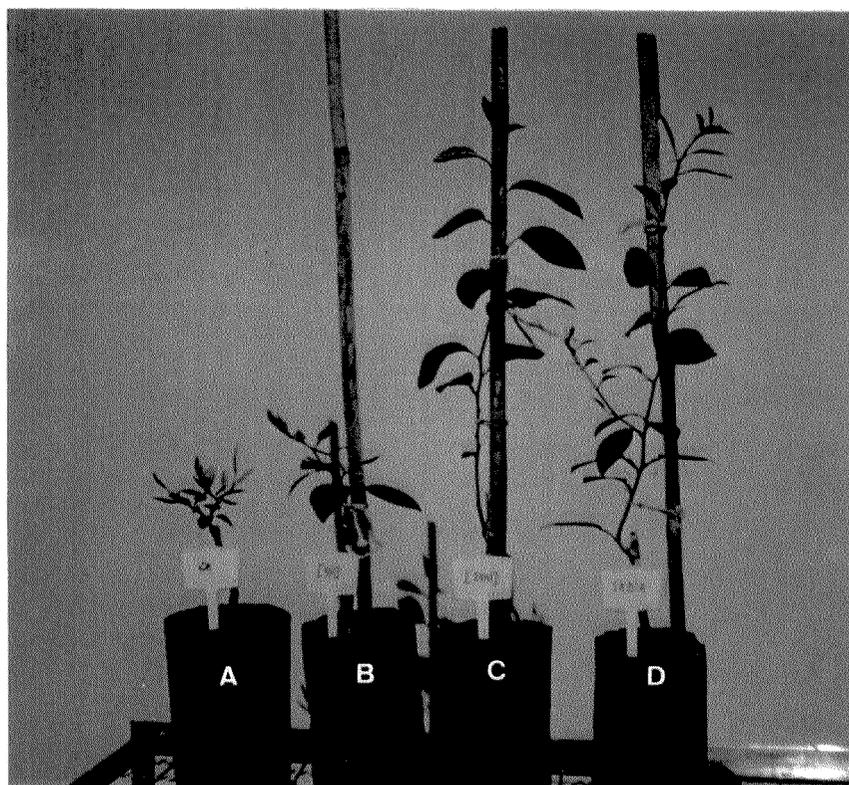


Fig. 14. Efeito terapêutico de Virazole contra infecção pelo CTV em plantas de limão Galego. Plantas A e B apresentam paralisação do crescimento.

- A) Controle infectado que não recebeu tratamento.**
- B) Planta tratada com 100 ppm de Virazole.**
- C) Planta tratada com 200 ppm de Virazole.**
- D) Controle sadio.**

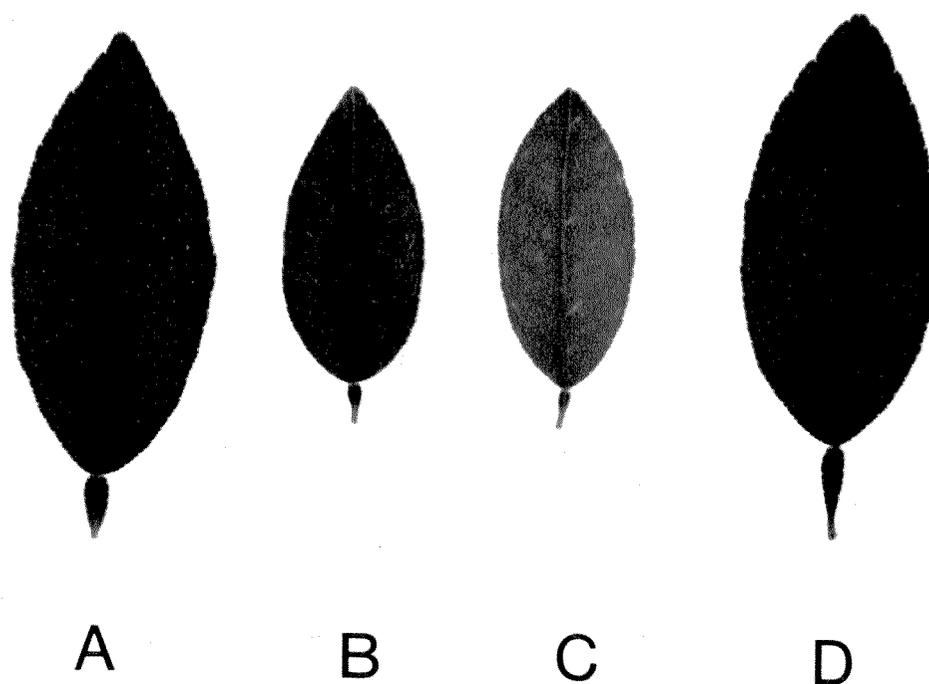


Fig. 15. Folhas de plantas de limão Galego infectadas com CTV. As folhas B e C apresentam-se menores em relação ao controle A e com sintomas de palidez das nervuras.

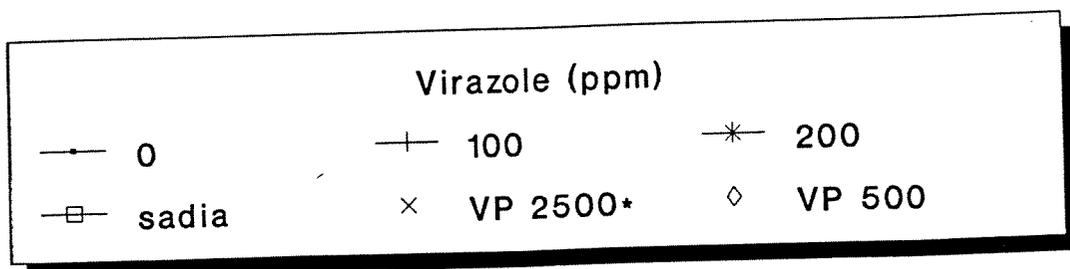
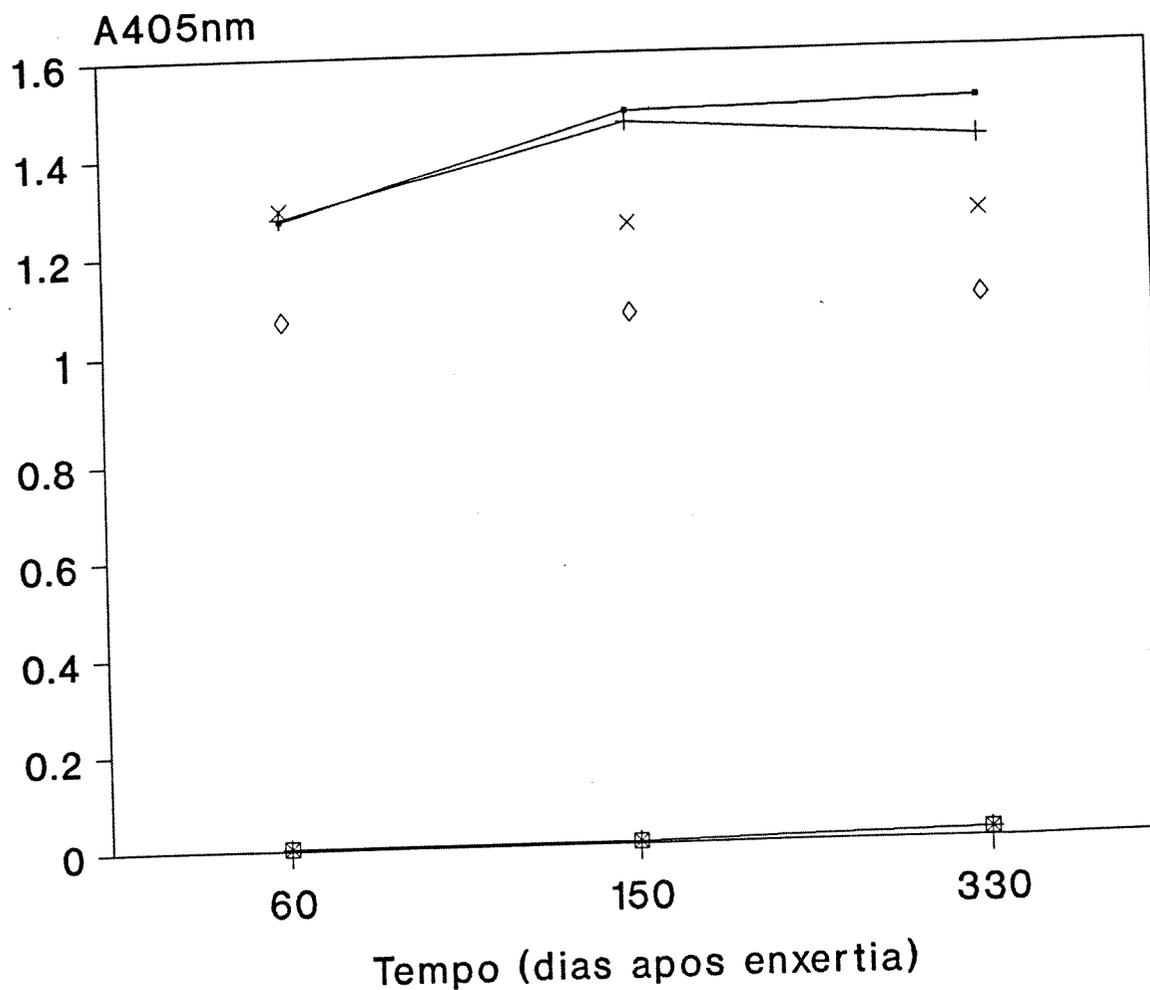
A) Controle sadio.

B) Controle infectado que não recebeu tratamento.

C) Tratamento com 100 ppm de Virazole.

D) Tratamento com 200 ppm de Virazole.

Fig.16. Efeito de diversas concentrações de Virazole no conteúdo de CTV em plantas infectadas avaliado por ELISA.



* VP= padrao de vírus purificado diluído 2.500 e 500 ng/ml.

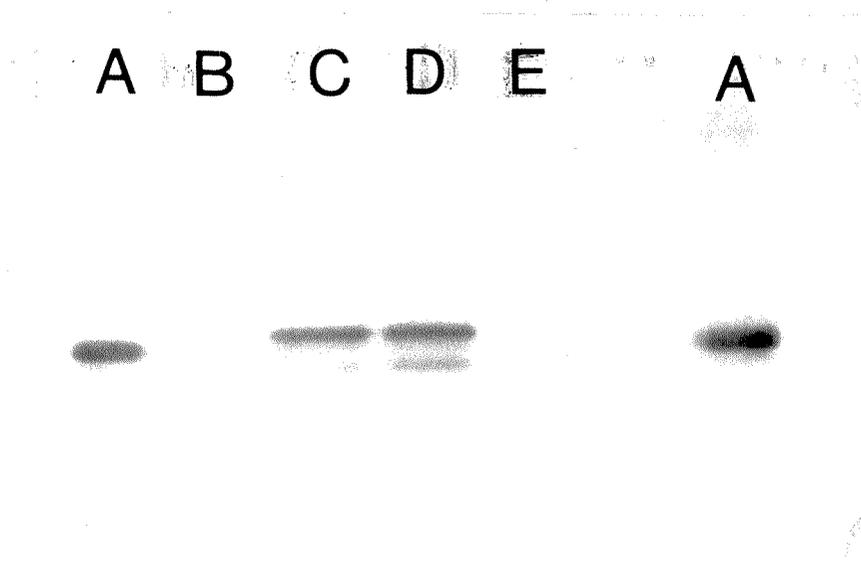


Fig. 17. Western blot da proteína do capsídeo de CTV. Ausência das bandas no controle sadio B e planta tratada com 200 ppm de Virazole E.

A) Vírus da tristeza purificado.

B) Limão Galego sadio.

C) Limão Galego infectado sem tratamento.

D) Limão Galego infectado tratado com 100 ppm de Virazole.

E) Limão Galego infectado tratado com 200 ppm de Virazole.

GREÑO *et al.* (1990) verificaram que a adição de químicos antivirais em meio de cultura afetou o desenvolvimento de explantes de citros. O efeito dependeu do antiviral, sua concentração e a espécie de planta usada como hospedeira. Virazole à 50 e 100 mg/l foi fitotóxico para todas as espécies estudadas. À concentração de 10 mg/l os explantes cresceram tão vigorosamente quanto os controles infectados sem tratamento e sadios. A indexação mostrou que somente Virazole teve algum efeito sobre o CTV. Foram obtidas algumas plantas livres de vírus, dependendo da variedade.

A diferença de resultados entre o trabalho de GREÑO *et al.*, (1990) e o nosso é provavelmente devido a variação metodológica, podendo ser uma indicação de diferenças nas estirpes de CTV utilizadas nos trabalhos.

Todos esses resultados são consistentes com a hipótese segundo a qual a atividade antiviral de Virazole resulta de sua ação sobre a multiplicação viral e não sobre a inativação do vírus presente. Isso implica que tratamentos longos são necessários para erradicar os vírus de tecidos uniformemente infectados, enquanto que um tratamento breve poderá bastar para obter brotos axilares isentos de vírus (SIMPKINS *et al.*, 1981).

A explicação acima pode também se dar para ausência de partículas de CTV em brotos adventícios de limão Galego retirados de estacas, que foram incubadas na presença de Virazole por um espaço de tempo relativamente curto. Nesse tipo de tratamento o Virazole pode ter bloqueado a replicação de CTV embora os vírus existentes possam permanecer na estaca original, os novos brotos desenvolvidos podem estar livres de vírus.

SHEPARD (1977) sugeriu uma explicação similar para o fato de que protoplastos de *N. tabacum* infectados com PVX e tratados com Virazole permaneceram infectados, enquanto que brotos embriogênicos diferenciados de protoplastos derivados de calos estavam livres de vírus.

No presente trabalho os dados sugerem também um efeito inibitório no movimento dos vírus para gemas axilares das quais os brotos são derivados.

CASSELLS & LONG (1980) sugeriram que as razões para que plantletes de *N. tabacum*, obtidos de brotos adventícios de cultura de pecíolos infectadas com PVY e CMV estavam sadios, é que o Virazole restringiu o movimento dos vírus para os brotos em desenvolvimento.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram claramente que o Virazole é um inibidor potencial importante da multiplicação de vírus na planta hospedeira. Sua eficiência como agente inibidor da multiplicação viral depende da sua concentração, da planta hospedeira, do tipo de célula ou tecido tratado, e do vírus que o infecta.

Pouco se conhece se o Virazole atua em vírus de planta com o mesmo mecanismo que atua em vírus animal. Seus modos de ação são aparentemente múltiplos, interferindo em numerosas vias metabólicas do vírus e da célula hospedeira, geralmente alterando o "pool" de nucleotídeos e inibindo a formação do "cap" de RNA mensageiros.

O Virazole inibiu efetivamente a multiplicação de 3 vírus diferentes (VEFV, VAP e CTV), pertencentes a dois diferentes grupos: Closterovírus (VEFV e CTV) e Tobravírus (VAP). Segundo GOSWANI *et al.* (1979), o Virazole apresenta um poderoso efeito inibidor sobre o "cap" do terminal 5' do RNA mensageiro viral sintetizado *in vitro*. Como o VAP e o CTV (e provavelmente o VEFV) possuem "cap" pode-se supor que o mesmo mecanismo de inibição pode ter ocorrido com esses dois vírus. Para o CTV pode ter ocorrido uma restrição do movimento dos vírus em tecidos jovens em desenvolvimento concomitante com a sua replicação inibida.

5. Conclusões.

1. O meio de cultura B (MS + AIA + 2,4-D + CIN) foi o mais indicado para indução de calos em videira, sob condições de escuro e temperatura ao redor de 24°C. O mesmo meio e condições de cultura foram eficientes para obtenção e cultivo de calos de fumo e *G. globosa*.

2. A utilização de calos infectados com vírus e tratados com Virazole *in vitro*, mostrou ser um modelo de estudo eficiente para avaliar o efeito desse composto quimioterápico sobre vírus de planta, permitindo acompanhar a evolução do conteúdo de vírus no transcurso de várias subculturas sucessivas.

3. O Virazole foi capaz de inibir a multiplicação de 3 diferentes vírus (VEFV, VAP e CTV), pertencentes a dois grupos distintos: Closterovírus (VEFV e CTV) e Tobravírus (VAP).

4. A concentração de Virazole que se mostrou mais eficiente para inibir a multiplicação do VEFV foi de 50 mg/l, porém, um longo período de incubação foi necessário para completa supressão dos vírus.

5. A eficiência do Virazole sobre a multiplicação do VAP foi dependente da concentração utilizada e da planta hospedeira. Em calos de fumo a concentração de 200 ppm foi eficaz para erradicar o vírus, enquanto que em *G. globosa* não foi efetivo em nenhuma das concentrações testadas. Possivelmente plantas de *G. globosa* apresentam vias metabólicas alternativas para a replicação do RNA viral, possibilitando a multiplicação do vírus ou o metabolismo do Virazole é diferente nessa espécie.

6. A eficiência do Virazole contra vírus de plantas foi dependente também do estágio de desenvolvimento dos tecidos tratados. O Virazole inibiu a multiplicação do VAP quando pedaços de folhas foram utilizados como explantes (Exp. 2), porém, ocorreu pouca ou nenhuma inibição quando células de calos não organizados foram tratados com Virazole (Exp. 1).

7. O tratamento de estacas de limoeiro Galego, infectados com CTV e tratados com 200 ppm de Virazole previniu completamente a manifestação de sintomas nas plantas obtidas de brotos axilares. Isso foi confirmado com testes ELISA e "Western- blot".

8. O Virazole é um quimioterápico eficiente para a obtenção de plantas livres de vírus, dependendo da espécie vegetal, do vírus envolvido e das condições de tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU HAIDAR, M. & HIRTH, L. 5' terminal structure of tobacco rattle virus RNA: Evidence for polarity of reconstitution. **Virology**, **76**: 173-185, 1977.
- BALAMARAN, K. & RAMAKRISHNAN, K. Strain variation and cross protection in citrus tristeza virus on acid lime. **In**: Proc. 8th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol. Univ. California Press, Riverside, 60-68, 1980.
- BAR. JOSEPH, M.; GARNSEY, S.M.; GONSALVES, D. The Closteroviruses: a distinct group of elongated plant viruses. **Adv. Virus Res.** **25**: 93-168, 1980.
- BAR-JOSEPH, M.; GARNSEY, S.M.; GONSALVES, D.; MOSCOVITZ, M.; PURCIFULL, D.E.; CLARK, M.F.; LOEBENSTEIN, G. The use of Enzyme-Liked Immunosorbent Assay for detection of citrus tristeza virus. **Phytopathology**, **69**: 190-194, 1979.
- BAR. JOSEPH, M.; GUMPF, D.J.; DODDS, J.A.; ROSNER, A.; GINZBERG, I. A simple purification method for citrus tristeza virus and estimation of its genome size. **Phytopathology**, **75**: 195-198, 1985.
- BAR. JOSEPH, M. & HULL, R. Purification and partial characterization of sugar beet yellows virus. **Virology**, **62**: 552-562, 1974.
- BAR. JOSEPH, M.; LOEBENSTEIN, G.; COHEN, J. Partial purification of viruslike particles associated with the citrus tristeza disease. **Phytopathology**, **60**: 75-78, 1970.
- BAR-JOSEPH, M.; LOEBENSTEIN, G.; COHEN, J. Further purification and characterization of threadlike particles associated with citrus tristeza disease. **Virology**, **50**: 821-828, 1972.

- BAR-JOSEPH, M.; LOEBENSTEIN, G.; COHEN, J. Comparison of particle characteristics and cytopathology of citrus tristeza virus with other morphologically similar viruses. **In: Proc. 7th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol.** Univ. California Press, Riverside, 39-46, 1976.
- BAR-JOSEPH, M.; MARCUS, R.; LEE, R.F. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. **Ann. Rev. Phytopathol.** **27**: 291-316, 1989.
- BARBA, M.; CUPIDI, A.; FAGGIOLI, F. *In vitro* culture of grapevine infected by closterovirus type III. **J. Phytopathol.** **126**: 225-230, 1989.
- BELLÉS, J.M.; HANSEN, A.J.; GRANELL, A.; CONEJERO, V. Antiviroid effects of ribavirin on citrus exocortis viroid infection in *Gynura aurantiaca* DC. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** **28**: 61-65, 1986.
- BILLIAU, A. & DE CLERQ, E. Editorial. **Antiviral Res.** **1**: 1-3, 1981.
- BITANCOURT, A.A. A doença dos citros no Vale do Paraíba. **O Biológico**, **60**: 268-269, 1940.
- BITTNER, H.; SCHENK, G.; SCHUSTER, G.; KLUGE, S. Elimination by chemotherapy of potato virus S from potato plants grow *in vitro*. **Potato Research**, **32**: 175-179, 1989.
- BOSCIA, D.; HU, J.S.; GONSALVES, D.; GOLINO, D. Characterization of grapevine leafroll associated closterovirus (GLRaV) serotype II and comparison with GLRaV serotype III. (Abst.). **Phytopathology**, **80**: 117, 1990.
- BOUBALS, D. Observations sur la non-transmission par graine de deux viroses chez la vigne (*Vitis vinifera* L.). **Ann. Amel. Plantes**, **19**: 213-219, 1969.
- BOVEY, R. Identification of viruses in clonally propagated plants having one or more viruses. **In: Proc. Int. Conf. on virus and vector on**

perennial hosts, with special Reference to **Vitis**. Davis, Univ. California, 223-227, 1965.

CALAVAN, E.C.; PRATT, R.M.; LEE, B.W.; HILL, J.P.; BLUE, R.L. Tristeza susceptibility of sweet orange on Troyer citrange rootstock. **In: Proc. 5th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol.** (W.C. PRICE, Ed.) Gainesville, Univ. Florida Press, 146-153, 1972.

CAMARGO. I.J.B.; KITAJIMA, E.W.; COSTA, A.S. Visualization of the pepper ringspot virus in tomato pollen. **Phytopath. Z.** 64: 282-285, 1969.

CAMBRA, M.; CAMARASA, E.; GORRIS, M.T.; GARNSEY, S.M.; CARBONELL, E. Comparison of different immunosorbent assays for citrus tristeza virus (CTV) using CTV-specific monoclonal and polyclonal antibodies. **In: Proc. 11th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol.** Univ. California Press, Riverside, 38-45, 1991.

CAMBRA, M.; MORENO, P.; NAVARRO, L. Detección rápida del virus de la tristeza de los cítricos (CTV), mediante la técnica inmunoenzimática ELISA sandwich. **Anales INIA Ser. Prot. Veg.** 12: 115-125, 1979.

CAMBRA. M.; SERRA, J.; VILLALBA, D. MORENO, P. Present situation of the citrus tristeza virus in the Valencian Community. **In: Proc. 10th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol.** Univ. California Press, Riverside, 1-7, 1988.

CASSELS, A.C. & LONG, R.D. The regeneration of virus - free plants from cucumber mosaic virus and potato virus Y infected tobacco explants cultured in the presence of Virazole. **Zeitschrift für Naturforschung,** 35c: 350-351, 1980.

CASTELLANO, M.A.; MARTELLI, G.P.; SAVINO, V. Virus - like particles and ultrastructural modifications in the phloem of leafroll - affected grapevines. **Vitis,** 22: 23-39, 1983.

- CHAGAS, C.M. & SILBERSCHMIDT, K.M. "Vírus da faixa amarela da alcachôfra". Ocorrência, transmissão mecânica e propriedades físicas. **Biológico. 38**: 35-41, 1972.
- CHAMBERLAIN, E.E.; OVER DE LINDEN, A.J.; BERRY SMITH, F. Virus diseases of grapevines in New Zealand. **N.Z.Jl. Agric. Res. 13**: 338-358, 1970.
- CONTI, M.; MILNE, R.G.; LUISONI, E.; BOCCARDO, G. A closterovirus from a stem - pitting - diseased grapevine. **Phytopathology, 70**: 394-399, 1980.
- COOPER, J.I. & MAYO, M.A. Some properties of the particles of three tobnavirus isolates. **J. Gen. Virol. 16**: 285-296, 1972.
- COSTA, A.S. & KITAJIMA, E.W. Transmissão do vírus do anel do pimentão através da semente do tomate. **Rev. Soc. Bras. Fitopatol. 2**: 25-32, 1968.
- COSTA, A.S.; KITAJIMA, E.W.; OLIVEIRA, A.R. Vírus do anel do pimentão: um integrante do grupo "rattle" do fumo (Dados não publicados).
- CUPERTINO, F.P.; DE SÁ, P.B.; KITAJIMA, E.W. Propriedades biológicas de um isolado do vírus do anel do pimentão causando faixa amarela em tomateiros no Distrito Federal. **Fitopatol. bras. 16**: 251-256, 1991.
- DAWSON, W.O. & LOZOYA - SALDANA, H. Examination of the mode of action of ribavirin against tobacco mosaic virus. **Intervirol, 22**: 77-84, 1984.
- DE FAZIO, G.; CANER, J.; VICENTE, M. Effect of Virazole (ribavirin) on tomato spotted wilt virus in two systemic hosts, tomato and tobacco. **Arch Virol. 63**: 305-309, 1980.

- DE FAZIO, G.; KUDAMATSU, M.; VICENTE, M. Virazole: Antiviral de comportamento hormonal em fumo. **Arq. Inst. Biol.** **51**: 27-34, 1984.
- DODDS, J.A. & BAR-JOSEPH, M. Double stranded RNA from plants infected with closteroviruses. **Phytopathology**, **73**: 419-423, 1983.
- DODDS, J.A.; JURUPAT, T.; LEE, J.G.; ROISTACHER, C.N. Effects of strain, host, time of harvest and virus concentration on double stranded RNA analysis of citrus tristeza virus. **Phytopathology**, **77**: 442-447, 1987.
- DODDS, J.A.; MORRIS, T.J.; JORDAN, R.L. Plant viral double-stranded RNA. **Ann. Rev. Phytopathol.** **22**: 151-168, 1984.
- ENGELBRECHT, D.J. & KASDORF, G.G.F. Ocorrence and transmission of grapevine virus A in South African grapevines. **S. Afr. J. Enol. Vitic.** **8**: 23-29, 1987.
- ERIKSSON, B.; HELGSTRAND, E.; JOHANSSON, N.G.; LARSSON, A.; MISIORNY, A.; NOREN, J.O.; PHILIPSON, L.; STERNBERG, K.; STENING, G.; STRIDH,S.; OBERG, B. Inhibition of influenza virus ribonucleic acid polymerase by ribavirin triphosphate. **Antimicrob. Agents Chemother.** **11**: 946-951, 1977.
- FAWCETT, H.S.& WALLACE, J.M. Evidence of the virus nature of citrus quick decline. **Calif. Citrogr.** **32**: 88-89, 1946.
- GARNSEY, S.M.; CHRISTIE, R.G.; DERRICK, K.S.; BAR-JOSEPH, M. Detection of citrus tristeza virus. II. Light and electron microscopy of inclusions and viral particles. **In**: Proc. 8th Conf. Intern. Organ Citrus Virol. Uni. California Press, Riverside, 9-15, 1980.
- GARNSEY, S.A.; GONSALVES, D.; PURICIFULL, D.E. Mechanical transmission of citrus tristeza virus. **Phytopathology**, **67**: 965-968, 1977.

- GARNSEY, S.M.; GONSALVES, D.; PURCIFULL, D.E. Rapid diagnosis of citrus tristeza virus infections by sodium dodecyl sulfate immunodiffusion procedures. **Phytopathology**, **69**: 88-95, 1979.
- GARNSEY, S.M.; GUMPF, D.J.; ROISTACHER, C.N.; CIVEROLO, E.L.; LEE, R.F.; YOKOMI, R.K. Toward a standardized evaluation of the biological properties of citrus tristeza virus. **Phytophylactica**. **19**: 151-157, 1987.
- GASPAR, J.O. Estudo ultraestrutural sobre a distribuição do vírus do anel do pimentão durante a microsporogênese de tomateiro infectado. Campinas, 49p. Tese de Mestrado em Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Campinas, 1980.
- GHABRIAL, S.A. & LISTER, R.M. Coat protein and symptom specification in tobacco rattle virus. **Virology**, **52**: 1-12, 1973.
- GOHEEN A.C. Grape leafroll. In: Frazier, N.W., Ed. **Virus diseases of small fruits and grapevines**. Berkeley, Univ. California, Div. Agric. Sci. 209-212, 1970.
- GOHEEN, A.C. Leafroll. In: PEARSON, R.C.; GOHEEN, A. (Eds.): Compendium of grape diseases, **52**. APS Press, St. Paul, 1988.
- GOHEEN, A.C.; HEWITT, W.R.; ALLEY, C.J. Studies of grape leafroll in California. **Am. J. Enol. Vitic.** **10**: 78-84, 1959.
- GONSALVES, D.; PURCIFULL, D.E.; GARNSEY, S.M. Purification and serology of citrus tristeza virus. **Phytopathology**, **68**: 553-559, 1978.
- GOSWAMI, B.B.; BOREK, E.; SHARMA, O.K.; FUJITAKI, J.; SMITH, R.A. The broad spectrum antiviral agent ribavirin inhibits capping of mRNA. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **89**: 830-836, 1979.

- GRANT, T.J.; COSTA, A.S.; MOREIRA, S. Tristeza disease of citrus in Brazil-other citrus diseases may be variations of more spectacular tristeza or quick decline. **Citrus leaves**, **31**: 8-10, 36-37, 1951.
- GREÑO, V.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.; DURÁN-VILA, N. Effect of antiviral chemicals on the development and virus content of citrus buds cultured *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, **45**: 75-87, 1990.
- GUERRI, J.; MORENO, P.; LEE, R.F. Identification of citrus tristeza virus strains by peptide maps of virion coat protein. (Abst). **Phytopathology**, **79**, 1990.
- GUGERLI, P.; BRUGGER, J.J.; BOVEY, R. L' enrroulement de la vigne: Mise en évidence de particules virales et développement d'une méthode immuno-enzymatique pour le diagnostic rapide. **Rev Suisse Viticult. Arboricult. Horticult.** **16**: 299-304, 1984.
- GUGERLI, P. & RAMEL, M.E. Grapevine leafroll associated virus II analyzed by monoclonal antibodies (Abst.). In: Proc. 11th meeting of the International Council for the study of viruses and virus diseases of the grapevine. Montreux, Switzerland, 23, 1993.
- GUGERLI, P.; ROSCIGLIONE, B.; BRUGGER, J.J.; BONNARD, S.; RAMEL, M.E.; TREMEA, F. Etiological studies and diagnosis of grapevine leafroll disease improved by monoclonal antibodies. In: A. Shots (Ed.) Monoclonal antibodies in agriculture. **Proc. Symposium "Perspectives for monoclonal Antibodies in agriculture"**, Wageningen, The Netherlands, **47**: 54-56, 1990.
- GUMPH, D.J.; BAR-JOSEPH, M.; DODDS, J.A. Purification of citrus tristeza virus (CTV) on sucrose- cesium sulphate cushion gradients and estimation of its genome size. (Abst). **Phytopathology**, **71**: 878, 1981.
- HANSEN, A.J. Antiviral chemicals for disease control. **Crit. Rev. Plant Sci.** **8**:45-88, 1989.

- HARRISON, B.D.; FINCH, J.T.; GIBBS, A.J.; HOLLINGS, M.; SHEPERD, R.J.; VALENTA, V.; WETTER, C. Sixteen groups of plant viruses. **Virology**, **45**: 356-363, 1971.
- HARRISON, B.D. & NIXON, H.L. Separation and properties of particles of tobacco rattle virus with different lengths. **J. Gen. Microbiol.** **21**: 569-576, 1959.
- HARRISON, B.D.; STEFANAC, Z.; ROBERTS, I.M. Role of mitochondria in the formation of X - bodies in cells of *Nicotiana clevelandii* infected by tobacco rattle virus. **J. Gen. Virol.** **6**: 127-130, 1970.
- HARRISON, B.D. & WOODS, R.D. Serotypes and particle dimensions of tobacco rattle viruses from Europe and America. **Virology**, **28**: 610-616, 1966
- HEWITT, W.B. Meladies à virus des vignes de California: caractéristiques, modos de propagation, identification et méthodes de lutte. **Bull. Off. Int. Vin.** **36**: 45-56, 1963.
- HU, J.S. & GONSALVES, D. Biochemical and serological characterization of closterovirus like - particles associated with grapevine leafroll disease (Abst.). **Phytopathology**, **78**: 1568, 1988.
- HU, J.S.; GONSALVES, D.; TELIZ, D. Characterization of closterovirus like particles associated with grapevine leafroll disease. **J. Phytopathol.** **128**: 1-14, 1990.
- HUGHES, W.A. & LISTER, C.A. Lime dieback in the Gold Coast, a virus disease of the lime, *Citrus aurantifolia* (Christmann) Swingle. **J. Hort. Sci.** **28**: 131-140, 1953.
- KITAJIMA, E.W. Morfologia das partículas do vírus do anel do pimentão e ultraestrutura dos tecidos infectados. Piracicaba, 54p. Tese de Doutorado em Agronomia. Universidade de São Paulo, 1967.

- KITAJIMA, E.W. & COSTA, A.S. Association of pepper ringspot virus (Brazilian tobacco rattle virus) and host cell mitochondria. **J. Gen. Virol.** **4**: 177-181, 1969.
- KITAJIMA, E.W.; OLIVEIRA, A.R.; COSTA, A.S. Morfologia das partículas do vírus do anel do pimentão. **Bragantia**, **28**: 1-22, 1969.
- KITAJIMA, E.W.; SILVA, D.M.; OLIVEIRA, A.R.; MULLER, G.W.; COSTA, A.S. Threadlike particles associated with tristeza disease of citrus. **Nature**. **201**: 1011-1012, 1963.
- KLUGE, S. & MARCINKA, K. The effects of polyacrylic acid and Virazole on the replication and component formation of red clover mottle virus. **Acta virol.** **23**: 148-152, 1979.
- KUMMERT, J. & TOUSSAINT, A. Utilisation du Virazole pour l' assainissement des plantes par culture *in vitro*. **Parasitica**, **40** (2-3): 121-137, 1984.
- KUNIYUKI, H. Estudos sobre a virose enrolamento da folha da videira no Estado de São Paulo. Piracicaba, 74p. Tese de mestrado em Fitopatologia. Universidade de São Paulo, 1978.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. **Nature**, **227**: 680-685, 1970.
- LEARCH, B. Inhibition of the biosynthesis of potato virus X by ribavirin. **Phytopathol. Z.** **89**: 44-49, 1977.
- LEARCH, B. On the inhibition of plant virus multiplication by ribavirin. **Antiviral Res.** **7**: 257-270, 1987.
- LEE, R.F. & CALVERT, L.A. Polypeptide mapping of citrus tristeza virus strains. **Phytophylactica**, **19**: 205-210, 1987.

- LEE, R.F.; CALVERT, L.A.; NAGEL, J.; HUBBARD, J.D. Citrus tristeza virus: Characterization of coat proteins. **Phytopathology**, 78: 1221-1226, 1988.
- LEE, R.F.; GARNSEY, S.M.; BRLANSKY, R.H.; GOHEEN, A.C. A purification procedure for enhancement of citrus tristeza virus yields and its application to other phloem viruses. **Phytopathology**, 77: 543-549, 1987.
- LEE, R.F.; TIMMER, L.W.; PURCIFULL, D.E.; GARNSEY, S.M. Comparison of radioimmunosorbent assay and enzyme linked immunosorbent assay for detection of rickettsialike bacteria and citrus tristeza virus (Abst.). **Phytopathology**, 889, 1981.
- LIMA, M.L.R.Z.C.; LIMA NETO, V.C.; SOUZA, V.B.V. Ocorrência e transmissão do vírus do anel do pimentão. **Rev. Setor Ciências Agrárias, UFPR**, 5: 91-93, 1983.
- LOZOYA - SALDANA, H.; DAWSON, M.O.; MURASHIGE, T. Effects of ribavirin and adenine arabinoside on tobacco mosaic virus in *Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi tissue cultures. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, 3: 41-48, 1984.
- MATHEUS, R.E.F. & SMITH, J.D. Chemotherapy of viruses. **Adv. Virus Res.** 3: 49-148, 1955.
- MAYO, M.A. & ROBINSON, D.J. Revision of estimates of the molecular weights of tobnavirus coat proteins. **Intervirology**, 5: 313-321, 1975.
- MENEGHINI, M. Sobre a natureza e transmissibilidade da doença "tristeza" dos citros. **O Biológico**, 12: 285-287, 1946.
- MIKI, T. & OKADA, Y. Comparative studies on some strains of tobacco rattle virus. **Virology**, 42: 993-998, 1970.

- MILLER, J.P.; KIGWANA, L.J.; STREETER, D.G.; ROBINS, R.K.; SIMON, L.N.; ROBOZ, J. The relationship between the metabolism of ribavirin and its proposed mechanism of action. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** **284**: 211-229, 1977.
- MILNE, R.G.; CONTI, M.; LESEMANN, D.E.; STELLMACHT, G.; TANNE, E.; COHEN, J. Closterovirus -like particles of two types associated with diseased grapevines. **Phytopathol. Z.** **110**: 360-368, 1984.
- MINSON, A.C. & DARBY, G. A study of sequence homology between tobacco rattle virus ribonucleic acids. **J. Gen. Virol.** **19**: 253-262, 1973.
- MOSSOP, D.W.; ELLIOT, D.R.; RICHARDS, D.K. Association of closterovirus-like particles and high molecular weight double - stranded RNA with grapevines affected by leafroll disease. **J. Agric. Res.** **28**: 419-425, 1985.
- MOWAT, W.P. & DAWSON, S. Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. **J. Virol. Methods**, **15**: 233-247, 1987.
- MULLER, G.W. & COSTA, A.S. Doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros. In: ROSSETTI, V.; MULLER, G.W.; COSTA, A.S. (Eds.). Doenças dos citros causadas por algas, fungos, bactérias e vírus. Fundação Cargill, 55-84, 1993.
- MULLER, G.W.; COSTA, A.S.; KITAJIMA, E.W.; CAMARGO, I.J.B. Additional evidence that tristeza virus multiplies in *Passiflora species*. In: Proc. 6th Conf. Intern. Organ Citrus Virol. Univ. California Press, Riverside, 75-78, 1974.
- MULLER, G.W. & GARNSEY, S.M. Susceptibility of citrus varieties, species, citrus relatives and non-rutaceous plants to slash-cut mechanical inoculation with citrus tristeza virus. In: Proc. 9th Conf. Intern. Organ Citrus Virol. Univ. California Press, Riverside, 33-40, 1984.

- MURASHIGE, J. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** **15**: 473-497, 1962.
- NAGEL, J.; HIRBERT, E.; LEE, R.F. Citrus tristeza virus RNA translated with a rabbit reticulocyte lysate: capsid protein identified as one of the products. (Abst.). **Phytopathology**, **72**: 953, 1982.
- NAMBA, S.; YAMASHITA, S.; DOI, Y.; YORA, K.; TERAI, Y.; YANO, R. Grapevine leafroll virus, a possible member of closteroviruses. **Ann. Phytopathol. Soc. Japan**, **45**: 497-502, 1979.
- NAVARRO, L.; ROISTACHER, C.N.; MURASHIGE, T. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus - free citrus. **J. Amer. Soc. Hortic. Sci.** **100**: 471-479, 1975.
- OBERHOLZER, P.C.J.; MATHEWS, I.; STILMIE, S.F. **The decline of grapefruit trees in South Africa.** A preliminary report on so-called "stem-pitting". **Sci. Bull. Dep. Agric. S. Afr.** 287, 17p, 1949.
- OLIVEIRA, A.R. Serologia com o vírus da tristeza dos citros (Resumo). **Ciência e Cultura**, **16**: 146, 1964.
- OLIVEIRA, A.R. Serologia aplicada ao vírus do anel do pimentão. Piracicaba, 40p. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, 1967.
- OLIVEIRA, A.R.; MULLER, G.W.; COSTA, A.S. Serology of citrus tristeza virus (Abst.). **In**: 5th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol. Japan, 66, 1969.
- PELHAM, H.R.B. Translation of tobacco rattle virus RNAs *in vitro*: Four proteins from three RNAs. **Virology**, **97**: 256-265, 1979.
- PRICE, W.C. Flexuous rods in phloem infected cells of lime plants infected with citrus tristeza virus. **Virology**, **29**: 285-294, 1966.

- PRICE, W.C. Review of research on mechanical transmission, purification and morphology of citrus viruses. **In:** J.F.L. Childs, (Ed.). Proc. 4th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol, Univ. Florida Press, Gainesville, 248-255, 1968.
- PRUSINER, P. & SUNDARALINGAM, M. A new class of synthetic nucleoside analogue with broad spectrum antiviral properties. **Nature**, **244**:116-118, 1973.
- ROISTACHER, C.N. & BAR-JOSEPH, M. Transmission of citrus tristeza virus (CTV) by *Aphis gossypii* and by graft inoculation to and from Passiflora species. **Phytophylactica**, **19**: 178-182, 1987.
- ROSCIGLIONE, B. & GUGERLI, P. Meladie de l'enroulement et du bois strié de la vigne: analyse microscopique et sérologique. **Rev. Suisse Viticult. Arboricult. Hortic.** **18**: 207-211, 1986.
- ROSCIGLIONE, B. & GUGERLI, P. Transmission of grapevine leafroll disease and an associated closterovirus to healthy grapevine by the mealybug, *Planacoccus ficus* Signoret. **In:** Proc. 9th meeting ICVG, Kiryat Anavin, Israel, 67-69, 1989.
- ROSNER, A. & BAR-JOSEPH, M. Diversity of citrus tristeza virus strains indicated by hibridization with cloned e DNA sequences. **Virology**, **139**: 189-193, 1984.
- ROSNER, A.; GINZBURG, I.; BAR-JOSEPH, M. Molecular cloning of complementary DNA sequences of citrus tristeza virus RNA. **J. Gen. Virol.** **64**: 1757-1763, 1983.
- ROSNER, A.; LEE, R.F.; BAR-JOSEPH, M. Differential hibridization with cloned cDNA sequences for detecting a specific isolate of citrus tristeza virus. **Phytopathology**, **76**: 820-824, 1986.

- SALOMÃO, T.A.; SILBERSCHMIDT, K.M.; WEIGL, D.R. Transmissão da doença "faixa amarela brasileira do tomateiro " pelo solo. **Biológico**. **35**: 79-84, 1969.
- SCHEU, G. Mein winzerbuch. Reichsnahrstand - Verlags. GmbH, Berlin, 1936.
- SCHUSTER, G. On some interactions of 1- β -D ribofuranosyl -1,2,4 - triazole-3 - carboxamide (Virazole) and plant hormones in virus - infected plants. **Phytopathol. Z.** **94**: 72-79, 1979.
- SCHUSTER, G. New results and trends of the development and application of synthetic antiphytoviral substances. (Abstr.). **Leipziger Biotechnologiesymposium** 87-88, 1984.
- SCHUSTER, G. Synthetic antiphytoviral substances. **Appl. Virol. Res.** **1**: 265-284, 1988.
- SCHUSTER, G. & HUBER, S. Evidence for de inhibition of potato virus X replication at two stages dependent on the concentration of ribavirin, 5 - azadihydro-uracil as well as 1,5-diacetyl-5- azadihydrouracil. **Biochem. Physiol. Pflanz.** **187**: 429-438, 1991.
- SHEPARD, J.F. Regeneration of plants from protoplasts of potato virus X infected tobacco leaves. II. Influence of Virazole on the frequency of infection. **Virology**, **78**: 261-266, 1977.
- SIDWELL, R.W.; HUFFMAN, J.H.; KHARE, G.P.; ALLEN, L.B.; WITKOWSKI, J.T.; ROBINS, R.K. Broad spectrum antiviral activity of Virazole: 1-b-D- ribofuranosyl -1,2,4 - triazole-3- carboxamide. **Science**, **177**: 705-706, 1972.
- SILBERSCHMIDT, K.M. Studies on a Brazilian tomato ringspot disease. **Phytopath. Z.** **46**: 209-229, 1963.

- SILVA, D.M. Estudos sobre purificação. Composição e algumas propriedades do vírus do anel do pimentão. Piracicaba, 106p. Tese de Livre-Docência. Universidade de São Paulo, 1965.
- SILVA, D.M.; OLIVEIRA, A.R.; KITAJIMA, E.W. Partial purification of tristeza virus. **In:** W.C. PRICE, (Ed.), Proc. 3th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol. Univ. Florida Press, Gainesville, 10-13, 1965.
- SIMPKINS, I.; WALKLEY, D.G.A.; NEELY, H.A. Chemical supression of viruses, in cultured plant tissues. **Ann. Appl. Biol.** **99**: 161-169, 1981.
- SMITH, R.A. Mechanisms of action of ribavirin. **In:** "Ribavirin: a broad spectrum antiviral agent" (R.A. SMITH & W. KIRKIPATRICK Eds.). Academic Press, New York, pp. 99-118, 1980.
- SPIEGEL, S.; FRISON, E.A.; CONVERSE, R.H. Recent Developments in Virus - Detection Produces for Internacional Movement of Clonal Plant Germ Plasm. **Plant Disease.** **77**(12): 1176-1180, 1993.
- STEVENSON, J.H. & MONETTE, P.L. Delay of onset of leafroll sympton expression in *Vitis vinifera* "Liemberger" from ribavirin treated *in vitro* cultures. **Can. J. Plant Sci.** **63**: 557-560, 1983.
- STREETER, D.G.; WITKOWSKI, J.T.; KHARE, G.P.; SIDWELL, R.W.; BAUER, R.J.; ROBINS, R.K.; SIMON, L.N. Mechanism of action of 1- β -D- ribofuranosyl -1,2,4 - triazole-3- carboxamide (Virazole), a new broad spectrum antiviral agent. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, **70**:1174-1178, 1973.
- TANNE, E.; BEN-DOV, Y.; RACCAH, B. Transmission of closterovirus - like particles associated with grapevine leafroll by mealybugs(Pseudococcidae) in Israel (Abst.). **Proc 9th meeting ICVG**, Kiryat Anavim,Israel, **71**: 73, 1989.
- TANNE, E.; SELA, I.; KLEIN, M.; HARPAZ, I. Purification and characterization of a virus associated with the grapevine leafroll disease. **Phytopathology**, **67**: 442-447, 1977.

- TSUCHIZAKI, T.; SASAKI, A.; SAITO, Y. Purification of citrus tristeza virus from diseased citrus fruits and the detection of the virus in the citrus tissues by fluorescent antibody techniques. **Phytopathology**, **68**: 139-142, 1978.
- VEGA, J.; GASPAR, J.O.; MULLER, G.W. Utilização da microscopia eletrônica imuno específica na detecção do vírus da tristeza do citros em São Paulo. XV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, São Paulo, SP. (Resumo). **Fitopatologia Brasileira**, **7**: 548, 1982.
- VELA, C.; CAMBRA, M.; CORTES, E.; MORENO, P.; MIGUET, J.G.; PEREZ DE SAN ROMAN, C.; SANZ, A. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for citrus tristeza virus and their use for diagnoses. **J. Gen. Virol.** **67**: 91-96, 1986.
- VICENTE, M. & DE FAZIO, G. Quimioterapia de fitoviroses. **In**: Proc. 1th Intern. Conf. on the Impact of Viral Diseases on the Development of Latin American Countries and the Caribbean Region, **1**:298-307, 1982.
- VICENTE, M. & DE FAZIO, G. Perspectivas em quimioterapia de vírus de plantas. **Fitopatol. bras.** **12** (1):21-26, 1987.
- WALLACE, J.M. Tristeza and seedling yellows. **In**: Indexing procedures for 15 virus diseases of citrus trees. Agriculture Handbook 333, USDA, 1968.
- WALLACE, J.M. Virus and virus-like diseases. **In**: REUTHER, W.; CALAVAN, E.C.; CARMAN, G.E. (Eds.). The Citrus Industry, 4th vol. Univ. Calif. Div. Agr. Sci. Riverside, 67-184, 1978.
- WALTER, B. & ZIMMERMANN, D. Further characterization of closterovirus - like particles associated with the grapevine leafroll disease. **In**: Proc. 10th meeting of the International Council for the study of viruses and virus diseases of the grapevine . Volos, Greece, 62-66, 1990.

- WITKOWSKI, J.T.; ROBINS, R.K.; SIDWELL, R.W.; SIMON, L.M. The design, synthesis and broad spectrum antiviral activity of 1-b-D-ribofuranosyl -1,2,4 - triazole-3- carboxamide and related nucleosides. **J. Med. Chem.** **15**:1150-1154, 1972.
- WOODHAN R.C.; KRAKE, L.R. Investigations on transmission of grapevine leafroll, yellow speckle and fleck diseases by dodder. **J. Phytopathol.** **106**: 193-198, 1983.
- ZEE, F.; GONSALVES, D.; GOHEEN, A.; KIM, K.S.; POOL, R.; LEE, R.F. Cytopathology of leafroll - diseased grapevines and the purification and serology of associated closteroviruslike particles. **Phytopathology**, **77**: 1427-1437, 1987.
- ZEINEH, R.A.; KYRIAKIDS, G.; ACEY, R.; SMITH, C. Detection and assessment of citrus tristeza virus antigens by computer-aided scanning densitometry. **Appl. Biochem. Biotechnol.** **13**: 119-125, 1986.
- ZEMAN, V. Una enfermedad nueva in los naranjales de Corrientes. **Physis**, **19**: 410-411, 1930.
- ZHANAQ, D.; WENCAI, Z.; SHUYAN, W. *In vitro* mutation breeding for salinity tolerance in citrus mutation. **Breeding Newsletter**, **33**: 12-14, 1989.
- ZIMMERMANN, D.; BASS, P.; LEGIN, R.; WALTER, B. Characterization and serological detection of four closterovirus - like particles associated with leafroll disease on grapevine. **J. Phytopathol.** **130**: 205-218, 1990.
- ZIMMERMANN, T.P. & DEEPROSE, R.D. Metabolism of 5' amino -1-b-D-ribofuranosyl - imidazole-4- carboxamide and related five membered heterocycles to 5 - triphosphates in human blood and L 5178 cells. **Biochem. Pharmacol.** **27**: 709-716, 1978.

ZIMMERMANN, D.; WALTER, B.; LE GALL , O. Purification de particules virales associés à l'enroulement de la vigne et mise au point d'un protocole ELISA permettant leur détection. **Agronomie**, **8**: 731-741, 1988.