

ANTONIA DOS REIS FIGUEIRA

DETECÇÃO E INVESTIGAÇÃO DE ALGUMAS PROPRIE-
DADES DE DOIS INIBIDORES DE FITOVÍRUS

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia na Universidade Estadual
de Campinas para a obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Orientador: Álvaro Santos Costa

CAMPINAS

1983

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Ao meu esposo *José Roberto*

Aos meus filhos *Mariane e Lucas*

pela força propulsora do amor, que movimentou o meu barco além da
mediocridade

DEDICO

AO MESTRE

Álvaro Santos Costa

COM CARINHO

a minha homenagem

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. Álvaro Santos Costa, pela orientação durante todo esse trabalho e pelo exemplo de disciplina e dedicação à sua profissão
- Ao Eng^o Agr^o Jorge Vega, pela orientação e colaboração nos testes de microscopia eletrônica
- Ao Prof. Dr. Ladislav Sodeck, pela orientação e colaboração na purificação do inibidor
- Ao Prof. Dr. Luiz Henrique de Aquino e Prof. Ruben K. Veiga, pela colaboração no setor de estatística
- Ao Departamento de estatística da UNICAMP, pela colaboração
- Ao Edmundo A. Reis, Maria Celeste D. Reis e Carlos H. Reis, pelo apoio e colaboração na confecção deste trabalho
- Ao José Roberto pela colaboração e apoio constante
- Ao Eng^o Agr^o Hermes M. Souza, pela orientação na classificação e denominação vulgar das plantas ornamentais utilizadas
- Ao Prof. Dr. Avelino R. Oliveira pelo inestimável apoio e incentivo - em todas as fases deste trabalho
- À Seção de Virologia do IAC pelo apoio e colaboração
- À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo, pela cessão de bolsa de estudos durante dois anos
- À Escola Superior de Agricultura de Lavras, especialmente aos Srs. diretor e vice-diretor Prof. João Marcio de Carvalho Rios e Fernando Costa Santa Cecília pela ajuda pessoal e financeira
- À FAEPE, pela ajuda financeira
- Ao Alberto Magno de Souza pelo apoio e colaboração

- Ao Romário A. Melo e Tereza Cristina Cavalcanti, pelo apoio e incentivo prestados
- À Orniex e Usafarma pela cessão de substâncias utilizadas durante o trabalho
- A tantas outras pessoas que de um ou outro modo, prestaram valiosa colaboração, tornando possível a realização deste trabalho.

DETECCÃO E INVESTIGAÇÃO DE ALGUMAS PROPRIEDADES DE DOIS INIBIDORES DE
FITOVÍRUS

I N D I C E

	pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Inibidores de plantas superiores	4
2.2. Substâncias químicas em geral	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Substâncias e vírus testados	13
3.2. Plantas-teste	15
3.3. Aplicação das substâncias inibidoras	16
3.4. Métodos de inoculação	18
3.5. Avaliação da atividade inibidora	18
3.6. Tentativas iniciais de purificação do inibidor de <i>T. ulmi-</i> <i>folia</i>	19
3.7. Testes realizados com o inibidor purificado (fração b) ...	22
3.8. Microscopia eletrônica imuno-específica do TMV tratado com os inibidores	24
4. RESULTADOS EXPERIMENTAIS.....	26
4.1. Triagem de diferentes substâncias como possíveis inibi- das da transmissão mecânica do vírus do mosaico do mamoeiro	26
4.1.1. Sucos de plantas	

4.1.2. Substâncias químicas de diferentes grupos	28
4.1.3. Detergentes	28
4.2. Efeito de vários detergentes e do suco de <i>Turnera ulmifolia</i> sobre a transmissão mecânica do TMV	31
4.3. Resultados dos testes realizados com o suco de <i>T. ulmifolia</i> e com o detergente comercial ODD	33
4.3.1. Determinação do efeito inibidor exercido sobre diferentes vírus	33
4.3.2. Aplicação dos inibidores misturados com o inóculo - ou após a inoculação mecânica	35
4.3.3. Aplicação prévia dos inibidores em plantas de fumo e mamão e inoculação do vírus após vários intervalos de tempo	35
4.3.4. Aplicação dos inibidores na face inferior das folhas e inoculação na face superior	38
4.3.5. Efeito de diferentes concentrações dos inibidores - sobre a infetividade do TMV a uma concentração constante	38
4.3.6. Efeito de uma concentração constante dos inibidores sobre a infetividade do TMV em diferentes concentrações	38
4.3.7. Ação sobre a ultra estrutura da partícula do TMV ..	43
4.3.8. Influência do inibidor sobre a reação serológica entre a partícula do TMV e o antissoro	52
4.3.9. Efeito sobre a disseminação do VMM através do vetor	56
4.3.10. Redução na disseminação mecânica do TMV em operações de transplante de fumo e tomate	56
4.4. Resultados das tentativas iniciais de purificação do inibidor de <i>T. ulmifolia</i>	60
4.5. Tratamentos realizados com a fração b contendo o inibidor purificado	62

4.5.1. Tratamento enzimático, com TNBS, EDTA e concentração a vácuo	62
4.5.2. Dosagem de proteínas e carboidratos	62
4.5.3. Atividade de RNase	62
4.5.4. Estabilidade em relação à temperatura	64
5. DISCUSSÃO	66
6. CONCLUSÕES	74
7. RESUMO	76
8. SUMMARY	79
9. ABREVIATURAS	81
10. LITERATURA CITADA	82

1. INTRODUÇÃO

A possibilidade de encontrar substâncias capazes de inibir a infecção ou replicação viral quando aplicadas às plantas, à maneira de outros defensivos (fungicidas, bactericidas, etc.), sempre se mostrou bastante atraente para os fitovirologistas. Substâncias dessa natureza poderiam ter grande valor protetivo ou mesmo até curativo e eliminariam perdas causadas por fitoviroses mesmo sob condições de grande pressão de inóculo.

O objetivo deste trabalho foi o de procurar inibidores virais entre sucos de diversas espécies de plantas e entre algumas substâncias químicas e investigar alguns aspectos a eles relacionados, considerando também a possibilidade de poderem ser empregados no controle de viroses que tem sua epidemiologia associada à transmissão mecânica e através do vetor em plantações comerciais.

Dentre as substâncias testadas e que apresentaram ação inibidora foi selecionado um detergente comercial empregado na limpeza doméstica (ODD), cujo princípio ativo pertence ao grupo dos alquilbenzenosulfonatos; entre as plantas experimentadas foi determinado haver forte ação inibidora no suco de uma planta da família *Turneraceae*, a *Turnera ulmifolia* L. variedade *cuneiformis* Urb, cujo inibidor ainda não havia sido descrito na literatura. Essa planta, chamada pelos técnicos em floricultura do Instituto Agrônomo de Campinas de Flor do Guarujá, é

subarbustiva e perene, normalmente vegeta na região centro-sul do Brasil e floresce durante todo o ano, característica que a faz ser muito - indicada para ornamentação de jardins.

Neste trabalho são apresentados os dados obtidos em diversos experimentos onde se procurou caracterizar o inibidor existente no suco foliar da referida planta e investigar alguns parâmetros deste e do ODD como por exemplo: mecanismo de ação, efeito na dissemina - ção de vírus que têm a sua epidemiologia associada principalmente à transmissão mecânica, como o vírus do mosaico comum do fumo e do tomate causados por isolados do mesmo vírus o "tobacco mosaic virus" (TMV) e na associada à transmissão de vírus através do vetor, como o vírus - do mosaico do mamoeiro ("papaya ringspot virus").

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os primeiros trabalhos descrevendo a existência de inibidores de vírus datam das primeiras décadas do século XX. Esses primeiros inibidores foram detectados em sucos de plantas de *Phytolacca decandra* L., dificultando a transmissão mecânica do vírus do mosaico desta para plantas de fumo (ALLARD, 1918). Desde então muitos outros trabalhos têm sido publicados. Além das inúmeras espécies de plantas contendo inibidores, existem outras substâncias com tais propriedades, das mais diferentes origens e naturezas: produtos de crescimento de fungos (JOHNSON e HOGGAN, 1937; GUPTA e PRICE, 1950; SLAGLE *et al.*, 1952, etc.), sucos de insetos (BLACK, 1939; FRITZCHE, 1970) e substâncias biológicas de outras origens como antibióticos (SCHLEGEL e RAWLINS, 1954; HIRAL e SHIMOMURA, 1960, etc.), leite (HARE e LUCAS, 1959; HEIN, 1964; JAEGER, 1966, etc.) e algas marinhas (GRASSO e ROSA, 1979), etc., diferentes substâncias químicas como análogos das purinas e pirimidinas (COMMONER e MERCER, 1951), drogas medicinais (ABIDI *et al.*, 1977), e muitas outras.

Considerando o modo de ação dos inibidores BAWDEN (1954) dividiu estes em duas categorias: inibidores de infecção e inibidores de replicação. São considerados inibidores de infecção as substâncias que impedem ou dificultam a interação inicial vírus-planta, e geralmente são eficientes somente quando aplicados antes ou pouco tempo depois da inoculação. Os inibidores de replicação são capazes de atuar após a partícula

viral ter convertido um sítio infectivo em um centro de infecção e, são eficientes quando aplicados antes, inibindo o processo de infecção, e quando aplicados após a inoculação, estando já a planta mostrando os sintomas da doença (LOEBENSTEIN, 1972).

2.1. Inibidores de plantas superiores

Dentre as numerosas espécies de plantas que possuem inibidores de fitovírus, alguns grupos taxonômicos se sobressaem. Tal é o caso das Chenopodiaceae, Amaranthaceae e Basellaceae (GRASSO e SHEPHERD, 1977). Os inibidores de plantas geralmente são inibidores de infecção não tendo sido descrito até o momento nenhum inibidor capaz de interferir na replicação viral. Outra característica desses inibidores, é a de não serem ativos na inibição de infecção viral em espécies das quais se originam ou mesmo em espécies estreitamente relacionadas, o que alguns autores interpretam como sendo devido ao fato de sua ação ser exercida sobre o hospedeiro e não sobre o vírus (GLENDRON e KASSANIS, 1954).

KUNTZ e WALKER (1947) observaram que havia um componente em extrato de folhas de espinafre capaz de inibir a infecção do vírus A do repolho em *Nicotiana glutinosa*, mas não de TMV na mesma hospedeira. Isso os levou a concluir que o inibidor exercia seu efeito sobre o vírus e não sobre a hospedeira.

RAGETLI (1957), trabalhando com o suco de cravo (*Dianthus caryophyllus*), postulou a hipótese de que o inibidor poderia agir por bloqueio dos sítios receptores do vírus existentes na folha. Alguns anos depois, VAN KAMMEN *et al* (1961) estudando o mesmo inibidor obtiveram dados que os levaram a reforçar esta hipótese, sugerindo que a ação do inibidor poderia ser explicada pela existência de uma competição entre este e o vírus por receptores do hospedeiro. Não arriscou, entretanto, nenhuma consideração sobre a natureza desses receptores.

Outros autores como MAYHEN e FORD (1971), estudando o efeito do extrato foliar de *Physarum polycephalum* sobre a infetividade do TMV, encontraram resultados favoráveis à hipótese de que o inibidor exerceria sua ação sobre a partícula do vírus em si, por um processo de recobrimento e agregação das mesmas. Isto poderia impedir as partículas de penetrar nas células do hospedeiro, ou por outro lado, essa "capa" formada pelo inibidor poderia não se dissolver, evitando a liberação do ácido nucleico para que se efetuasse o processo de replicação no interior das células vegetais.

MORAES (1973) observou partículas de TMV tratadas com inibidor extraído de *Abutilon striatum* Dicks ao microscópio eletrônico e verificou que estas mostraram-se alteradas quanto ao seu contorno, perdendo o caráter retilíneo e tornando-se irregulares com aumento de diâmetro.

VICENTE *et al.* (1977), estudando o mecanismo de inibição do extrato foliar de *Chenopodium amaranticolor*, concluíram que o inibidor age sobre o hospedeiro, e que essa ação seria puramente local e física por meio do bloqueio nos pontos de entrada do vírus na célula; ou por combinação do inibidor com constituintes especiais da célula ou ainda com substâncias necessárias à replicação do vírus.

VERMA *et al* (1979) encontraram inibidores virais no extrato foliar de 17 espécies de plantas medicinais. Eles observaram que os inibidores foram ativos somente quando aplicados antes e não após a inoculação mecânica do TMV, e sugeriram que o tratamento prévio das plantas testadas com os extratos inibidores altera a sua fisiologia e as tornam menos suscetíveis ao vírus. Outra observação feita por esses autores foi a de que os inibidores não são específicos para o vírus, nem para a hospedeira, e de que havia uma certa analogia entre a interferência induzida por estes e por polianions (STEIN e LOEBENSTEIN, 1972), RNA de leveduras (GIECHERMAN e LOEBENSTEIN, 1968), e poli I e poli C (STEIN e LOEBENSTEIN, 1970).

NORONHA *et al.* (1980) detectou a ocorrência de inibidores em extratos foliares de *Alternanthera ficoidea*, *Amaranthus deflexus*, *Bougainvillea spectabilis*, *Chenopodium ambrosioides* e *Mirabilis jalapa*. Eles determinaram que estes sucos, misturados com TMV, inibem sua transmissão mecânica para plantas de fumo, mas nada disseram sobre seu mecanismo de ação.

Pelos diferentes resultados, pode-se observar que em alguns casos a indicação é a de que a ação dos inibidores virais existentes no suco de plantas superiores agem sobre o hospedeiro, enquanto que em outros, esta ação parece ser sobre o vírus.

Quanto à natureza química das substâncias responsáveis pelo efeito inibidor, diferentes tipos têm sido detectados, como polipeptídeos, polisacarídeos e flavonas.

KASSANIS e KLECZKOWSKI (1948) foram os primeiros a isolar o inibidor do extrato foliar de *Phytolacca esculenta* e obter dados que sugeriram ser ele uma glicoproteína. Posteriormente, RAGETLI e WEINTRAUB (1962a e 1962b) isolaram de *Dianthus caryophyllus* uma proteína cujo ε-amino grupo seria responsável pela atividade inibidora. WYATT e SHEPHERD (1969) purificaram de *Phytolacca americana* uma proteína de peso molecular 29.000 daltons. Alguns anos depois, IRVIN *et al.* (1980) purificaram uma segunda proteína desta planta, de peso molecular ligeiramente maior, sendo ambas eficientes inibidoras da transmissão mecânica do TMV. Outros inibidores de Chenopodiales (*C. album* e *C. quinoa*) foram purificados e caracterizados como proteína de peso molecular entre 25.000 e 38.000 daltons (SMOOKLER, 1971).

GRASSO e SHEPHERD (1977) purificaram inibidores virais do extrato foliar de *Phytolacca americana* e de 14 outras espécies, incluindo algumas de outras famílias da ordem Centrospermae. Proteínas semelhantes, biologicamente ativas, foram isoladas de todas elas, porém, somente 2 das 8 espécies de Centrospermae produziram quantidade substancial de inibido-

res de vírus que tiveram o mesmo peso molecular e foram antigenicamente relacionados.

GILLASPIE *et al.* (1981) testaram o efeito de 23 polisacarídeos de bactérias, fungos e plantas superiores na transmissão mecânica do vírus do mosaico da cana-de-açúcar. Eles verificaram que polisacarídeos de *Streptococcus pneumoniae* tinham alto poder inibidor ao passo que outros extraídos de plantas superiores não mostraram inibição significativa. Baseando-se em resultados anteriores de FELTON *et al.* (1955) que mostrou serem estes polisacarídeos antigenicamente relacionados, eles concluíram que provavelmente não havia nenhuma relação entre afinidade antigenica e inibição do vírus do mosaico da cana-de-açúcar.

Alguns inibidores, extraídos de plantas, de natureza não proteica tem sido identificados. A substância com propriedade inibidora sobre fitovírus extraída por MORAES *et al.* (1973) de plantas de *Abutilon striatum* mostrou forte reação positiva para os testes de Molish e antrona, o que indicou ser ela de natureza polisacarídica. Inibidor de beterraba também foi comprovado como sendo um polisacáride (EBRAHIM NEBAST e NIENHAUS, 1972). FISCHER e NIENHAUS (1973) caracterizaram o inibidor extraído de pimentão (*Capsicum annuum*) como sendo uma flavona ou outro composto proximamente relacionado.

Uma outra característica dos inibidores de plantas, descobertos até o momento, é que são incapazes de inibir a transmissão do vírus através dos vetores naturais. YOSHII e SAKO (1967) acreditam que no caso de afídeos como o *Myzus persicae* o vírus é colocado pelo seu estilete no plasmodesma na região intercelular que não seria atingida pelos inibidores.

2.2. Substâncias químicas em geral

De acordo com a classificação de BAWDEN (1954) já comentada anteriormente, os inibidores químicos podem ser divididos em inibidores de infecção e replicação.

Como inibidores de replicação existem diferentes grupos de substâncias, entretanto, serão apenas citados pois a discussão do seu mecanismo de ação foge dos objetivos primordiais desse trabalho. Entre os principais inibidores de replicação estão os análogos sintéticos de bases do RNA como o 2-Tiouracil (COMMONER e MERCER, 1951; PORTER e WEINSTEIN, 1961; RALPH e WOJCIK, 1966; etc.); o 5-fluoruracil (STAEHELIN e GORDON, 1960; HIRAI, 1977) e 8-azaguanina (LINDNER *et al.*, 1960; HARDER e KIRKPATRICK, 1970). Outro grupo importante de inibidores de replicação são os antibióticos: Noformicina (SCHLEGEL e RAWLINS, 1954; GRAY, 1955); Blastomicina S (HIRAI e SHIMOMURA, 1965 e HIRAI *et al.*, 1966); Actinomicina D (SANGER e KNIGHT, 1963; BANCROFT e KEY, 1964; etc.); Gentamicina (KASSANIS *et al.*, 1975) e muitos outros.

Outras substâncias como corantes (HIRAI, 1977), reguladores de crescimento como ácido giberélico (MARAMOROSCH, 1957), cinetina (KIRALY e SZIRMAI, 1964), 2-4-dinitrofenol (MERRET, 1962) e ribonuclease pancreática (ZHURAYLEV, *et al.*, 1983), também são inibidores da replicação viral. Substância que vem merecendo a atenção de muitos fitopatologistas é o Virazole ou Ribavirin (1-beta-D-ribofuranosil-1-2,4-triazole carboxamida). Diversos trabalhos tem sido feitos com o objetivo de testar seu efeito sobre a replicação de vírus vegetais (LERCH, 1977; SHEPARD, 1977; FAZIO *et al.*, 1978, 1980). Em alguns experimentos os pesquisadores procuraram associar seu efeito ao do 2-4-dioxohexaidro-1,3,5-triazine (DHT) (SCHUSTER, G., 1982).

Como inibidores de infecção existem também inúmeras substâncias, dentre as quais as enzimas proteolíticas ocupam papel de destaque. LOJKIN e VINSON (1931), pensaram que o efeito inibitório da tripsina sobre o TMV era devido à sua atividade proteolítica. Entretanto, STANLEY (1934) conseguiu efeitos inibitórios da tripsina em valores de pH nos quais ela não é ativa e descobriu que a infecção pode ser restabelecida por digestão da tripsina com a pepsina. Ele determinou também que o efeito inibitório da tripsina em TMV era maior em *Phaseolus vulgaris* L. do que

em *Nicotiana glutinosa*. Esses resultados levaram Stanley a concluir que a tripsina não agia diretamente sobre o vírus, mas sobre a planta. CALDWELL (1936) confirmou esta hipótese mostrando que uma mistura infecciosa de tripsina e "aucuba mosaic virus" pode readquirir sua infectividade por aquecimento a 70°C, temperatura em que a tripsina é denaturada. LORING (1942) obteve resultados semelhantes em estudos sobre o efeito inibitório da ribonuclease.

JOHNSON (1941) não encontrou nenhuma evidência de que a tripsina e outros materiais por ele testados modificaram a susceptibilidade da planta hospedeira e sugeriu que a inibição era devida a uma fraca, facilmente quebrável união molecular entre o vírus e o inibidor. Esta conclusão foi confirmada por FULTON (1943), em estudos realizados com tripsina, leite, soro sanguíneo bovino e outros materiais sobre "tobacco ringspot" e "bean mosaic viruses". NENE e THORNBERRY (1970), trabalhando com steapsina e tripsina obteve resultados semelhantes, sugerindo que essas enzimas se complexam com o vírus impedindo a ligação do vírus ao receptor.

STAHMAN e GOTHOSKAR (1958) mostraram que vários polieletrólitos como polipectato de sódio e ácido poliglutâmico, quando misturados com o TMV, reduziram sua infectividade, o que não aconteceu, quando foram aplicados depois da inoculação mecânica. Eles atribuíram esses resultados ao fato de a ação dessas substâncias ocorrer sobre a planta hospedeira. Dados obtidos com esses e outros inibidores os levaram a postular a hipótese de que sua ação sobre o TMV poderia ser explicada com base na combinação iônica do inibidor com sítios receptores do vírus existentes nas células hospedeiras.

Alguns reguladores de crescimento como ácido naftaleno acético e ácido giberélico são também capazes de inibir a infecção viral. UPRETI *et al.*, (1964) descobriram que o ácido α -naftaleno acético (NAA) reduz a infectividade do vírus X e Y da batata (PVX e PVY) e o ácido giberélico inibe a do "chili mosaic virus". Eles são eficientes quando aplicados na planta 4 horas antes e inativos se aplicados 4 horas após a inoculação mecânica.

THOMAS e JOHN (1980) estudaram o efeito do ácido giberélico e do ácido indol acético sobre a infecção do "rice tungro virus". O primeiro, impediu a manifestação do nanismo que habitualmente é causado pela infecção do referido vírus sem afetar significativamente sua infetividade, nem mascarar sintomas como clorose foliar e brotação reduzida. Isso os levou a concluir que a atividade do ácido giberélico / em plantas infetadas é confinada ao seu papel de regulagem do cres-cimento da planta ao invés de a antiviral, o que concorda com os dados anteriores obtidos por FERNANDEZ e GOBORJAMY (1976) e por GOVIN - DASWAMY *et al.*, (1977). O ácido indol acético inibiu o vírus, de tal modo que as plantas tratadas não apresentaram os sintomas da doença e não continham partículas virais, e o seu crescimento e produção foram comparáveis às plantas sadias controles. Os autores observaram que o ácido indol acético parecia agir mais na prevenção da infecção do que na multiplicação viral.

Cátions divalentes como Ba^{+2} , Ca^{+2} , Mg^{+2} inibem a infetividade do "tobacco necrosis virus", "cucumber mosaic virus", "tobacco ringspot virus" e "southern bean mosaic virus", mas são menos inibitórios para o TMV e "turnip mosaic virus" (ROUSSOU e FULTON, 1963). Esses autores primeiramente consideravam que os íons poderiam afetar a habilidade do vírus para se ligar aos seus receptores. Entretanto, como nenhuma inibição foi obtida por infiltração dessas substâncias - nas folhas imediatamente antes ou 3 horas antes da inoculação, eles concluíram que provavelmente os cátions divalentes afetam o vírus e não a célula hospedeira. Cátions monovalentes estimularam ou tiveram pouco efeito sobre o vírus.

Diversas outras substâncias como compostos fenólicos oxidados: o- benzoquinona e formas oxidadas do ácido clorogênico, catecol e dihidrofenilalanina (dopa) possuem propriedades inibidoras sobre a infecção de vírus (MINK e SAKSENA, 1971).

Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), triton-X e tween 80 inibem a infecção do TMV diminuindo o número de lesões locais na folha do hospedeiro (TANIGUCHI, 1976). Este autor conseguiu separar as partículas ativas da mistura vírus-inibidor por filtração em gel e concluiu que a ação do inibidor era exercida sobre a planta. Entretanto, quando os detergentes foram aplicados após a inoculação não houve inibição, mostrando que os detergentes poderiam agir sobre a interação entre o vírus e o seu sítio de infecção.

KO *et al* (1980) determinaram o efeito de alguns compostos como alquilbenzenosulfonato, alquilsulfatos e alcanosulfonatos, e encontraram que o alquilbenzenosulfonato mostrou melhores resultados de inibição de infecção do vírus do mosaico do pepino e "green mottle virus" que do TMV, enquanto que o cálcio ou sodiododecilbenzenosulfonato foram mais eficientes na inibição do "green mottle virus".

ROBINSON e RASCHKE (1977) verificaram que preparações purificadas de "tobacco rattle virus" com EDTA a 2mM tiveram sua infectividade diminuída e postularam que o efeito do EDTA aparentemente era remover íons metálicos da partícula viral, deixando o RNA acessível ao ataque pelas nucleases presentes na preparação. Na presença dos íons a enzima fica inativa e o vírus mantém toda a sua infectividade.

TANIGUCHI (1982) constatou que o EDTA inibiu o desenvolvimento de lesões locais pelo TMV em folhas de feijão mas não em folhas de fumo TNN. Esta inibição ocorreu quando o tratamento foi feito 0 a 30 minutos após a inoculação e, quando aplicado imediatamente antes, não produziu nenhum efeito inibidor. Ele postulou que o efeito do EDTA na formação de lesão local pelo TMV não é diretamente relacionado com a inativação do vírus, mas interfere nos primeiros passos de infecção.

TOMLINSON *et al.*, (1976) estudaram o efeito do Bavistin, fungicida sistêmico, sobre o "bean western yellows virus" e "tobacco mosaic virus" em plantas de alface e fumo respectivamente e observaram que

esta substância inibe o desenvolvimento dos sintomas das viroses. BHARDWAJ *et al.* (1982) verificaram o efeito de outro fungicida, o benlate, na expressão dos sintomas e inoculação mecânica e por afídeo de transmissão estiletar do "urdbean leaf crinkle virus". A pulverização pré e pós inoculação impediu o desenvolvimento da doença, mas o tratamento de pré-inoculação foi muito mais eficiente. Nenhuma planta tratada com concentrações iguais ou superiores a 1% de benlate desenvolveram sintomas da doença, enquanto que os controles tratados com água mostraram alto índice de infecção. Resultados semelhantes foram obtidos em plantas tratadas pré e pós inoculação com afídeos virulíferos *Aphis craccivora* e *Acythosiphon pisum*. O primeiro transmitiu o vírus a um menor número de plantas em todas as concentrações experimentadas. Os resultados dos testes em que plantas severamente infetadas tratadas com benlate foram submetidas à transmissão através do vetor revelaram que a transmissão do vírus diminuiu drasticamente com o aumento da concentração de benlate. O mecanismo de inibição do benlate não é muito claro, mas os autores consideraram a possibilidade de estar ele relacionado à propriedade que esse fungicida tem de se ligar às membranas do cloroplasto, retardando sua senescência como fazem as citocininas. A redução ou retardamento na transmissão através do vetor, foram atribuídos à baixa concentração de vírus nas plantas tratadas ou a uma diminuição na receptividade dos estiletes durante o período de alimentação e aquisição. Esses resultados parecem muito promissores, principalmente se puderem ser extrapolados para outras viroses.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Substâncias e vírus testados

Foram experimentados sucos de 17 plantas para investigar a existência de possíveis substâncias inibidoras. Estes sucos foram obtidos por trituração de folhas e hastes recém-coletadas em liquidificador com tampão fosfato 0,01M pH 7 e β -mercaptoetanol a 1%, na proporção de 1 grama de folha para 3 ml da solução. Os extratos obtidos foram filtrados em algodão adaptado em funil de vidro e então utilizados.

Inicialmente foram tratados alguns grupos de substâncias considerados como tendo atividade sobre o sistema nervoso central dos animais para averiguação de seu possível poder inibidor: 6 compostos utilizados como medicamento, cujo princípio ativo pertence ao grupo dos benzodiazepínicos: Dalmadorm, Pacitran, Valium, Rivotril, Somalium e Tegretol (nomes comerciais). Um do grupo das oxazolidinas, o Triodine, um do grupo da primidona, o Mysoline e um composto considerado como viricida para tratamento de vírus animais, o Mantidan, cujo princípio ativo é o cloridrato de amantadina.

Todos esses compostos foram obtidos na forma de comprimidos, que foram triturados em almofariz e diluídos com tampão fosfato 0,01M pH 7, em proporções adequadas para atingir a concentração final indicada nas tabelas.

Outras substâncias químicas testadas foram: Virazole ou Ribavirin (1-beta-ribofuranosil-1-2-4-triazole carboxamida), bifenilditio-carbazone; ácido naftaleno acético e ácido 6-benzilaminopurinico (6-BA) alguns detergentes: Triton X-100; Tween 80 e vários detergentes comerciais: ODD, ODD Limão, Limago, Limpol, Minerva, Sussex e Tool.

Todas as substâncias químicas utilizadas foram diluídas em tampão fosfato 0,01M pH 7, para atingir as concentrações indicadas nas tabelas. Somente os detergentes comerciais para uso doméstico que por possuírem formulações adequadas com pH próximo à neutralidade, foram simplesmente diluídos em água destilada.

O alquilbenzenosulfonato de sódio, empregado como substância que constitui o princípio ativo dos detergentes comerciais em geral, foi doado por gentileza especial da Orniex. A substância, recebida na forma de produto industrial, foi diluída e posteriormente neutralizada, pois originalmente possuía alta viscosidade e pH em torno de 2,6. O procedimento empregado foi o seguinte: o alquilbenzenosulfonato de sódio foi diluído a 30% em tampão fosfato 0,01M pH 7. Em seguida adicionou-se hidróxido de sódio 5 N, tendo sido utilizada uma proporção aproximada de 120 ml da base para cada 500 ml da solução. Esta solução assim preparada foi considerada solução estoque. Todas as diluições desta foram feitas utilizando o tampão acima.

No decorrer dos experimentos, os vírus empregados nos testes de inibição foram: Y de Piracicaba e vírus da acro necrose, estabelecidos em feijoeiros (*Phaseolus vulgaris* L.) da variedade Carioca; vírus do mosaico da alfafa estabelecido em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) da variedade Santa Rosa, mantidos sob condições de estufa na Seção de Virologia do IAC, e vírus do mosaico do mamoeiro (VMM), estabelecido em plantas de mamão comum (*Carioca papaya* L.) mantido sob condições de estufa ou de campo, no mesmo local. Nos testes de inibição realizados com esses vírus o inóculo foi utilizado na concentração de 1 grama de folha

infetada para 5 ml da solução extratora (tampão fosfato 0,01M pH 7, contendo sulfito de sódio na mesma molaridade).

Outro vírus empregado foi o TMV de duas origens distintas: vírus coletado em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) na região de Rio Pomba, MG., identificado por inoculação em plantas indicadoras e observação das partículas ao microscópio eletrônico. Este vírus foi inoculado em plantas de fumo da variedade Turkish, sob condições de estufa, e quando houve o aparecimento de um número razoável de folhas com sintomas característicos de mosaico estas foram coletadas. Seu suco foi extraído em liquidificador com tampão fosfato 0,01M pH 7 contendo sulfito de sódio 0,01M, na proporção de 1g de folha para 5 ml de tampão. Esse suco foi clarificado por centrifugação e distribuído em frascos de 5 ml, após o que foram conservados em congelador a -20°C . Este inóculo assim obtido constituiu o inóculo concentrado padrão que na maioria dos experimentos de inibição realizados com plantas de fumo da variedade Turkish NN (TNN) foi utilizado na diluição final de 1/100. Nos testes de simulação de operação de transplante, as fontes de vírus foram as próprias plantas de fumo infetadas sistemicamente.

Outro isolado de TMV empregado foi extraído de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), da região de Piracicaba e mantidos em congelador a 20°C , na Seção de Virologia do IAC. Esse vírus foi inoculado em plantas de tomate da variedade Santa Cruz, que serviram como fonte de inóculo nos testes de simulação das operações de transplante realizadas com tomateiros.

3.2. Plantas-teste

As plantas-teste empregadas foram:

- a. Mamoeiros da variedade Solo e Comum, plantados 2 a 2 em vasos de barro de 16 cm de altura por 16 cm de diâmetro, empregados na fase em que mediam aproximadamente 15 a 20 cm de altura;

- b. Feijoeiro da variedade Carioca, plantados também 2 a 2 em vasos semelhantes, empregados quando tinham 2 folhas primárias com aproximadamente $2/3$ do seu tamanho máximo de expansão;
- c. Plantas de fumo TNN, Turkish e P-70 (variedade de fumo de corda plantado na região de Lavras, MG.), inicialmente sementeas em bandejas plásticas de aproximadamente 10 cm de altura por 26 cm de largura por 40 cm de comprimento. No caso das plantas de fumo TNN, as mudas foram replantadas em sacos plásticos de dimensões aproximadas às dos vasos citados: aproximadamente 15 cm de altura por 16 cm de diâmetro. Foram empregados no estágio de aproximadamente 8 a 9 folhas, sendo que 1 ou 2 basais, e as 3 pequenas do broto apical foram removidas, ficando 4 folhas em cada planta utilizada nos diferentes testes de inibição.

No uso dos inibidores na simulação da operação transplante, após a germinação das sementes nas bandejas acima referidas, foi feita uma eliminação do excesso de planta mantendo-se 50 por bandeja, que posteriormente foram transplantadas para saquinhos plásticos de aproximadamente 16 X 7 cm.

- d. Plantas de tomate da variedade Santa Cruz foram empregadas nos testes de simulação de transplante. A obtenção destas plantas se deu exatamente do mesmo modo empregado para as variedades de fumo P-70 e Turkish, ou seja, sementeas em bandejas, manutenção de 50 plantas por bandeja e transplante destas para saquinhos plásticos.

3.3. Aplicação das substâncias inibidoras

Na maioria dos testes realizados com mamoeiros as substâncias inibidoras foram aplicadas por pulverização. Nos casos em que os sucos das plantas testadas mostraram alta viscosidade, estes foram aplicados com uma espátula enrolada em algodão, de modo a espalhar uma camada uniforme sobre a superfície superior ou inferior da folha, conforme o objetivo do teste.

Paralelamente, foram feitos testes controle nos quais as plantas foram igualmente tratadas, utilizando o mesmo método, com as soluções que serviram como solvente para os inibidores ou como extratoras dos extratos foliares das plantas testadas como inibidores.

Nos casos em que a aplicação do inibidor foi feita junto com o vírus do mosaico do mamoeiro, as soluções contendo os inibidores, nas concentrações indicadas nas tabelas, serviram como extratoras do inóculo. Para testes do TMV em plantas de fumo, volumes iguais do inibidor e do inóculo padrão diluído 1/50 foram misturados e inoculados mecanicamente.

A inoculação em mamoeiros na maioria dos experimentos foi feita 24 horas após o tratamento da planta com o inibidor. Somente nos casos em que foi testado o tempo de duração do efeito inibidor da substância após sua aplicação, é que se fizeram inoculações a diferentes intervalos de tempo. Quando houve mais que uma aplicação do inibidor, como no caso dos detergentes, os intervalos entre aplicações foram de 24 horas.

Em plantas de fumo TNN o inibidor foi aplicado em uma das metades da folha, previamente marcada, com o auxílio de uma espátula enrolada em algodão. A outra meia folha constituiu o controle, tendo sido tratada com o solvente do inibidor ou solução extratora do suco da planta utilizado como inibidor. As inoculações foram feitas logo após a secagem do inibidor, exceto nos casos em que foi testado o seu poder residual, conforme já descrito para o mamoeiro.

Nas plantas de feijão o inibidor foi pulverizado ou espalhado com uma espátula em uma de suas duas folhas primárias, previamente marcadas. A outra folha foi utilizada como controle, sendo tratada também com as soluções que serviram como solvente ou extratora do suco da planta. As inoculações foram feitas 24 horas após aplicação dos inibidores.

3.4. Métodos de inoculação

As inoculações mecânicas foram feitas pelo método de fricção com carborundum (cárbeto de silício), que consiste em polvilhar previamente a folha com este abrasivo e friccionar o inóculo com o dedo.

A inoculação através do vetor *Myzus persicas* Sulz. foi feita com pulgões criados em insetários. Foi dado um jejum prévio de meia hora após retirada dos mesmos das plantas criadeiras com o auxílio de um pinçel, e colocados posteriormente sobre plantas de mamão infetadas para aquisição do vírus do mosaico.

Após um período de alimentação de aproximadamente uma hora, estes foram transferidos para os mamoeiros previamente tratados ou não com inibidores. Decorrido um período de no mínimo 2 horas, as plantas foram pulverizadas com inseticida e transferidas para as estufas apropriadas.

3.5. Avaliação da atividade inibidora

Para determinação quantitativa do efeito inibidor das substâncias testadas em plantas que reagiram com sintomas sistêmicos aos vírus investigados, foi empregado o método de contagem de plantas. Após o aparecimento dos sintomas característicos da virose em questão nas plantas testadas, o número de plantas infetadas foi contado e a percentagem nas plantas tratadas calculada em relação às que serviram como controle.

Na avaliação da atividade inibidora em plantas com sintomas locais, a quantificação foi feita de duas maneiras. Em plantas de fumo TNN, nas quais foi testado o efeito dos inibidores sobre a infecção pelo TMV, foi empregado o método da meia folha. Neste método faz-se a contagem das lesões na meia folha tratada com o inibidor e a porcentagem de inibição é calculada em relação ao número de lesões da outra meia folha

controle. Em feijoeiros da variedade Carioca, nos quais foi testado o efeito das referidas substâncias sobre o vírus do mosaico da alfafa, o vírus Y de Piracicaba, e o vírus da acro necrose, a quantificação foi feita pelo método de contagem de lesões em folhas primárias. Novamente a porcentagem de inibição foi feita comparando-se o número de lesões apresentadas pela folha tratada com o inibidor com a da folha controle oposta.

Nos testes de simulação de transplante, plantas de fumo e tomate foram transplantadas de bandejas para sacos plásticos com mãos contaminadas por esmagamento de folha de fumo e de tomate, respectivamente, infetadas com o vírus do mosaico (TMV). Foram feitos os seguintes tratamentos com inibidores:

a. Lavagem de mãos:

A cada 10 mudas transplantadas as mãos foram propositadamente contaminadas e posteriormente lavadas com as soluções inibidoras e nos controles paralelos, a lavagem das mãos foi na solução tampão extratora do suco, e água (diluyente do detergente).

b. Pulverização prévia das mudas:

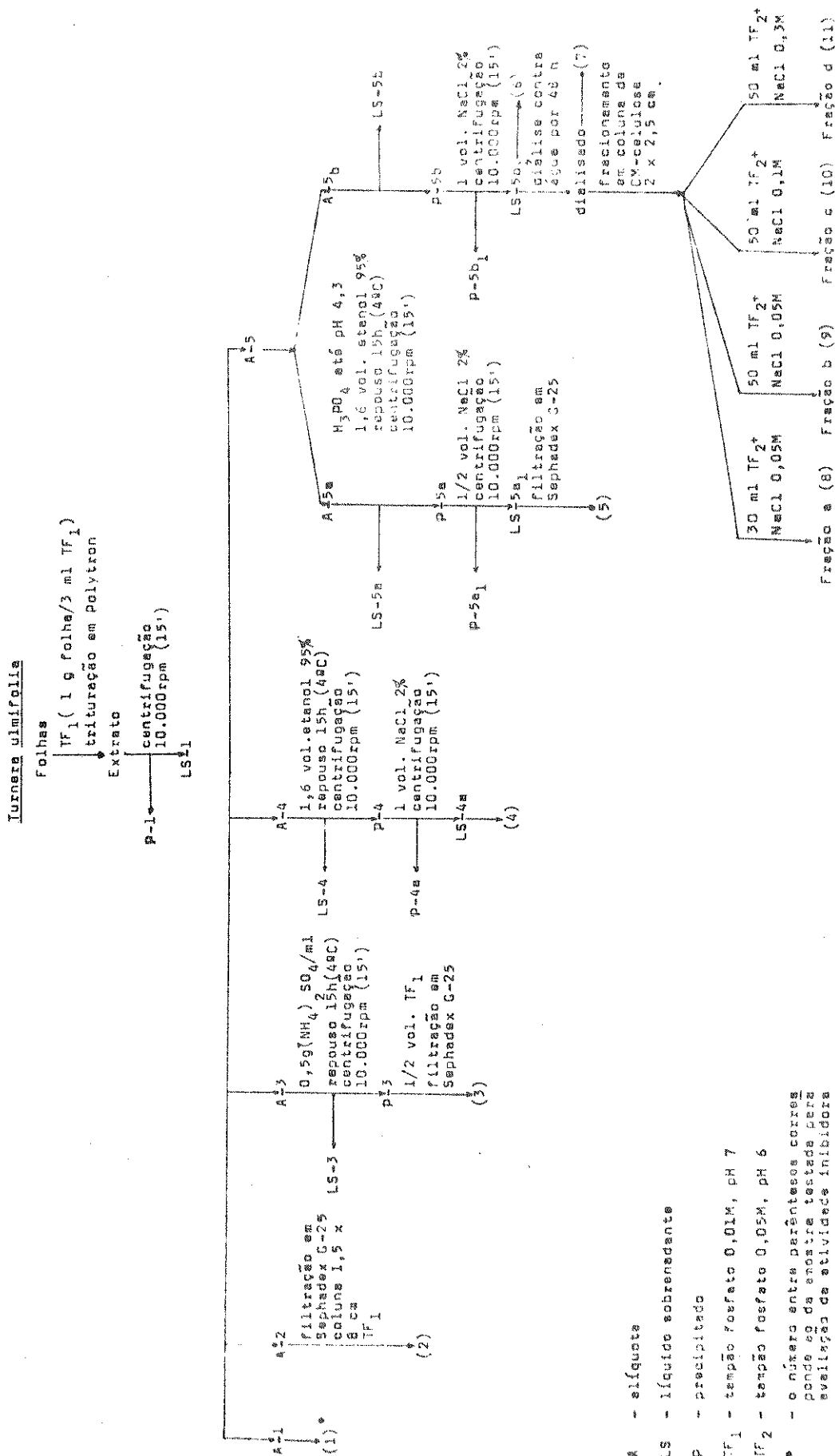
As mudas foram previamente pulverizadas com o inibidor e após secagem completa, contaminou-se as mãos, replantou-se 10 mudas e novamente se recontaminou as mãos para repetir a operação. Controles paralelos foram pulverizados com a solução extratora do suco e com água.

3.6. Tentativas iniciais de purificação do inibidor de *T. ulmifolia*

O esquema das várias opções testadas durante o processo de purificação do inibidor, encontra-se representado pela figura 1.

A técnica que deu melhores resultados foi a empregada por WYATT e SHEPHERD (1969) e GRASSO e SHEPHERD (1977) para purificar o inibidor do extrator foliar de *P. americana* e de outras plantas.

FIGURA 1. Esquema das diferentes sequências e etapas que foram testadas no processo de purificação do inibidor de *Turnera ulmifolia*



Folhas de *T. ulmifolia* foram trituradas em tampão fosfato 0,01M, pH 7, na proporção de 1g de folha para 3 ml de tampão, em Polytron PT-35 (Brinkmann Instr., N.J.). O extrato resultante foi centrifugado a 10.000 g por 15 minutos, o precipitado descartado e o sobrenadante dividido em 5 alíquotas. Uma das alíquotas foi reservada, tendo sido designado pelo número 1. A segunda foi filtrada através de uma coluna de Sephadex G-25, de 1,5 X 8 cm., (equilibrada com tampão fosfato 0,01M, pH 7). O eluído coletado foi designada pelo número 2.

À terceira alíquota foi adicionada 0,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por ml (70% de saturação), após o que, foi colocada em refrigerador por cerca de 15 horas, em repouso. Depois foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos e o precipitado foi ressuspendido em metade do volume inicial com tampão fosfato 0,01M, pH 7 e filtrado em coluna de Sephadex G-25. A eluição foi feita com o mesmo tampão fosfato e o eluído recebeu o número 3.

À quarta alíquota adicionou-se 1,6 volumes de etanol a 95%. Depois de um período de aproximadamente 15 horas de repouso em refrigerador, foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos, o precipitado foi ressuspendido em NaCl a 2% e novamente centrifugado a 10.000 g por mais 15 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi designado pelo número 4.

A quinta alíquota foi dividida em duas partes e ambas foram acidificadas a pH 4,3 com ácido fosfórico antes da adição de 1,6 volumes de etanol a 95%. Após um período de mais ou menos 15 horas de repouso em refrigerador foram centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. Uma parte foi ressuspendida em 1/2 do volume original em NaCl 2%, novamente centrifugada como anteriormente e o sobrenadante foi filtrado em Sephadex G-25, tendo o eluído recebido o número 5. A outra foi ressuspendida em NaCl a 2% com o mesmo volume original inicial e uma alíquota dessa preparação foi designada pelo número 6, enquanto o restante foi dialisado contra água por 48 horas com trocas sucessivas, no início de hora em hora, deixando-se 8 horas sem trocar durante a noite e efetuando-se a troca no dia seguinte a cada 2 horas. O dialisado recebeu o número 7.

Desse dialisado tomou-se 80 ml que foram filtrados através de uma coluna de CM-celulose (SIGMA) de 2 X 2,5 cm, equilibrada com tampão fosfato 0,05M, pH 6.

Após a passagem dos 80 ml do dialisado através da coluna de CM-celulose, fez-se passar 350 ml de tampão fosfato 0,05M pH 6, que foram descartados. Em seguida, a amostra foi eluída com tampão fosfato 0,05M pH 6 contendo NaCl 0,05M, que foram coletados em duas etapas: os primeiros 30 ml, designados pelo número 8 e os 50 ml restantes pelo número 9. Depois fez-se uma nova eluição com 50 ml de tampão fosfato 0,05M pH 6 contendo NaCl 0,1M, coletados de uma só vez, recebendo esse eluído o número 10. Finalmente eluiu-se a coluna com 50 ml de tampão fosfato 0,05M pH 6 contendo NaCl 0,3M, também coletados de uma só vez, constituindo o número 11. A avaliação da atividade inibidora foi feita em plantas de fumo TNN para o TMV.

3.7. Testes realizados com o inibidor purificado (fração b)

a. Dosagem de proteína e carboidrato

A determinação do teor proteico na fração purificada foi feita pelo método de BRADFORD (1976), com "comassie brilliant blue", e a dosagem de glicose, pelo método de UMBREIT (1964), utilizando antrona.

b. Atividade RNase

A fração purificada teve sua atividade RNase dosada pelo método de WILSON (1963).

c. Tratamento enzimático

A fração b, contendo o inibidor, foi tratada com três proteases: tripsina, quimiotripsina e papaina, na concentração de 3 mg/ml. Em paralelo fez-se uma solução controle das enzimas utili-

zando como solvente tampão fosfato 0,05M pH 6 contendo NaCl 0,05M. Estas soluções e uma alíquota do inibidor sem tratamento (2º controle) foram incubadas a 40°C por 4 horas e então testadas. A avaliação da atividade inibidora foi feita do mesmo modo descrito anteriormente.

d. Tratamento com TNBS e EDTA

Neste teste foi adicionado 0,1 mg de TNBS (ácido trinitrobenzenosulfônico), para cada ml de uma alíquota da fração contendo o inibidor e 0,001M de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) a outra, ambas foram incubadas a 40°C e testadas. Paralelamente foram feitos os respectivos controles colocando 0,1 mg/ml de TNBS e 0,001M de EDTA em tampão fosfato 0,05M pH 6 contendo NaCl 0,05M, incubados do mesmo modo e testados.

e. Concentração a vácuo através de uma membrana de celofane

Nesta fase, 10 ml da fração b, contendo o inibidor, foram colocados dentro de um saco de diálise de celofane, amarrado nas extremidades e colocado em um frasco de Kitasato, no qual produziu-se vácuo. O solvente passou sob pressão de dentro para fora da membrana de celofane, deixando-se somente 1 ml dentro do saco de diálise, efetuando-se assim uma concentração do inibidor por 10 vezes. Em seguida fez-se a reconstituição do volume inicial para avaliar sua atividade inibidora e verificar se o inibidor havia sido retido pela membrana.

f. Estabilidade em relação à temperatura

Amostras do inibidor foram colocadas em tubos de ensaio fechados com rolha de borracha e colocados em banho maria a 100°C por 10, 20, 30 e 60 minutos respectivamente. Outra amostra foi deixada à temperatura ambiente. Após terem esfriado, essas amostras e a que foi deixada sem aquecimento, foram submetidas a avalização da atividade inibidora.

3.8. Microscopia eletrônica imuno-específica do TMV tratado com os inibidores

Para verificar o efeito exercido pelo inibidor sobre a ultraestrutura da partícula e sobre o poder antigênico do TMV, utilizou-se a técnica denominada "Serologically specific electron microscopy" (DER-RICK, 1973) a qual se baseia na ligação específica das partículas de vírus à superfície de telinhas de microscopia eletrônica cobertas com anticorpos. O antissoro empregado nos testes foi gentilmente cedido por Oliveira, do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Campinas.

Telinhas de cobre previamente cobertas com película de paralodum 0,5% e reforçadas com carbono ou unicamente cobertas com carbono, foram colocadas por 15 minutos sobre gotas de antissoro diluído 1/1000 com tampão fosfato 0,05M, pH 7,2. Proteínas de antissoro não adsorvidas foram removidas através da lavagem das telinhas em gotas do mesmo tampão fosfato.

O vírus do mosaico do fumo foi extraído de folhas de plantas infetadas, em tampão fosfato 0,01M, pH 7, e o extrato foi misturado com igual volume dos inibidores (ODD e fração 5 do inibidor extraído do suco de *T. ulmifolia*) e com igual volume do tampão utilizado como solvente para os inibidores (controle), ficando esta mistura em repouso por 2 horas. Após esse tempo, as telinhas preparadas com o antissoro diluído foram colocadas sobre gotas dessas misturas por 15 minutos.

Em seguida foram lavadas com água destilada, contrastadas com solução aquosa de acetato de uranila a 2% e observadas ao microscópio eletrônico.

A contagem de partículas foi feita em fotografia com aumento de 50.000 vezes, numa área de 18 X 24 cm, correspondente a $8,784(\mu\text{m}^2)$.

Para "decorar" as partículas de vírus, isto é, cobrir as partículas com anticorpos, foi empregado o método de MILNE e LUISONI (1977). Nesses testes as telinhas previamente colocadas em antissoro diluído 1/1000, foram transferidas para gotas de extrato foliar contendo o vírus, onde permaneceram por 15 minutos. Então, o excesso foi retirado por lavagem em água destilada, e as telinhas foram colocadas nos inibidores por mais 15 minutos. Após esse período houve uma nova lavagem, as telinhas foram colocadas em antissoro diluído 1/50, por 15 minutos, novamente lavadas e contrastadas conforme descrito anteriormente.

4. RESULTADOS EXPERIMENTAIS

4.1. Triagem de diferentes substâncias como possíveis inibidoras da transmissão mecânica do vírus do mosaico do mamoeiro

Nas investigações preliminares, o suco de diversas espécies de plantas, diferentes substâncias químicas e vários detergentes - foram utilizados em testes visando detectar inibidores de infecção ou replicação viral.

4.1.1. Sucos de plantas

Foram experimentados sucos de 17 diferentes espécies de plantas, procurando detectar entre eles algum que fosse capaz de inibir o vírus do mosaico do mamoeiro. Os resultados dos 27 testes, nos quais foram inoculadas 390 plantas de mamão previamente tratadas com os sucos, estão representados na tabela 1. Entre os sucos das espécies testadas - alguns induziram discreta inibição (5 a 10%) e um retardamento no aparecimento dos sintomas. Foram estes os de *Chorisia speciosa*, *Dichorisan-dra thyrsiflora*, *Ixora* sp., e *Rosa* sp. Melhores resultados foram apresentados pelo suco de *Turnera ulmifolia*, que quando aplicado antes da inoculação mecânica induziu uma inibição de 80 a 100% em relação às plantas controle. Resultados de dois testes não apresentados no quadro mostraram que o suco desta planta quando aplicado após a inoculação mecâni

Tabela 1. Resultados obtidos na triagem do suco foliar de diferentes espécies de plantas como possíveis inibidores da transmissão mecânica do vírus do mosaico do mamoeiro

Espécies de plantas utilizadas	Nº de testes	Nº de plantas inoculadas (INO) e infectadas (INF)	
		INO	INF
<i>Aster</i> sp.	1	10	10
<i>Canna</i> sp.	1	10	10
<i>Carica cauliflora</i> Jacq.	1	10	10
<i>Carica</i> 2	1	10	10
<i>Chorisia speciosa</i> St. Hil	2	20	10
<i>Chrysanthemum maximum</i> Ramond	1	10	10
<i>Coffea arabica</i> L.	2	20	20
<i>Costus</i> sp.	1	10	10
<i>Dichorisandra thyrsiflora</i> Milk.	2	20	18
<i>Impatiens sultana</i> Hook	1	10	10
<i>Ixora</i> sp.	2	20	19
<i>Lantana camara</i> L.	2	20	20
<i>Pentas lanceolata</i> Schum.	1	10	10
<i>Rosa</i> sp.	2	20	18
<i>Salvia leucantha</i> Cav.	1	10	10
<i>Tibouchina semidecandra</i> Cogn.	1	10	10
<i>Turnera ulmifolia</i> L.	6	60	9
Tampão fosfato (controle)	12	120	120

ca, não provocou nenhum efeito de inibição da infecção.

4.1.2 Substâncias químicas de diferentes grupos

Nesta fase foram testadas 14 substâncias, tendo sido inoculadas 2230 plantas nos 50 testes realizados. Foram utilizadas duas substâncias por vez com um controle paralelo constituído por 10 plantas pulverizadas com o tampão utilizado como diluente para o inibidor. Os resultados estão discriminados na tabela 2, não tendo havido nenhuma substância capaz de inibir a transmissão mecânica do vírus do mosaico do mamoeiro. As concentrações de 6-BA iguais a 3 e 4 ppm foram tóxicas às plantas-teste receptoras, levando-as à morte. O Mantidan, substância usada na terapia de viroses animais, não produziu efeito inibitório, mas induziu nas plantas previamente tratadas, hipersensibilidade ao vírus do mosaico do mamoeiro, levando-as não raro, à morte.

4.1.3. Detergentes

Foram testados alguns detergentes já descritos na literatura como inibidores (TANIGUCHI, 1976), e alguns detergentes comerciais que, por serem produtos baratos e fáceis de serem adquiridos no mercado, poderiam oferecer algumas vantagens caso tivessem atividade inibidora sobre os fitovírus.

Nos 37 testes realizados foram inoculadas 2.754 plantas, e os resultados estão discriminados na tabela 3. Pelos dados obtidos pode-se concluir que todos os detergentes tiveram ação inibidora sobre a transmissão mecânica do vírus do mosaico do mamoeiro. O Tween - 80 - quando aplicado por pulverização somente uma vez a uma concentração de 10% provocou uma inibição razoável de 60 a 80%, mas os danos causados à planta foram muito drásticos. A 4% a toxicidade foi ainda bem forte, e a 2,5% foi levemente tóxico, porém, nesta última concentração a porcentagem de inibição caiu a 40%. As tentativas de se concentrar o detergente na planta por mais de uma aplicação numa concentração suportável pa-

Tabela 2. Resultados obtidos na triagem de diferentes substâncias químicas como possíveis inibidores da transmissão mecânica do vírus do mosaico do mamoeiro

Substâncias Testadas	Concen tração (ppm)	Nº de testes	Nº de plantas inoculadas (INO) e infetadas (INF). Substâncias aplicadas antes (PRÉ), após a inoculação mecânica (PÓS) ou misturado com o vírus (MIST)					
			PRÉ		PÓS		MIST	
			INO	INF	INO	INF	INO	INF
Ácido 6-benzilamino-purínico (6-BA)	1	2	20	20	20	20	20	20
	2	2	20	20	20	20	20	20
	3	2	20	20	20	20	20	20
	4	2	19	19	19	19	19	19
Ácido naftaleno acético	5	2	20	20	20	20	19	19
	10	2	19	19	19	19	20	20
Bifenilditiocarbazone	2000	2	20	19	20	20	20	20
Dalmadorm	500	3	28	28	29	29	30	30
Mantidan	500	4	4	40	40	40	40	40
Mysoline	1000	2	19	19	18	18	19	19
l-nitroso 2-naftol	2000	3	30	30	30	30	30	30
Pacitran	500	3	30	30	29	29	30	30
Rivotril	500	3	28	28	30	30	30	30
Somalium	1000	2	20	20	20	20	20	20
Tegretol	1000	2	20	20	20	20	20	20
Tridione	1000	2	20	20	18	18	20	20
Valium	500	3	30	30	28	28	30	30
Virazole	400	4	40	40	40	40	40	40
	800	3	30	30	30	29	30	30
	1200	2	20	20	20	20	20	20
Controle (tampão fosfato)	--	25	250	250	250	250	250	250

para a planta, apesar de aumentarem a porcentagem de inibição, continuaram provocando danos que se agravaram a cada aplicação, não sendo por isso viáveis de serem utilizados.

O Triton X - 100 embora tenha induzido discreta redução na infecção, apresentou também o inconveniente de ser um tratamento muito drástico para as plantas.

Excelentes resultados foram obtidos com a pulverização prévia da planta com os detergentes comerciais utilizados na limpeza doméstica. O ODD aplicado uma vez inibiu cerca de 60% da infecção, duas vezes, 80% e três vezes, 100%. Os resultados obtidos com a utilização do principio ativo, o alquilbenzenosulfonato de sódio, foi semelhante ao obtido com todos os detergentes testados, apresentando porém o inconveniente de ser mais tóxico, causando alguns danos às plantas. Fato comum a todos os detergentes, é que não foram capazes de inibir a infecção viral quando aplicado 24 horas após a inoculação mecânica. E, de um modo geral, todos eles quando foram misturados com o inóculo provocaram maior injúria foliar do que quando foram pulverizados previamente na planta.

4.2. Efeito de vários detergentes e do suco de *Turnera ulmifolia* sobre a transmissão mecânica do TMV

Foram experimentados os inibidores anteriormente constatados como eficientes na inibição da transmissão mecânica do vírus do mosaico do mamoeiro, sobre a infecção do TMV. Foram empregadas várias concentrações dos inibidores com o objetivo de se selecionar a mais eficiente para ser utilizada em testes posteriores.

Os resultados dos 66 testes realizados, nos quais foram inoculadas de 15 a 17 folhas por teste, estão representados na tabela 4. Eles indicaram que os detergentes e seu principio ativo, bem como o suco de *T. ulmifolia*, foram tão eficientes na inibição do TMV quanto na do VMM.

Tabela 4. Resultados obtidos nos testes em que se verificou o efeito de diversos detergentes e do suco de *Turnera ulmifolia* sobre a transmissão mecânica do vírus do mosaico do fumo

Substância testada	Concentração *(% ou g/ml)	Nº médio de lesões nas meias folhas tratadas (T), nas controle (C) e porcentagem de inibição - nos 3 testes realizados (%IN)		
		L	C	%IN
Alquilbenzenosulfonato de sódio	1	83	367	77,3
	2	42	310	86,4
	3	31	207	85,0
	4	26	283	90,8
	5	12	406	97,0
Limago	9	67	224	70,0
Limpol	9	14	91	86,8
Minerva	9	28	242	88,4
ODD	1	137	294	53,4
	3	36	99	63,6
	5	46	162	71,6
	7	59	229	74,2
	9	18	141	87,2
	11	12	134	91,0
ODD-limão	9	24	210	88,5
Sussex	9	32	214	85,0
<i>T. ulmifolia</i> (suco)	1/48	139	222	37,4
	1/24	134	257	47,8
	1/12	92	211	56,4
	1/06	53	195	72,8
	1/03	14	170	91,7
	1/1,5	12	406	97,0

* A concentração dos detergentes está expressa em porcentagem e a do suco da planta em gramas de folha por ml da solução tampão.

O detergente que induziu menor reação tóxica em fumo foi o ODD, e a maior concentração que induziu um mínimo de reação na planta teste receptora foi 9%. A concentração do inibidor de *T. ulmifolia* que, apesar de não ter sido a que induziu maior inibição, foi considerada melhor para trabalhar foi a obtida com 1 g de folha em 3 ml de tampão. Em concentrações superiores o suco fica altamente viscoso e difícil de ser aplicado.

Também nestes experimentos o alquilbenzenosulfonato de sódio foi mais tóxico que o produto comercial acabado.

4.3. Resultados dos testes realizados com o suco de *T. ulmifolia* e com o detergente comercial ODD

Após escolha dos dois inibidores que melhor se conduziram nos testes exploratórios iniciais, passou-se a comparar os seus e feitos inibidores em uma série mais detalhada de testes.

4.3.1. Determinação do efeito inibidor exercido sobre diferentes vírus

Foram feitos três testes com 3 potyvirus e com o vírus do mosaico da alfafa, para determinar o efeito dos dois inibidores sobre a transmissão mecânica destes. Foram inoculados 120 mamoeiros e 90 feijoeiros (180 folhas) e os resultados estão apresentados na tabela 5. O suco de *T. ulmifolia* exerceu um efeito inibidor maior na transmissão do vírus do mosaico do mamoeiro (cerca de 96,6%) do que na dos três outros testados. A inibição provocada pelo ODD foi bem semelhante para os quatro vírus, tendo sido ligeiramente maior no caso do vírus do mosaico do mamoeiro (100%). No caso do vírus Y de Piracicaba e no da acro-necrose, o número de plantas que apresentaram posterior infecção sistêmica, foi também bem menor que o do controle.

Tabela 5. Resultados obtidos em testes onde se verificou o efeito dos -
dois inibidores na transmissão mecânica de três potyvírus e do
vírus do mosaico da alfafa

Vírus	Nº médio de lesões locais na folha tratada (LT), na controle(LC), nº de plantas que apresentaram infec- ção sistêmica entre as plantas tratadas(ST) e con- trole (SC) e porcentagem de inibição de infecção em 3 testes realizados com 10 mamoeiros e 5 feijoei- ros (10 folhas) em cada um (%IN)						<i>T. ulmifolia</i> ODD					
	LT	LC	ST	SC	%IN		LT	LC	ST	SC	%IN	
Y de Piracicaba	5	15	5	15	66,6		1	16	1	15	93,7	
Acro necrose	8	28	8	13	71,4		1	23	1	15	95,6	
Mosaico da alfafa	11	39	-	-	71,8		2	51	-	-	96,0	
Mosaico do mamoeiro	-	-	1	30	96,1		-	-	0	30	100,0	

4.3.2. Aplicação dos inibidores misturados com o inóculo ou a pós a inoculação mecânica do TMV

Estes testes foram realizados com o objetivo de investigar alguns aspectos relacionados ao mecanismo de ação do inibidor.

Os resultados obtidos em 3 testes, nos quais foram inoculadas de 12 a 14 folhas em cada um, estão discriminados na tabela 6. O suco de *T. ulmifolia* foi efetivo somente quando aplicado junto ou imediatamente após a inoculação mecânica. Quando aplicado 30 minutos após, foi totalmente ineficaz. No caso do ODD, este foi igualmente eficaz se aplicado junto com o inóculo ou 30, 60 minutos e 4 horas após a inoculação. não teve nenhum efeito quando aplicado depois de um intervalo de 24 horas.

4.3.3. Aplicação prévia dos inibidores em plantas de fumo e mamão e inoculação do vírus após vários intervalos de tempo

O objetivo principal destes testes foi o de determinar o tempo de duração do efeito inibidor das duas substâncias testadas, após sua aplicação às plantas.

Os resultados descritos na tabela 7, representam os dados obtidos em 3 experimentos utilizando em cada um 10 mamoeiros e cerca de 15 a 16 folhas de fumo TNN. O ODD exerceu praticamente a mesma inibição quando aplicado até 4 dias antes da inoculação mecânica. Após 8 dias sua inibição caiu um pouco, porém permaneceu alta (76,6% para o VMM e 81,3% para o TMV) e após 12 dias foi ainda capaz de inibir consideravelmente a infecção (40% para VMM e 60,7% para o TMV). O suco de *T. ulmifolia* após 4 e 8 dias de aplicação, teve seu efeito inibidor diminuído de 96,6% para 6,6 e 13,3% caindo para 10% 12 dias após. A inibição da formação de lesões locais pelo TMV caiu de 95 para 68,5 aos 4

Tabela 6. Resultados dos testes em que se aplicou o inibidor misturado com o inóculo ou após a inoculação do TMV a diferentes intervalos de tempo

Intervalo entre inoculação e aplicação do inibidor	Nº médio de lesões na meia folha tratada (T), controle (C) e porcentagem de inibição (%IN)					
	<i>T. ulmiifolia</i>			ODD		
	T	C	%IN	T	C	%IN
Junto com o inóculo	78	761	89,7	16	729	97,7
imediatamente após	185	847	78,1	24	759	96,8
30 minutos após	868	867	0	23	764	97,0
60 minutos após	799	801	0	36	844	95,7
4 horas após	930	926	0	40	835	95,2
24 horas após	788	787	0	817	815	0

Tabela 7. Resultados dos testes em que as inoculações mecânicas do vírus do mosaico do mamoeiro (VMM) e do fumo (TMV) foram feitas a diferentes intervalos de tempo após a aplicação do inibidor

Intervalo entre a aplicação do inibidor e a inoculação mecânica (dias)	Nº de plantas de mamão infetadas entre 30 tratadas (T) e controle (C) inoculadas e porcentagem de inibição(%IN) em 3 testes				Nº médio de lesões na meia folha de fumo tratada(T), controle(C) e porcentagem de inibição(%IN) em 3 testes realizados				
	T		C		T		C		
	%IN	T	%IN	C	%IN	T	%IN	C	
1	96,6	0	30	100	32	637	94,9	19	685
4	6,6	0	30	100	214	681	68,5	76	594
8	13,3	7	30	76,6	472	737	35,9	134	719
12	10,0	18	30	40,0	495	508	2,5	262	667

dias, aos 8 dias para 35,9% e aos 12 dias não exerceu praticamente mais nenhum efeito inibidor.

4.3.4. Aplicação dos inibidores na face inferior das folhas e inoculação na face superior

Nessa fase dos experimentos, os inibidores foram aplicados na face inferior da folha 24 horas antes da inoculação na face oposta, para investigar se haveria possibilidade de translocação do inibidor daquelas células para as que seriam inoculadas com o TMV ou VMM. Os dados obtidos estão representados na tabela 8, onde se pode observar que ambos os inibidores provocaram uma certa diminuição no número de lesões locais em relação ao controle, mesmo quando a aplicação se dá na face da folha e a inoculação na outra. Tanto para o TMV quanto para o VMM, o ODD foi mais efetivo que o suco de *T. ulmifolia*.

4.3.5. Efeito de diferentes concentrações dos inibidores sobre a infetividade do TMV a uma concentração constante

Foi testado o efeito inibidor do extrato foliar de *T. ulmifolia* em 5 concentrações e do ODD também em 5 concentrações, sobre a infetividade do TMV (inóculo padrão diluído 1/100 em tampão fosfato) - em plantas de fumo TNN.

Os resultados, discriminados nas tabelas 9 e 10 e figura 2, indicaram que a porcentagem de inibição de ambos os inibidores aumentou com a concentração destes.

4.3.6. Efeito de uma concentração constante dos inibidores sobre a infetividade do TMV em diferentes concentrações

Nesses testes, suco de *T. ulmifolia* na concentração de 1 g/20 ml e ODD a 3% foram testados sobre a infetividade de diferentes

Tabela 8. Resultados dos testes nos quais a aplicação do inibidor foi feita na face inferior da folha e as inoculações mecânicas, dos vírus do mosaico do mamoeiro e do fumo, na face superior

Inibidor	Nº de testes (T), de plantas inoculadas (INO) e infetadas (INF), número médio de lesões na meia folha tratada (LT) e controle (LC) e porcentagem de inibição (%IN)							
	Mamão				Fumo			
	T	INO	INF	%IN	T	LT	LC	%IN
suco de <i>T. ulmifolia</i> (1 g/3 ml)	4	40	34	15	3	378	500	35,9
Tampão fosfato (controle)	4	40	40	0	-	-	-	-
ODD - 9%	3	30	20	33,3	3	424	709	40,1
Água(controle)	3	30	30	0	-	-	-	-

Tabela 9. Resultados dos testes em que se investigou o efeito inibidor do extrato foliar de *T. ulmifolia* sobre o TMV a uma concentração constante

Conc. do inibidor (g/ml)	*Porcentagem de inibição da infecção obtida em 6 experimentos						Porcentagem média de inibição
	1	2	3	4	5	6	
1/1	78,8	89,2	85,9	88,7	96,4	93,1	87,6
1/5	71,5	91,5	80,0	86,3	92,7	87,0	83,7
1/25	39,0	48,2	44,6	43,5	56,9	48,6	45,0
1/125	18,3	25,4	20,7	21,5	22,3	20,8	21,0
1/625	15,2	21,0	20,0	19,0	19,9	18,9	18,8

* Não foi possível apresentar os resultados do número médio de lesões por meia folha devido a grande quantidade de dados que teriam que ser inseridos na tabela.

Tabela 10. Resultados dos testes em que se investigou o efeito de diferentes concentrações de ODD sobre a infetividade do TMV a uma concentração constante

Conc. do inibidor (%)	*Porcentagem de inibição da infecção obtida em 6 experimentos						Porcentagem média de inibição
	1	2	3	4	5	6	
10	93,5	90,7	97,7	95,9	93,6	97,7	93,7
1	72,7	75,1	74,3	76,5	82,1	88,4	78,3
10^{-1}	25,9	35,0	45,5	36,3	42,3	48,8	38,0
10^{-2}	17,1	21,6	23,4	22,5	19,8	31,8	22,2
10^{-3}	15,9	19,2	21,0	19,8	18,5	25,6	19,5

* Não foi possível apresentar os resultados do número médio de lesões por meia folha devido a grande quantidade de dados que teriam que ser inseridos na tabela.

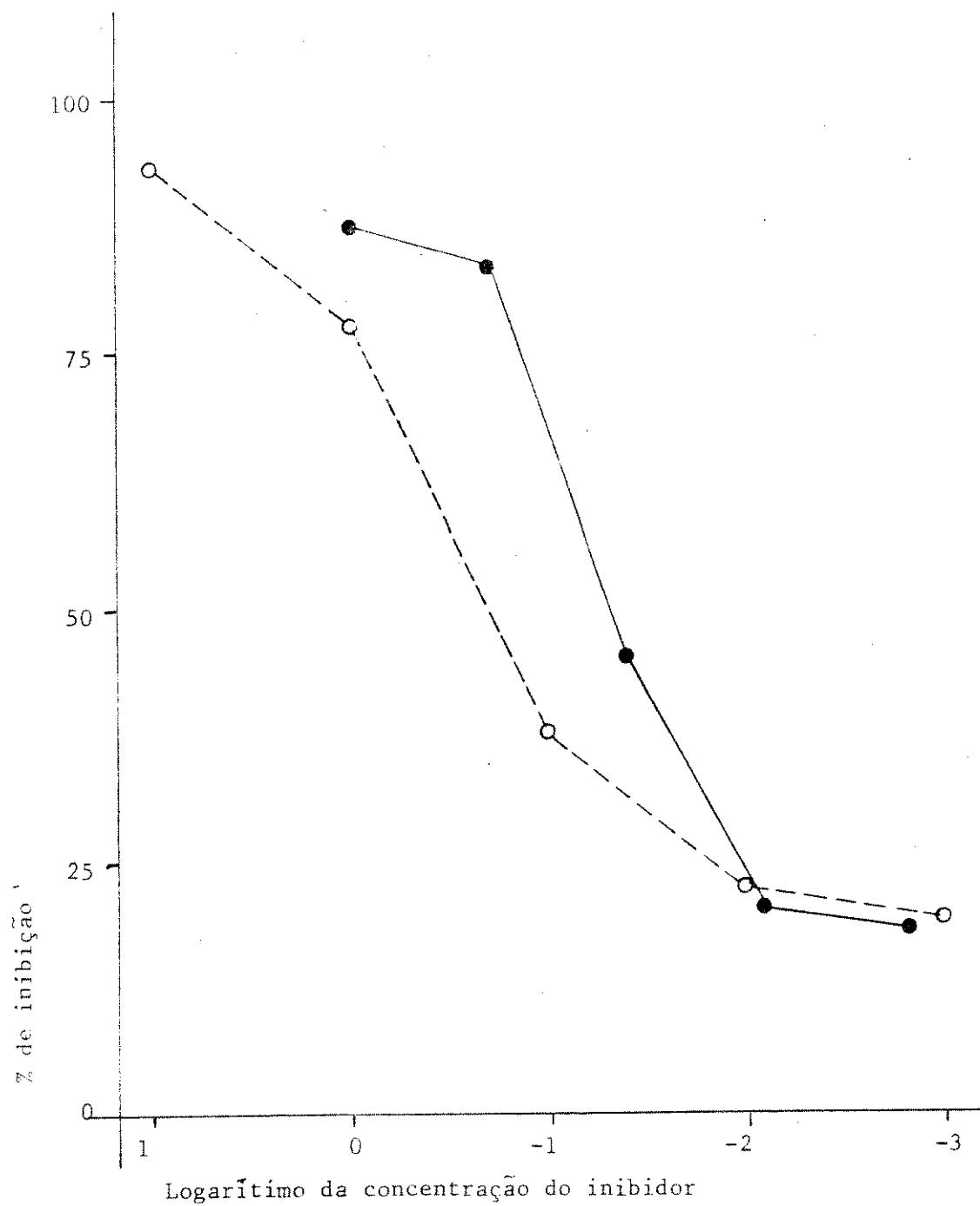


FIGURA 2. Efeito de diferentes concentrações de ODD em % (○---○) de *T. ulmifolia* em gramas de folha/ml tampão (●—●) - sobre a infetividade do TMV a uma concentração constante.

concentrações do TMV, obtidas por diluição do inóculo padrão com tampão fosfato 0,01M, pH 7.

Os resultados das porcentagens de inibição induzida pelos inibidores para cada concentração de TMV utilizada, se encontram nas tabelas 11 e 12 e figuras 3 e 4. Esses dados mostram que a porcentagem de inibição aumentou com a diluição do inóculo para ambos os inibidores.

Foi efetuada uma análise de regressão para as retas obtidas em cada uma das 6 repetições feitas para cada inibidor, colocando em abcissa o logaritmo das concentrações do vírus e em ordenada os números médios de lesões por meia folha observado quando o vírus foi inoculado nas meias folhas previamente tratadas e nas não tratadas (controle). O ajustamento dos pontos foi feito utilizando o método dos mínimos quadrados e a média geral desses pontos está representada na tabela 13. As inclinações das retas obtidas para as preparações de vírus tratadas com *T. ulmifolia* ($y = 292 + 82,7 x$) e respectivo controle ($y = 454 + 105 x$) diferiram significativamente entre si (figura 5). O mesmo ocorreu com as obtidas para as preparações tratadas com ODD ($y = 104,2 + 32,5 x$) e respectivo controle ($y = 378,2 + 98,3 x$), ilustradas na figura 6.

4.3.7. Ação sobre a ultra estrutura da partícula do TMV

O aspecto morfológico das partículas de TMV tratadas com ambos os inibidores não mostrou diferenças detectáveis nos testes de microscopia eletrônica realizados. A figura 7 mostra a distribuição da porcentagem de partículas nos diferentes comprimentos, calculados a partir da contagem e medição efetuadas em fotografias aumentadas 50.000 vezes, correspondentes a área de $8,784 \mu\text{m}^2$. As preparações referentes ao tratamento do vírus com o suco de *T. ulmifolia* deram uma maior porcentagem de partículas pequenas em relação ao controle e ao tratamento com ODD. Foi feita uma análise estatística do número de partículas com com-

Tabela 11. Efeito de uma concentração constante* de *T.ulmifolia* sobre a infetividade do TMV em diferentes concentrações

Conc.do inóculo padrão	Média do número total de lesões obtidas nos 6 experimentos		Porcentagem média de inibição (%IN)	Média do nº de lesões por meia folha obtidas nos 6 experimentos	
	Tratadas	Controle	%IN	Tratadas	Controle
1	5241	7224	27,4	338,8	456,2
10 ⁻¹	2839	5438	47,8	184,1	354,4
10 ⁻²	1272	3578	64,4	79,6	221,7
10 ⁻³	271	1924	85,9	17,9	128,0
10 ⁻⁴	79	681	88,4	5,0	44,1

*Concentração de *T.ulmifolia* = 1g/20 ml

Tabela 12. Efeito de uma concentração constante* de ODD sobre a infectividade do TMV em diferentes concentrações

Conc.do inóculo padrão	Média do número total de lesões obtidas nos 6 experimentos		Porcentagem média de inibição (%IN)	Média do Nº de lesões por meia folha obtidas nos 6 experimentos	
	Tratadas	Controle	%IN	Tratadas	Controle
1	2323	6612	64,9	145,2	413,2
10 ⁻¹	593	4175	85,8	36,7	260,8
10 ⁻²	189	2230	91,5	12,1	143,4
10 ⁻³	31	1209	97,4	1,9	78,1
10 ⁻⁴	3	299	99,2	0,15	13,1

*Concentração do ODD - 3%

Tabela 13. Resultado do ajustamento feito pelo método dos mínimos quadrados

Conc.do inóculo padrão (log)	Média dos pontos obtidos para os inibidores indicados			
	ODD		<i>T. ulmifolia</i>	
	Tratadas	Controle	Tratadas	Controle
0	104,2	378	292	454
-1	71,7	280	209	349
-2	39,2	182	127	244
-3	6,8	83	44	139
-4	-25,7	-15	-39	34

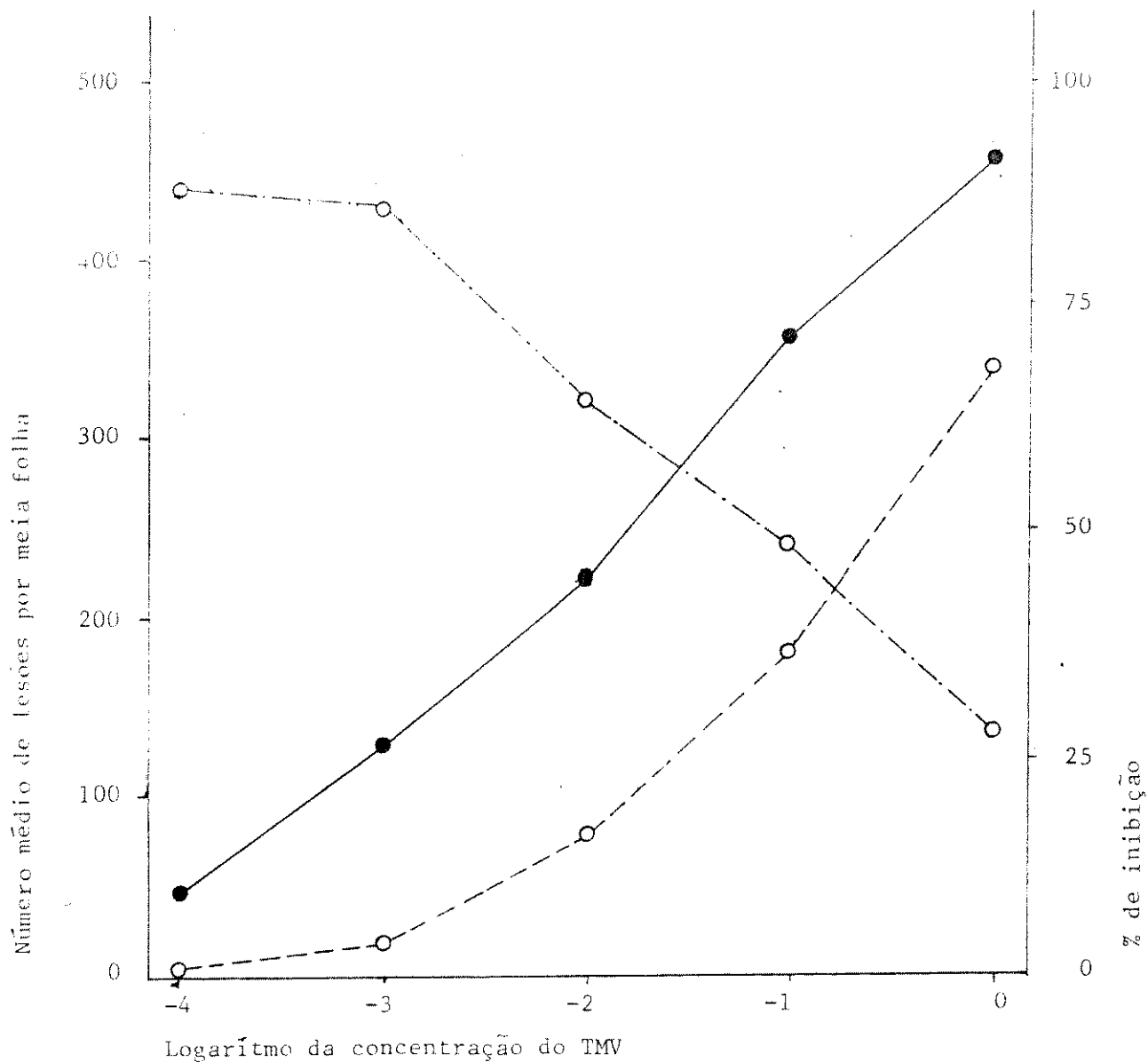


FIGURA 3. Diagrama do número médio de lesões por meia folha correspondente ao TMV (●—●), ao TMV + extrato foliar de *T. ulmifolia* (○----○) e porcentagem de inibição (○---○) obtida quando se fez variar a concentração do vírus, mantendo-se a do inibidor constante.

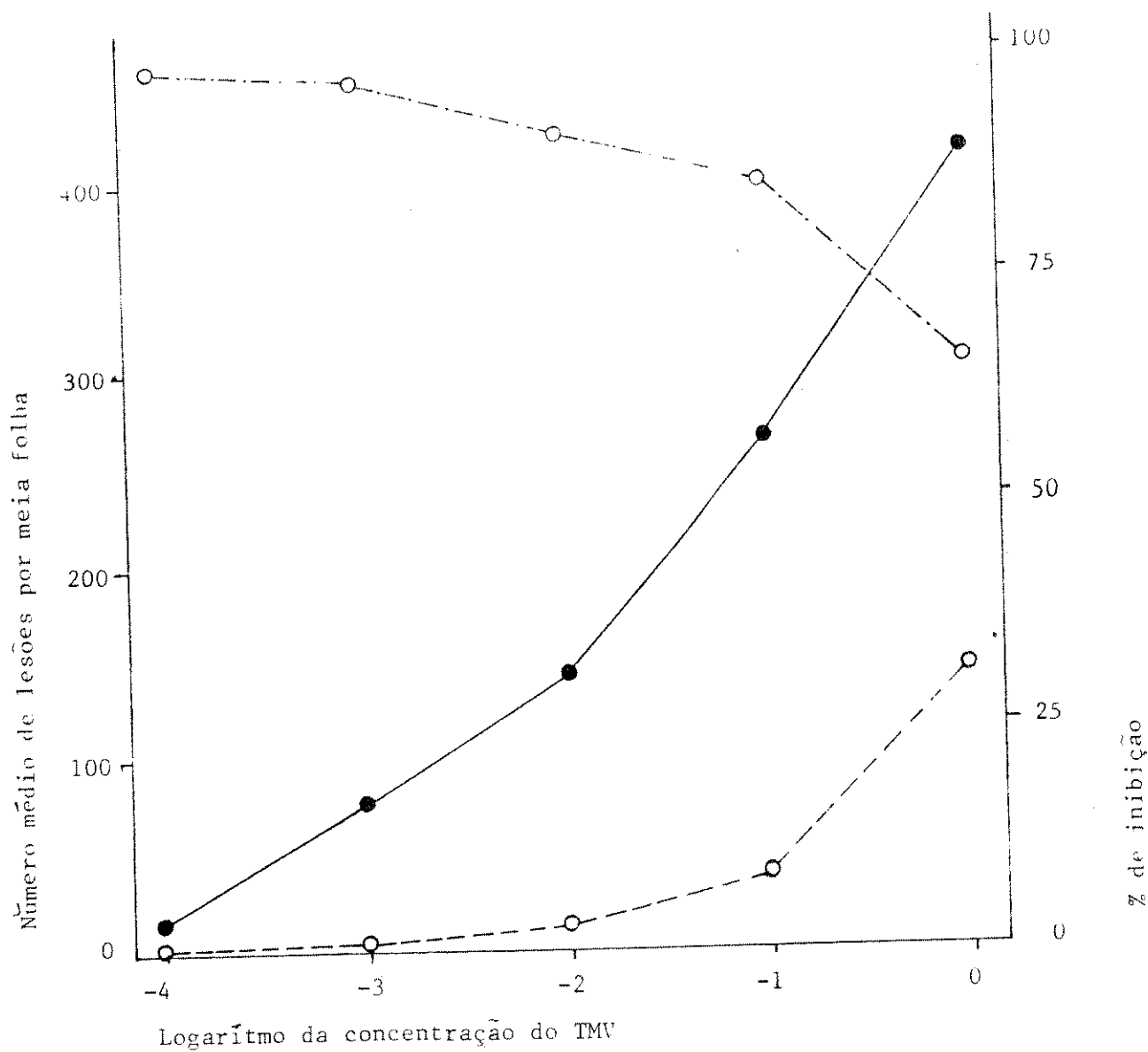


FIGURA 4. Diagrama do número médio de lesões por meia folha correspondente ao TMV (●—●), ao TMV + ODD (○---○) e porcentagem de inibição (○---○) obtida quando se fez variar a concentração do vírus, mantendo-se a do inibidor constante.

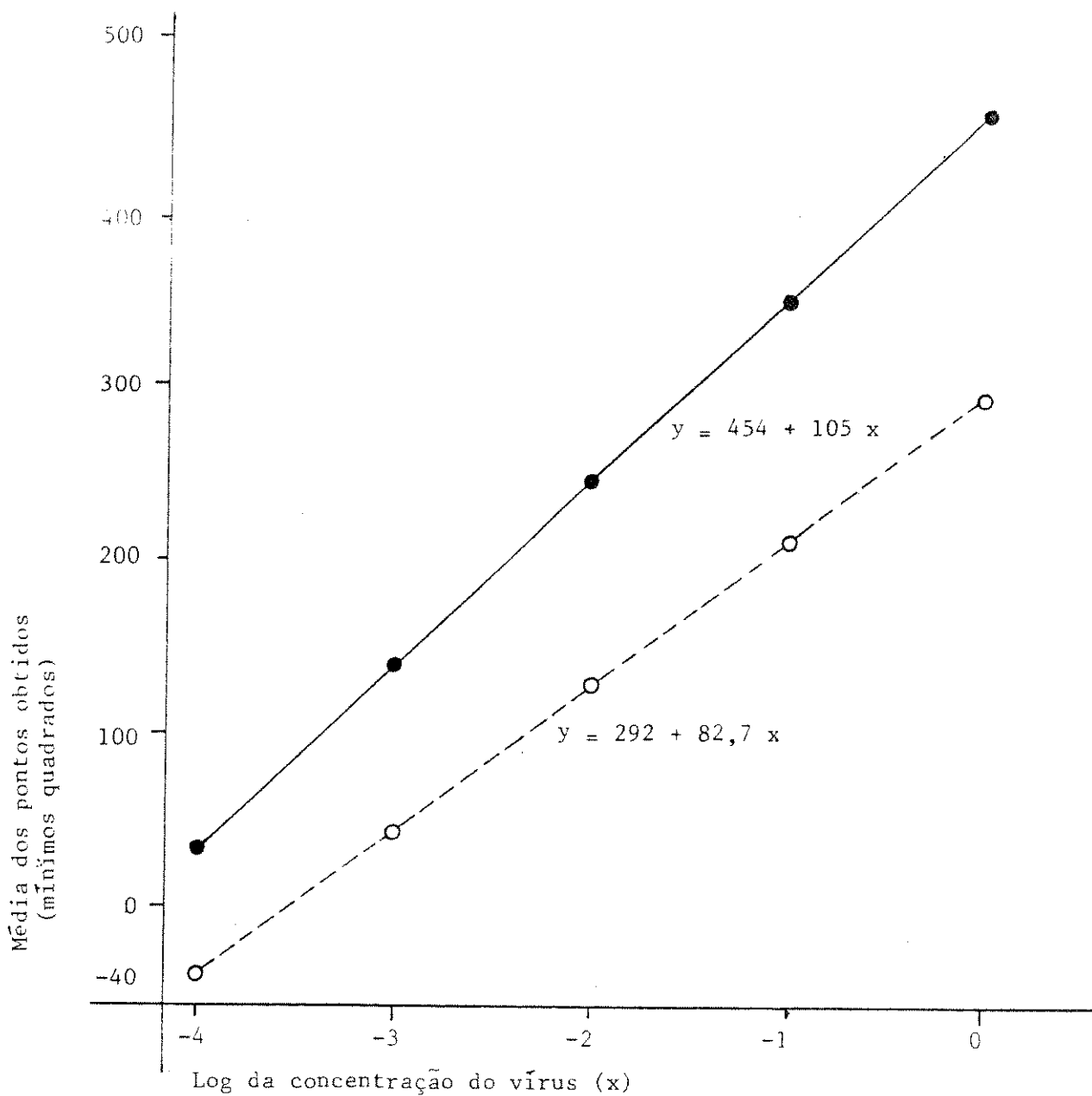


FIGURA 5. Linhas de regressão calculadas para o TMV controle (●—●) e para o TMV + suco de *T. ulmifolia* (○---○), a partir dos resultados do ensaio biológico sobre o efeito deste na infetividade do TMV em diferentes concentrações.

51741BC

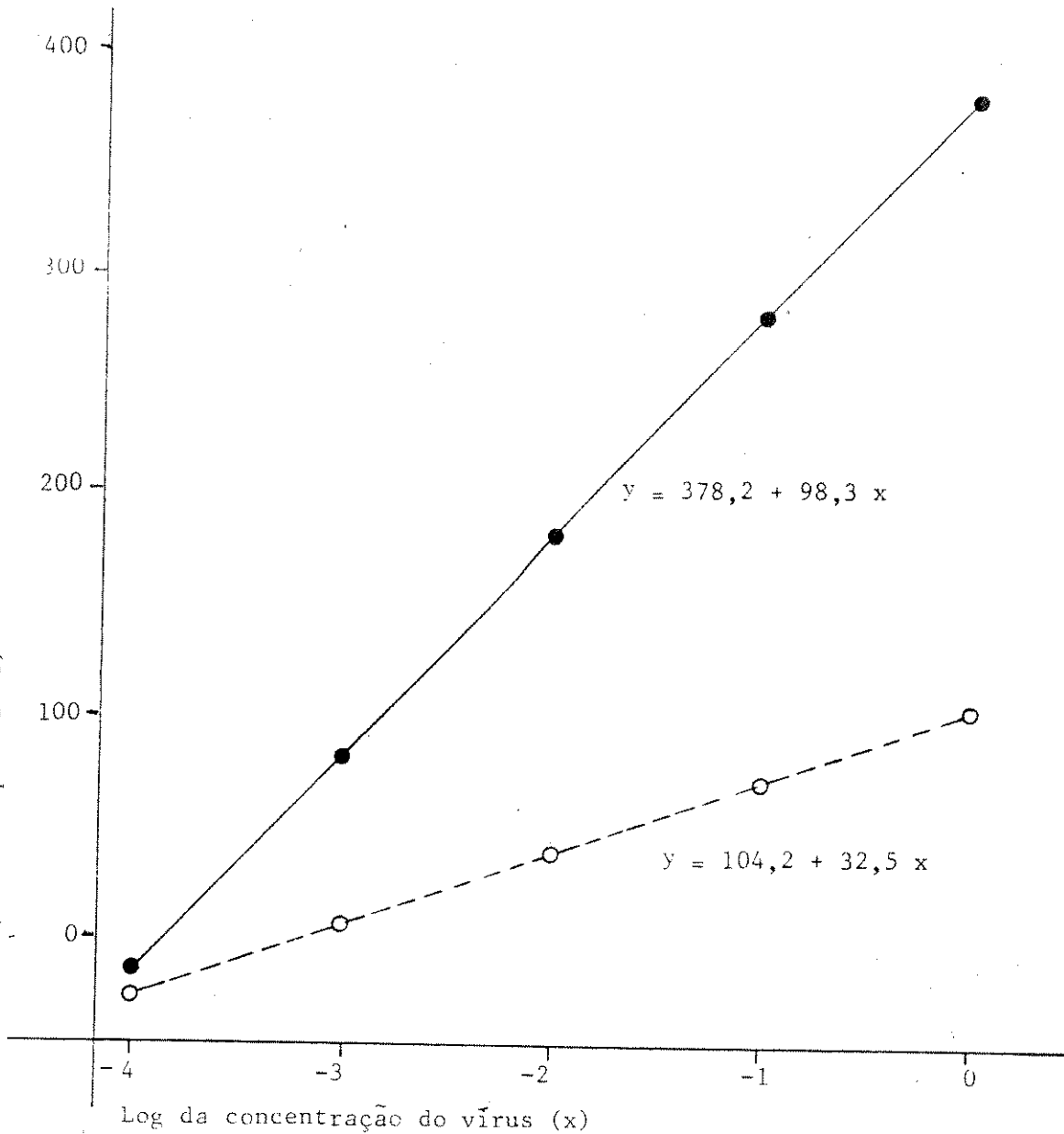


FIGURA 6. Linhas de regressão calculadas para o TMV controle (●—●) e para o TMV + ODD (○---○), a partir dos resultados do ensaio biológico sobre o efeito do ODD na infetividade do TMV em diferentes concentrações

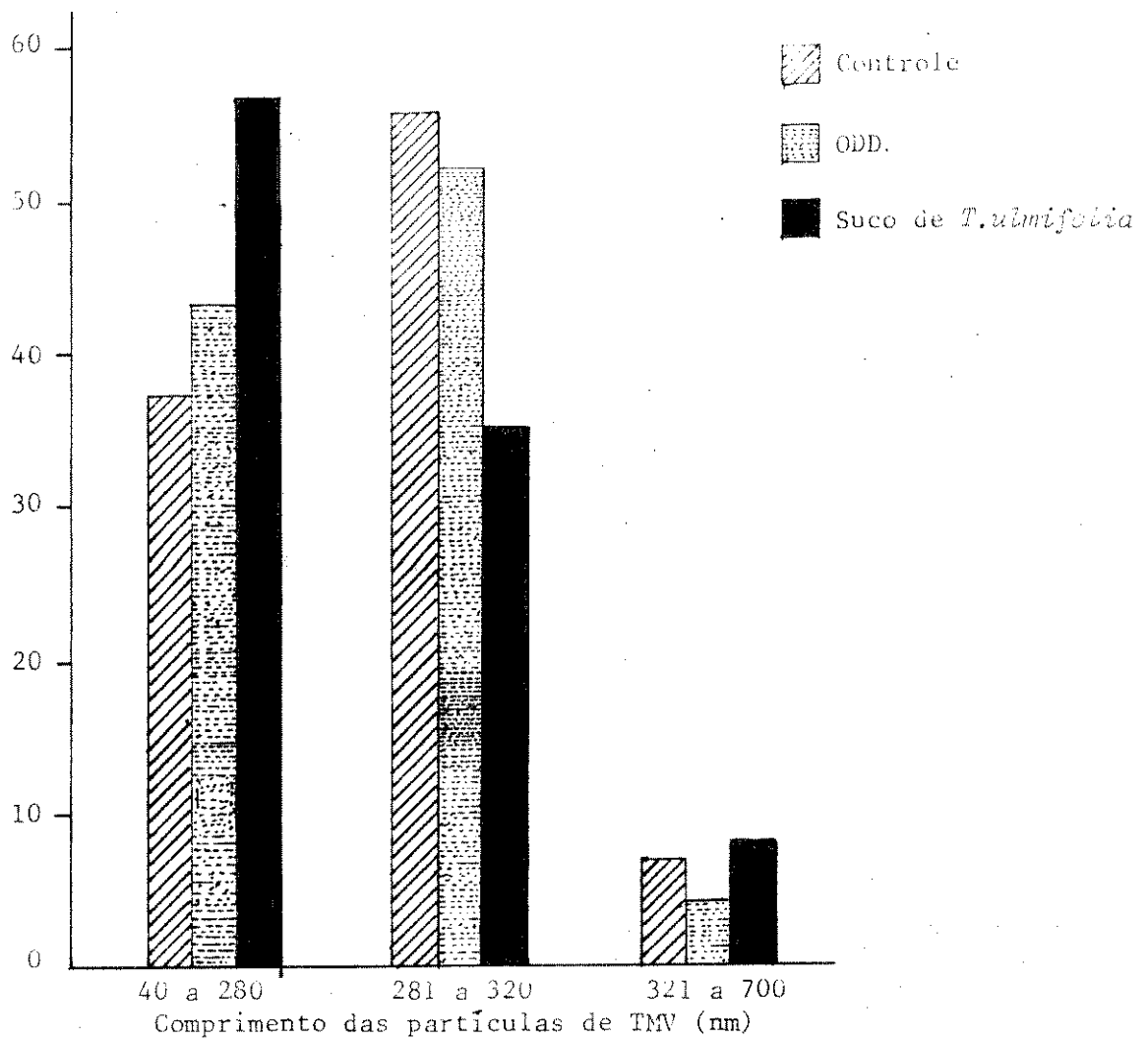


FIGURA 7. Frequência das partículas por comprimento, nas preparações de TMV tratadas e controle

primento menor que 280 nm (entre 40 e 280 nm) presentes em 5 diferentes campos fotográficos de cada uma das 3 preparações. Os resultados revelaram que o número de partículas dentro dessa faixa de comprimento existentes nas preparações referentes ao tratamento das partículas virais com o inibidor de *T. ulmifolia* diferiu significativamente das duas outras segundo o teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade.

4.3.8. Influência do inibidor sobre a reação serológica entre a partícula do TMV e o antissoro

A figura 8 (eletromicrografias a - c) representa os resultados obtidos nos testes em que telinhas de cobre previamente cobertas com moléculas de anticorpo foram colocadas sobre a mistura vírus - inibidor e vírus tampão (controle). A eletromicrografia designada pela letra a representa a mistura vírus-inibidor de *T. ulmifolia*, a b vírus-ODD a 9% e a c representa o controle. O que se pode observar é que no controle o número de partículas que se ligaram à telinha foi muito maior do que nas 2 outras preparações em que o vírus foi tratado com os inibidores.

Foi feita uma contagem das partículas presentes em 5 diferentes campos fotográficos de cada um dos tratamentos e do controle, e os resultados obtidos foram analisados estatisticamente. Segundo o teste de Tukey, o número de partículas presentes nas preparações em que o vírus foi tratado com os dois inibidores não diferem entre si, mas ambos são significativamente menores que o do controle ao nível de 1% de probabilidade. A figura 9 mostra o número de partículas em cada tratamento.

A figura 10 mostra as eletromicrografias referentes às preparações nas quais as partículas de TMV foram tratadas com o inibidor de *T. ulmifolia* (d) ou com tampão fosfato 0,01M, pH 7 (e) e "decoradas" com moléculas de anticorpo. Pode-se observar que as partículas trata -

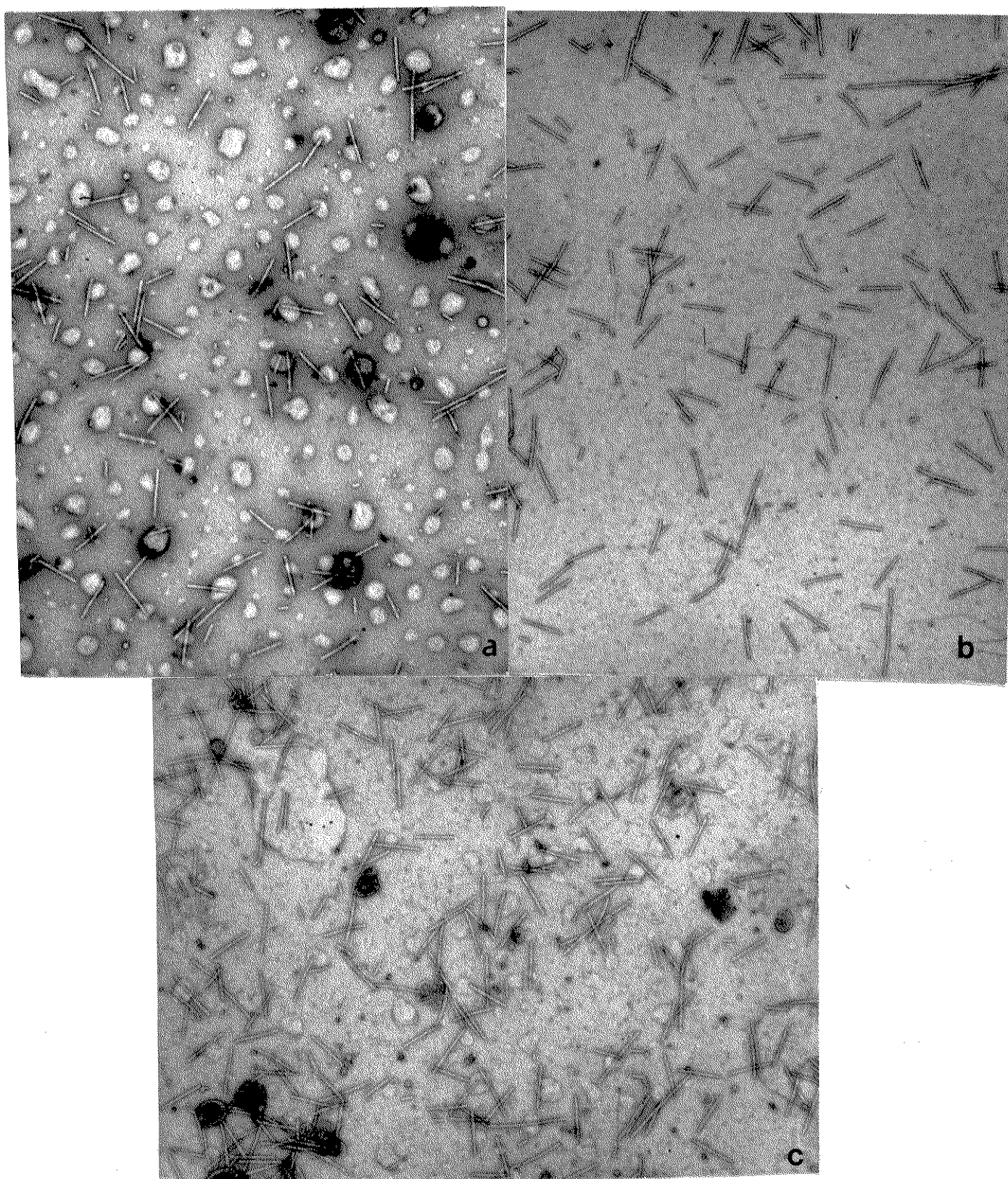


FIGURA 8. Eletronmicrografias mostrando a reduçãõ no número de partículas aderidas às telinhas cobertas com antissoro (SSEM) induzida pelo tratamento do vírus (antígeno) com o inibidor de *T.ulmifolia* (a) e ODD (b) em comparação com o controle tratado apenas com água ou tampão fosfato (c).

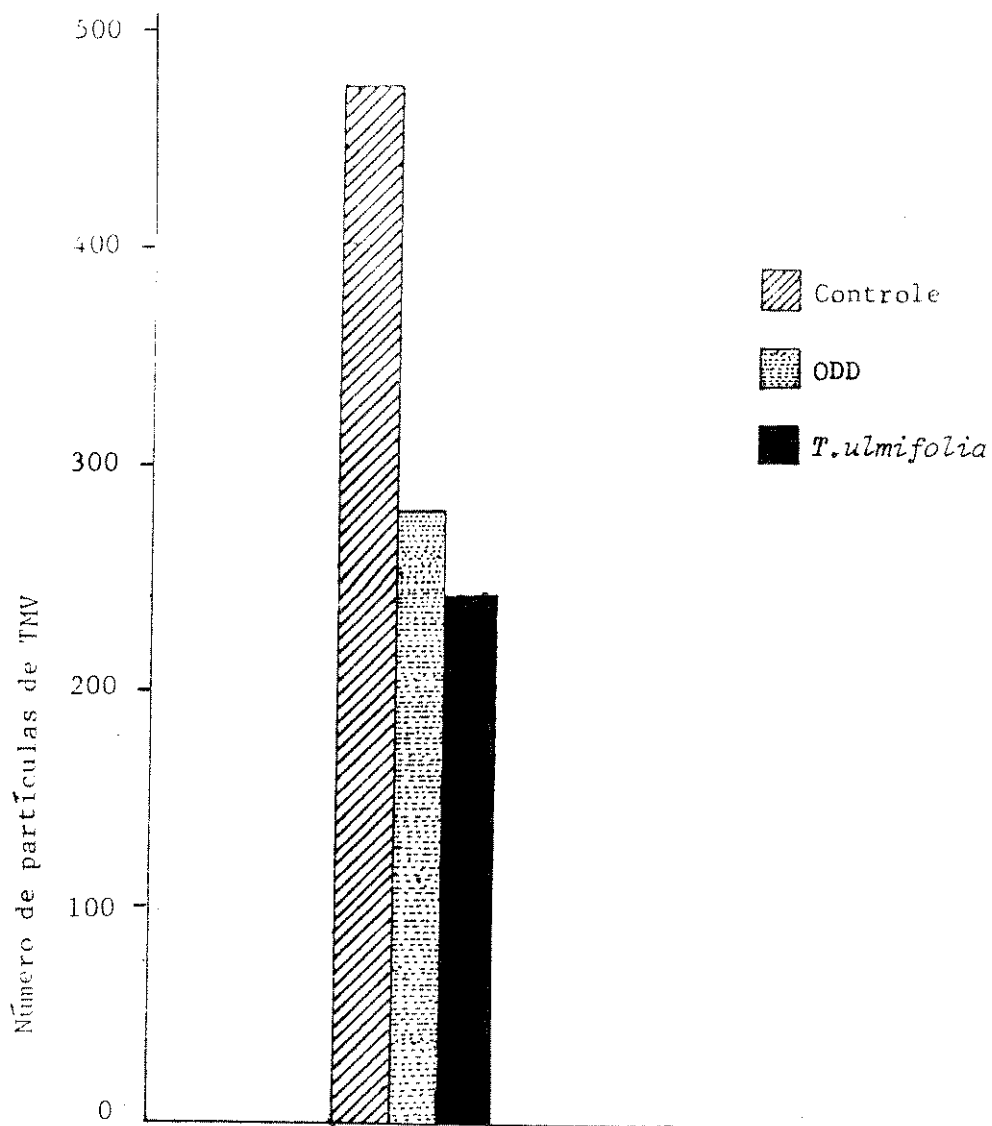


FIGURA 9. Número de partículas observadas em telinhas contendo antissoro colocadas em preparações de vírus (TMV) tratadas ou não com o inibidor.

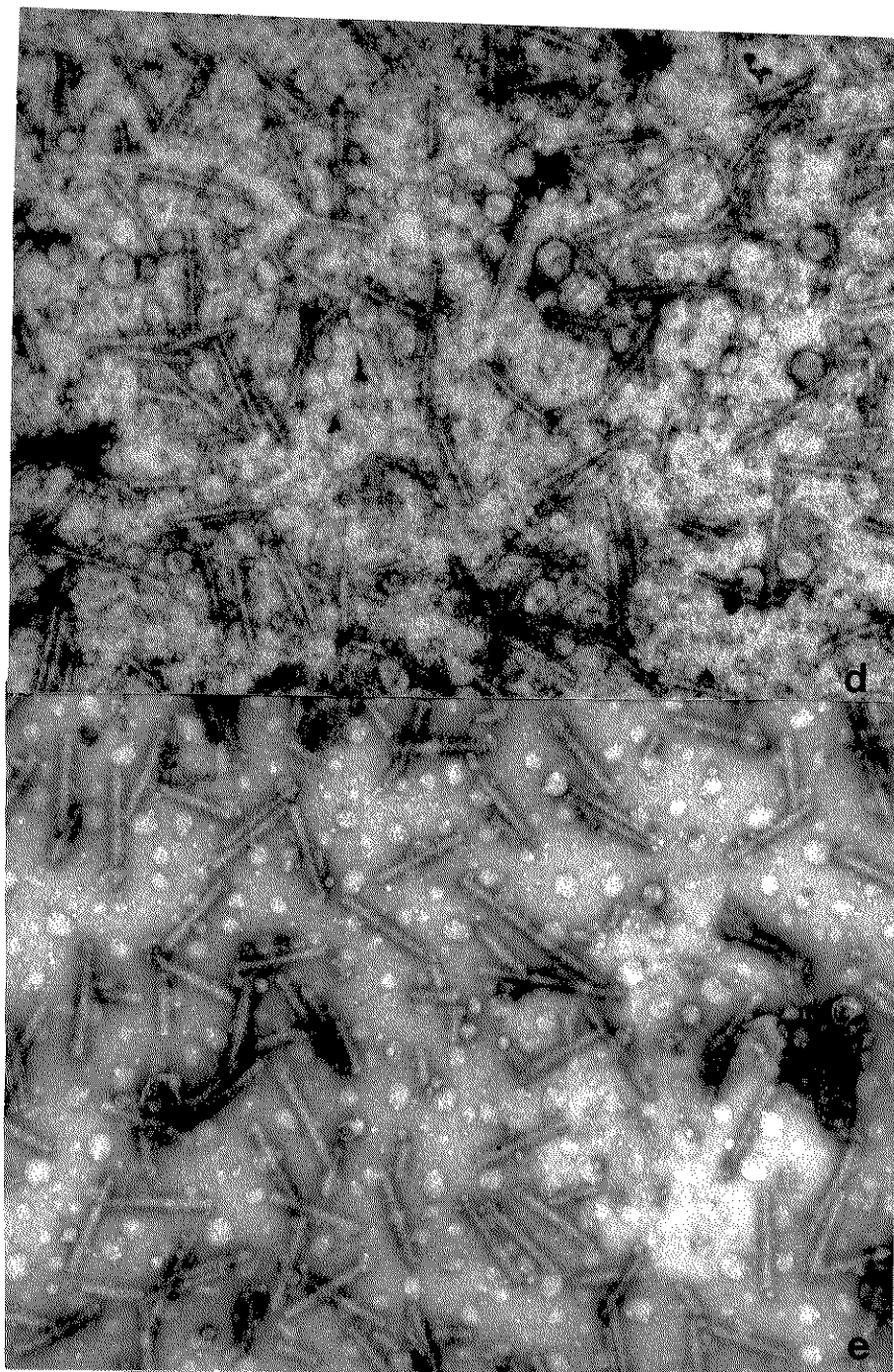


FIGURA 10. Eletromicrografias mostrando a interferência do inibidor de *T. ulmifolia* na decoração de partículas de TMV, que foram recobertas por um número muito menor de moléculas de anticorpo (d) quando tratadas com este inibidor do que quando foram tratadas com tampão fosfato nas preparações controle (e)

tadas com tampão fosfato presentes nas preparações que serviram como controle foram intensamente "decoradas" com moléculas de anticorpo ao passo que as tratadas com o inibidor não mostraram praticamente nenhuma decoração.

As telinhas com vírus que foram colocadas em ODD e depois no antissoro mostraram que não havia partículas em todos os campos examinados, indicando que estas haviam sido desprendidas das mesmas pelo detergente.

4.3.9. Efeito sobre a disseminação do VMM através do vetor

Mamoeiros previamente tratados por pulverização foliar com os inibidores foram submetidos à transmissão através do vetor virulífero *Myzus persicae*. Os resultados expressos na tabela 14, mostraram que nenhum dos dois inibidores exerceu efeito significativo sobre a transmissão do VMM pelo afídeo vetor.

4.3.10. Redução na disseminação mecânica do TMV em operações de transplante de fumo e tomate

Nestes experimentos os inibidores foram utilizados na operação de transplante de fumo e tomate sob condições de estufa. Foram feitos 6 experimentos empregando 45 mudas de fumo e 45 de tomate - para cada tratamento, perfazendo 450 plantas por experimento e 2.700 / plantas no total. Os resultados para o transplante de mudas de tomate e de fumo bem como de sua análise estatística estão representados nas tabelas 15 e 16. Algumas plantas de tomate morreram após o transplante, de modo que foram apresentados os números das plantas que sobreviveram. Tanto para o fumo como para o tomate os dois tratamentos que se destacaram dos demais e do controle, mostrando uma grande redução na disseminação em relação ao controle, foram aqueles nos quais as mãos contaminadas foram lavadas em suco de *T. ulmifolia* na concentração de 1 g/3 ml e em ODD a 9% antes do transplante.

Tabela 14. Determinação do efeito dos inibidores sobre a transmissão do vírus do mosaico do mamoeiro - pelo vetor *Myzus persicae*

Tratamento	Nº de testes	Nº de afi- deos por planta	Nº de plantas i- noculadas (INO) , infetadas (INF) e porcentagem de infecção (%INF)		
			INO	INF	%INF
Suco de <i>T. ulmi- folia</i>	3	20	30	28	93,3
Tampão fosfato (controle)	3	20	30	27	90,0
ODD-9% (3 pul- verizações)	4	25	40	35	87,5
Água (controle)	4	25	40	38	95,0

Tabela 15. Resultados obtidos nos testes em que se determinou o efeito dos inibidores na redução da disseminação do TMV na operação de transplante de mudas de fumo

Tratamento inibidor	Número de plantas sadias (S), doentes (D) e média* das porcentagens de infecção obtida nos 6 experimentos (%INF)																	
	1		2		3		4		5		6						%INF	
	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S
ODD-9% - Lavagem de mãos	8	37	4	41	4	41	4	41	5	40	6	39	8	27	13,0	a		
Suco de <i>T. ulmifolia</i> 1g/3ml-lavagem de mãos	10	35	9	36	12	32	10	35	14	36	16	29	16	29	26,3	b		
Suco de <i>T. ulmifolia</i> 1g/15ml - lavagem de mãos	16	29	14	31	21	24	26	19	24	21	22	23	22	23	45,6	c		
ODD- 9% -pulverização prévia das mudas	18	27	25	20	23	22	21	24	26	19	29	16	29	16	52,6	cd		
Controle	24	21	26	19	27	18	30	15	35	10	33	12	33	12	64,8	d		

*Médias seguidas da mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 16. Resultados obtidos nos testes em que se determinou o efeito dos inibidores na redução da disseminação do TMV na operação de transplante de mudas de tomate

Tratamento inibidor	Número de plantas sadias (S), doentes (D) e média* das porcentagens de infecção obtida nos 6 experimentos(%INF)												
	1		2		3		4		5		6		%INF
	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	
ODD - 9% - lavagem de mãos	4	41	8	34	5	35	5	28	4	36	3	39	12,2 a
Suco de <i>T. ulmiifolia</i> 1g/3ml - lavagem de mãos	12	30	11	30	16	26	15	20	27	16	17	23	38,6 b
Suco de <i>T. ulmiifolia</i> 1g/15 ml - lavagem de mãos	18	25	13	29	24	14	17	19	33	12	23	19	51,8 c
ODD - 9% - pulverização prévia das mudas	35	17	30	13	18	20	24	16	38	6	35	7	67,7 cd
Controle	23	17	34	8	31	13	33	5	36	4	34	8	77,8 d

* Médias seguidas da mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Quando as mudas foram previamente pulverizadas com ODD a 9% antes de serem transplantadas com mãos contaminadas a porcentagem de infecção não diferiu muito do controle, além do fato de as mudas de tomate terem apresentado reação de alta fitotoxicidade externada por engorvinhamento e deformação das folhas devidas à pulverização. Lavagem de mãos contaminadas com suco de *T. ulmifolia* diluído (1 g/ 15 ml), apesar de ter sido um pouco melhor no transplante de mudas de fumo, foi superado pelos dois anteriores.

4.4. Resultados das tentativas iniciais de purificação do inibidor de *T. ulmifolia*

As atividades inibidoras das diferentes amostras coletadas ao longo do processo de purificação do princípio inibidor existente no suco de *T. ulmifolia*, bem como das outras alternativas experimentadas, estão discriminadas na tabela 17. As porcentagens de inibição foram calculadas em relação à da induzida pela aplicação do suco bruto.

A amostra 1, que representou o suco da planta extraído em tampão fosfato e centrifugação, apresentou atividade sempre ligeiramente maior que a do suco bruto. Os demais resultados obtidos na avaliação da atividade inibidora das diferentes amostras revelaram que o inibidor não foi retido pela coluna de Sephadex G-25 (amostras 2 e 5), e que dos métodos experimentados para precipitação das proteínas, aquele em que se fez a acidificação do suco a pH 4,3 e posterior adição de 1,6 volumes de etanol apresentou resultado melhor (amostra 5 e 6) do que quando foi feita precipitação com etanol sem acidificação prévia (amostra 4) ou com sulfato de amônia (amostra 3).

Os resultados das amostras de número 8 a 11, correspondentes às alíquotas retiradas das frações obtidas na eluição da coluna de CM-celulose, na etapa final do processo de purificação utilizado, sugerem que o inibidor deve ter sido eluído na fração b, representada pela amostra 9.

Tabela 17. Resultados dos valores de inibição -
obtidos nas diferentes sequências e
etapas do processo de purificação do
inibidor de *T. ulmifolia*

Amostra	Nº médio de lesões ob- tidas nos experimentos		Porcentagem média de i- nibição
	Tratadas	Controle	
Suco bruto	19	191	90,0
1	12	273	95,6
2	160	297	46,1
3	65	257	74,7
4	72	290	75,1
5	19	348	94,5
6	1	115	99,1
7	6	108	94,4
8	88	113	22,1
9	42	158	73,4
10	151	196	22,9
11	84	117	28,2

4.5. Tratamentos realizados com a fração b contendo o inibidor purificado

No final do processo utilizado para purificação do inibidor de *T. ulmifolia* a segunda fração (amostra 9), eluída na coluna / de CM- celulose, que apresentou a maior atividade indicando a presença maior quantidade da substância inibidora, foi submetida a alguns testes visando a caracterização de sua natureza química.

4.5.1. Tratamento enzimático, com TNBS, EDTA e concentração a vácuo

A avaliação da atividade inibidora das diversas amostras testadas foi feita utilizando-se o TMV em plantas de fumo TNN. Os resultados dos tratamentos do inibidor com tripsina, quimiotripsina, papaína, TNBS e EDTA estão representados na tabela 18. Os dois tratamentos que pareceram afetar a atividade do inibidor foi o com papaína e TNBS. O primeiro reduziu a atividade inibidora da fração b de 71,5 / para 37% e o segundo para 43%. O EDTA inibiu a formação de lesões locais tanto na meia folha tratada como na controle. A alíquota que foi submetida à concentração a vácuo apresentou atividade de 97,6%.

4.5.2. Dosagem de proteínas e carboidratos

A dosagem de proteína pelo método de comassie blue, na fração purificada, indicou uma concentração de 74 mg/ml. A concentração de carboidrato determinada pelo método de antrona foi de 11 mg/ml.

4.5.3. Atividade RNase

A fração purificada não apresentou nenhuma atividade de RNase.

Tabela 18. Resultados obtidos nos testes em que o inibi-
dor foi submetido a diferentes tratamentos

Fração purificada (b) submetida aos tratamentos abaixo	Nº médio de lesões - por meia folha		Porcentagem média de i- nibição
	Tratadas	Controle	
S/tratamento (controle)	109	384	71,6
Tripsina	60	210	71,4
Quimiotripsina	100	301	66,7
Papaina	185	294	37,0
TNBS	146	256	43,0
EDTA	0	0	-
Concentração a vácuo	3	130	97,6

4.5.4. Estabilidade em relação à temperatura

Os resultados do efeito da temperatura sobre a atividade do inibidor estão representados na tabela 19. Mesmo quando incubado a 100°C durante uma hora o inibidor não teve sua atividade alterada.

Tabela 19. Efeito da temperatura sobre a infetividade
de do inibidor (fração b)

Tempo (minutos) de aquecimento a 100°C	Nº médio de lesões- por meia folha		Porcentagem média de i nibição
	Tratadas	Controle	
0(controle)	45	141	68,0
10	31	111	72,0
20	42	131	67,9
30	44	129	65,9
60	43	134	67,9

5. DISCUSSÃO

O fato de diversos detergentes comerciais terem reduzido a transmissão mecânica do vírus do mosaico do mamoeiro sugeriu que essa inibição deveria ter sido induzida por uma substância comum a todos eles. Testes efetuados indicaram que essa substância é o alquilbenzeno sulfonato de sódio, utilizado como matéria prima na fabricação destes produtos. Maior ou menor atividade inibidora apresentada pelos detergentes de diferentes marcas pode ter sido devida à concentração desse princípio ativo em cada um deles.

A maior toxicidade causada pelo alquilbenzenosulfonato de sódio, em relação aos detergentes comerciais, foi interpretada como sendo devida às formulações empregadas nesses últimos, que visam atenuar as características originais do princípio ativo para que eles não tenham efeito deletério sobre a pele e possam ser utilizados sem restrições na limpeza doméstica. A diferença na fitotoxicidade observada para as diferentes marcas de detergentes reforçam essa hipótese.

O aumento na injúria foliar causado pelos detergentes quando aplicados junto com o inóculo, pode ter sido devido à introdução de uma maior concentração destes dentro das células, em pontos onde a pressão exercida pelo processo de inoculação foi maior. Quando aplicado antes, estariam uniformemente distribuídos por toda a superfície e

não haveria coincidência de serem introduzidos em maior quantidade nos pontos de maior pressão.

Os resultados obtidos com a aplicação dos inibidores antes e após a inoculação mecânica, os colocam, segundo a classificação de BAWDEN (1954) na categoria de inibidores de infecção. Por outro lado, o fato de o suco de *T. ulmifolia* ter sido eficiente somente se aplicado antes ou imediatamente após a inoculação mecânica, sugeriu a possibilidade de a ação desse se dar no sentido de impedir a ligação inicial vírus-célula, enquanto que o ODD, que continuou sendo eficiente mesmo quando aplicado 4 horas após a inoculação mecânica, pareceu ser capaz de inibir antes ou após essa ligação já ter ocorrido.

VAN KAMMEN *et al.* (1961), trabalhando com inibidor do suco de cravo, constatou que o efeito da aplicação do mesmo após a inoculação decresceu rapidamente com o prolongamento do período entre a inoculação e aplicação do inibidor. Segundo esses autores, após 30 minutos, ocasião em que o suco de cravo teve apenas um leve efeito inibitório, a maioria das partículas estariam então irreversivelmente ligadas aos sítios suscetíveis. Essa hipótese poderia ser considerada válida para o inibidor de *T. ulmifolia*, ao passo que o ODD, que agiu de um modo diferente, seria capaz de desprender o vírus de seus sítios receptores.

TANIGUCHI (1976) estudando o efeito de vários detergentes sobre a infetividade do TMV, determinou que os mesmos não tiveram nenhum efeito inibidor quando aplicado algum tempo antes da inoculação e que exerciam maior efeito quando aplicado logo após ou até 3 dias após a inoculação mecânica. Os resultados obtidos neste trabalho concordam com os obtidos por esse autor quanto à aplicação após a inoculação, mas discordam totalmente quanto à aplicação antes. Como se pode observar pelos dados da tabela 8, os detergentes exerceram efeito inibitório mesmo quando aplicados até 12 dias antes da inoculação, resultados esses que foram detectados tanto para o TMV como para o vírus do mosaico do mamoeiro.

O efeito inibidor do suco de *T. ulmifolia* também se manteve até 8 dias após sua aplicação para o vírus do mosaico do fumo. Para o vírus do mosaico do mamoeiro esse efeito permaneceu somente até 1 dia após a aplicação o que pode ser explicado por dois fatos principais: primeiro, porque a planta-teste de mamoeiro cresce rapidamente / no estágio em que é utilizada levando à expansão das folhas tratadas, o que faz com que haja locais onde o inibidor não está presente, ou acha-se diluído. Como esse não é sistêmico, essas áreas seriam pontos suscetíveis para infecção viral. No caso das plantas de fumo, as folhas do topo foram eliminadas, e as que restaram estavam quase que no seu tamanho máximo de expansão ao serem utilizadas. Outro fato a ser considerado é que o vírus do mosaico do mamoeiro invade sistemicamente a planta, de modo que não dá para quantificar a inibição senão por contagem de plantas doentes. Pode ser que a redução de infecção causada por esse inibidor não tenha sido suficiente para impedir que as partículas que conseguiram estabelecer a relação inicial vírus-planta se replicassem e invadissem sistemicamente a mesma. Pelos resultados da tabela 8, pode-se observar que a infecção cai de 94,9% para 68,5% no quarto dia e para 35,9% no oitavo. Essa redução que pode ser quantificada por lesões locais poderia não ser detectável com vírus que invadem sistemicamente a planta.

Inúmeras hipóteses tentando explicar se a ação dos inibidores se dá sobre o vírus ou sobre a planta, têm sido formuladas. - GUPTA E PRICE (1950) tomaram 5 evidências como sendo indicativas de que os inibidores agem sobre a planta: 1) aumento de inibição pelo aumento do período entre a aplicação prévia do inibidor e inoculação; 2) separação da partícula viral biologicamente ativa da mistura vírus-inibidor; 3) indução de inibição mesmo quando aplicados em faces opostas da folha; 4) porcentagem de inibição mais ou menos constante quando se faz variar a concentração do vírus. VAN KAMMEN *et al.* (1961) foram um pouco além na interpretação de experimentos nos quais determinaram a varia-

ção do número de lesões locais fixando a concentração do inibidor e variando a do vírus. Analisando matematicamente os resultados, concluíram que a inclinação das retas obtidas em gráficos nos quais colocaram os logarítimos da concentração do vírus em abcissas e o número de lesões locais obtidos para preparações virais, tratadas ou não pelo inibidor, em ordenadas poderia dar indicações sobre o mecanismo e o provável local de ação do inibidor, se sobre o vírus ou sobre a planta.

Neste trabalho o aumento da inibição obtida com a diminuição da concentração do vírus quando foram fixadas as concentrações de ODD e de *T. ulmifolia* e a análise de regressão das retas obtidas para cada inibidor e respectivos controles sugeriram uma possível ação de ambos os inibidores sobre o vírus.

Outra evidência de que os inibidores podem exercer uma ação sobre a partícula viral foi obtida em testes de microscopia eletrônica imuno-específica. Neste trabalho, pode-se observar que o tratamento do TMV com o inibidor de *T. ulmifolia* e com ODD não provocou a perda de sua capacidade antigênica, o que concorda com os dados obtidos por FELDMAN (1963) e MORAES (1973) com a utilização do teste de dupla difusão em agar. Mas, a técnica utilizada neste trabalho permitiu observar que menor número de partículas foram aderidas em telinhas cobertas com antissoro e colocadas na mistura vírus-inibidor do que na mistura vírus-tampão, tanto quando o inibidor utilizado foi o ODD como quando foi o de *T. ulmifolia*. E, no caso de partículas aderidas e tratadas com o suco de *T. ulmifolia* e posteriormente decoradas, observou-se que havia um número muito menor de moléculas de anticorpo nas superfícies de partículas tratadas em relação ao controle. Esses resultados obtidos constituíram evidências de que ambos os inibidores parecem agir sobre as partículas alterando sua capacidade de reação com o antissoro.

Não foi possível verificar o efeito do ODD sobre a decoração do vírus porque todas as partículas que haviam sido aderidas nas telinhas contendo antissoro foram desprendidas destas quando colocadas no referido detergente. Esse fato sugere uma certa analogia com o que aconteceu na inibição da infecção do TMV pela aplicação do ODD 4 horas após a inoculação mecânica. É possível que a ligação vírus-sítios receptores da célula possa ser da mesma natureza que vírus-anticorpo, podondo o detergente enfraquecê-la, desligando-a.

A ultra estrutura das partículas tratadas com ambos os inibidores não mostrou diferenças significativas, mas no caso em que as partículas foram tratadas com o inibidor de *T. ulmifolia*, estas mostraram-se fragmentadas, com cerca de 20% a mais de partículas menores que 300 nm (que é o comprimento normal do vírus) em relação às preparações controle. Considerando que essa fragmentação inativa o vírus, entao parte do efeito inibidor exercido por *T. ulmifolia* pode ser devido a essa quebra nas partículas virais.

É difícil estabelecer se a ação dos inibidores é sobre o vírus ou sobre a planta. Provavelmente há inibidores que atuam sobre os dois. Isso é mais viável acontecer principalmente no caso de inibidores de sucos de plantas e mesmo outros que agem nos estágios iniciais da interação vírus-célula em que a ação do inibidor pode ser sobre a capa proteica do vírus ou sobre a membrana que alguns possuem; e por outro lado os sítios receptores da célula hospedeira. Os inibidores que agem nessas condições poderiam interferir principalmente no reconhecimento dos sítios infectivos ou no descapeamento do vírus na célula hospedeira.

Há necessidade de desenvolver outras abordagens para avaliar a ação de inibidores de vírus de plantas. Os testes com modelos de replicação *in vitro* oferecem muitas possibilidades, mas tem também limitação em que a planta é deixada à parte. Comparações do efeito inici

bidor sobre o vírus completo e o desprovido de capa proteica *in vivo* seriam de bastante interesse.

A serologia é outra abordagem bastante prometedora para compreensão do efeito de inibidores, embora estes testes também fiquem limitados à determinação dos efeitos relacionados com a capa proteica dos vírus. Mas, para estudo do efeito de inibidores sobre os estágios iniciais de reconhecimento e interação vírus-hospedeira que, possivelmente, sejam de natureza semelhante à da reação vírus-anticorpo, são as técnicas serológicas prometedoras. Entre estas, a microscopia eletrônica imuno-específica (SSEM) apresenta possibilidade de observação da ação de inibidores sobre a interação vírus-anticorpo em partículas que podem ser visualizadas e quantificadas. O tratamento de preparações antes da união vírus-anticorpo ou depois pode fornecer indicações sobre se os efeitos são de bloqueio ou de enfraquecimento da união estabelecida.

Suco de *T. ulmifolia* e o ODD foram excelentes inibidores da transmissão mecânica do vírus do mosaico do mamoeiro mas não foram capazes de inibir a transmissão desse vírus através do vetor. Este fato torna-se compreensível, se for considerado que esse vetor coloca o vírus em plasmodesmas de células superficiais ou do mesófilo, em regiões onde o inibidor não está presente. No caso da inoculação mecânica a probabilidade de o inibidor ter acesso às partículas virais é muito maior.

Boa redução na disseminação do TMV em operação de transplante de mudas de fumo e tomate foi conseguida com o uso dos dois inibidores. Nos testes em que se contaminou as mãos com o vírus e em seguida se as mergulhou em soluções contendo os inibidores, os resultados foram melhores do que quando as mudas foram previamente pulverizadas com ODD e depois transplantadas com as mãos contaminadas. Isso provavelmente ocorreu porque no último caso, a mão contaminada tocou partes da planta onde o inibidor não estava presente, como a face inferior das folhas.

Muitas substâncias têm sido indicadas para serem empregadas no controle da disseminação mecânica do TMV em operações culturais ou mesmo em casa de vegetação. O leite ou seu soro propiciam redução razoável na disseminação do TMV. Entretanto, trata-se de substância um pouco mais difícil de ser manipulada que os detergentes comerciais que podem ser adquiridos e estocados sob qualquer condição por tempo indefinido. São produtos baratos, não tóxicos, e que proporcionam método eficiente de controle, podendo ser empregado na lavagem ou simples molhamento frequente das mãos sem causar praticamente nenhum aumento na mão de obra do trabalhador. O suco da planta, apesar de eficiente, oferece maiores dificuldades de utilização.

Outra possibilidade de emprego desses inibidores, que está sendo investigada, é o seu uso para eliminar contaminação na limpeza de material ou ferramentas contaminadas com vírus facilmente transmissíveis mecânicamente. Resultados preliminares têm mostrado que almofarizes utilizados para extração do TMV podem ter sua contaminação totalmente eliminada se ficarem de molho em solução de detergente. É possível que eles possam também ser eficientes na desinfestação de ferramentas contaminadas como tesouras de poda, facões, canivetes de enxertia, etc., cuja transmissão mecânica é epidemiologicamente importante.

Os resultados obtidos nas tentativas iniciais de purificação do inibidor de *T. ulmiifolia* indicaram que, como ocorre com a maioria dos inibidores de sucos de plantas, deve ser do grupo das proteínas. O fato de ter se comportado de modo semelhante àquele descrito por diferentes pesquisadores em técnicas utilizadas na purificação de outros inibidores (KASSANIS e KECZKOWSKI, 1948; WYAT e SHEPHERD, 1969; GRASSO E SHEPHERD, 1977; etc.) como precipitação das proteínas que foi melhor com etanol em suco previamente acidificado do que as demais opções experimentadas, a propriedade de não passar através de uma membrana de diálise, mesmo sob pressão, como a demonstrada na concentração a

vácuo, não ter sido retida pela coluna de Sephadex G-25 e de ter sido isolada por fracionamento em coluna de CM-Celulose são favoráveis a essa hipótese.

Os tratamentos a que foi submetida a fração purificada indicaram que papaina e TNBS que ataca o grupo ϵ -amino da lisina de uma proteína, reduziram sua atividade, reforçando assim a hipótese de ser o inibidor uma proteína. A dosagem de proteína na fração purificada indicou uma pequena quantidade desta, de modo que a substância inibidora de *T. ulmifolia* deve ser uma proteína de alta atividade.

O aquecimento da fração purificada de *T. ulmifolia* a 100°C por até uma hora mostrou ser esse inibidor altamente estável em relação à temperatura, característica essa semelhante à detectada por FURAKAYA E TANIGUCHI (1979) para a proteína inibidora de *Phytolacca americana*.

6. CONCLUSÕES

1. O extrato foliar de *T. ulmifolia* e todos os detergentes comerciais utilizados na limpeza doméstica experimentados foram bons inibidores da transmissão mecânica do vírus do mosaico do mamoeiro e do fumo.
2. Extrato foliar de *T. ulmifolia* e ODD foram capazes de inibir a transmissão mecânica de três potyvírus: vírus do mosaico do mamoeiro, Y de Piracicaba e da acro necrose; de um tobamovírus (TMV) e do vírus do mosaico da alfafa.
3. O ODD inibe a transmissão mecânica do TMV até um estágio posterior da relação vírus-planta ao daquele que o inibidor de *T. ulmifolia* é capaz de interferir.
4. O inibidor de *T. ulmifolia* promoveu fragmentação significativa das partículas do TMV, e interferiu na união do anticorpo-antígeno (decoração). O ODD e o inibidor de *T. ulmifolia* interferiram na união antígeno-anticorpo (anticorpo na tela).
5. Os inibidores estudados reduziram a disseminação mecânica do TMV em transplante de mudas de fumo e tomate; o ODD ou outro detergente comercial análogo podem ser empregados no controle da disseminação do TMV.

6. O inibidor extraído do suco de *T. ulmifolia* se comportou como uma proteína, análogamente a muitos outros inibidores isolados de plantas. Tem ele alta estabilidade em relação à temperatura.

7. RESUMO

Foram detectados dois fortes inibidores da transmissão mecânica do vírus do mosaico do mamoeiro em uma triagem efetuada entre diferentes substâncias químicas e sucos de diferentes espécies de plantas. Foram eles o detergente comercial ODD, utilizado na limpeza doméstica, e o suco de *Turnera ulmifolia* L.

Foi estudado o mecanismo de ação desses inibidores sobre a transmissão do vírus do mosaico do mamoeiro e do fumo, porém alguns outros testes realizados mostraram que eles foram capazes de inibir a transmissão mecânica de outros vírus como o do mosaico da alfafa, Y de Piracicaba e acro-necrose

A inibição pela aplicação prévia do suco de *T. ulmifolia* em mamoeiro mostrou efeito positivo quando feita um dia antes, mas não 4 ou mais dias antes da inoculação mecânica. O ODD mostrou boa inibição quando aplicado 8 dias antes (76,6%) e mesmo aplicado 12 dias antes induziu inibição de 40%. Com o vírus do mosaico do fumo (TMV) o inibidor de *T. ulmifolia* exerceu algum efeito positivo aplicado até 8 dias antes da inoculação (35,9%); o ODD teve efeito inibidor razoável mesmo quando aplicado 12 dias antes (60,7%).

Quando esses inibidores foram misturados com o inóculo ou aplicados imediatamente após a inoculação do TMV em plandas de fu

mo TNN, houve bom efeito inibidor. Após 30 minutos ou mais o suco da planta não exerceu mais nenhum efeito enquanto que o ODD foi efetivo quando aplicado 4 horas após, e ambos não exerceram nenhum efeito quando aplicados 24 horas após. Esse comportamento os caracterizaram como inibidores de infecção.

Quando se fixou a concentração do TMV e se variou a dos inibidores a porcentagem de inibição aumentou com o aumento de concentração destes. Quando se fixou a dos inibidores a porcentagem de inibição aumentou com a diluição do vírus.

Nos testes de microscopia eletrônica imuno-específica, -telinhas com antissoro colocadas sobre misturas do vírus com ambos os inibidores, mostraram redução significativa de partículas ligadas em relação ao controle. Quando decoradas as partículas passadas pelo antissoro, pelo vírus e depois pelo inibidor de *T. ulmifolia*, observou-se um número muito menor de moléculas de anticorpo aderidas em sua superfície do que nos controles. Observou-se também que preparações tratadas com suco de *T. ulmifolia* apresentaram um maior número de partículas fragmentadas. Foi feita a sugestão de que a técnica de microscopia eletrônica imuno específica (SSEM) é uma abordagem prometedora para estudos sobre o estágio inicial de reconhecimento e interação vírus hospedeira podendo fornecer indicações sobre se os efeitos do inibidor são de bloqueio ou enfraquecimento da união estabelecida.

Os inibidores não impediram a transmissão do vírus do mosaico do mamoeiro através do vetor, mas foram eficientes no controle da disseminação do TMV em operações de transplante de fumo e tomate. É sugerido o uso de ODD em operações culturais no campo ou em estufa e mesmo em desinfestação de ferramentas para controle de fitovírus em que a transmissão mecânica é epidemiologicamente importante.

Durante o processo empregado para purificação do inibidor do suco de *T. ulmifolia*, este se comportou como a maioria dos inibi-

dores de plantas, já purificados anteriormente, de natureza proteica. Tratamento com papaina e TNBS diminuíram a atividade do inibidor. Aquecimento a 100°C por uma hora não exerceu nenhum efeito sobre sua atividade.

8. SUMMARY

DETECTION OF TWO PLANT VIRUS INHIBITORS AND DETERMINATION OF THEIR PROPERTIES

Exploratory screening of a number of chemical substances and of plant juices from many species permitted the detection of two effective plant virus inhibitors: ODD, a commercial household detergent sold in Brasil, and the leaf juice of the *Turneraceae*, *Turnera ulmifolia* L. Both inhibitors were tried against tobacco mosaic and papaya ring spot viruses in the majority of tests, but they were also active against two potyviruses that infect bean and alfalfa mosaic virus. Seedlings of papaya (*Carica papaya* L.), Turkish necrotic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.), and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) were used as test plants.

The inhibitory present in the leaf juice of *T. ulmifolia*, as well as that in ODD, are inhibitors of virus infections and not of virus replication. Both were effective when applied prior or immediately after inoculation, although ODD was still effective when treatment was 4 hr afterwards. These results were interpreted as indicating the leaf juice inhibitor was an impediment in the initial interaction virus-host cell, whereas that in the detergent could act likewise or after it had occurred.

The virus inhibitory effect of ODD is attributed to its main constituent, sodium alkylbenzenesulfonate, a component of most commercial brands of detergents. Virus inhibition was also obtained with samples of the industrial chemical used in the manufacture of ODD. The inhibiting substance present in the leaf juices of *T. ulmifolia* was partially purified and behaved in the tests as a heavy molecular, heat resistant protein.

Serologically specific electron microscopy of TMV particles treated with the two inhibitors showed that there were fewer virus particles retained by the antiserum on the carbon coated grids when they were treated with the inhibitors than in the untreated checks. Also decoration of particles adhered to the antiserum on the coated grids and further treated with the plant juice inhibitor and antiserum, was interfered with. The plant juice inhibitor increased virus particle fragmentation by about 20%. ODD applied afterwards, removed virus particles that had adhered on the antiserum on carbon coated grids. It is emphasized that the SSEM technique is an important addition for the studies of virus inhibition as related to the virus coat protein or membrane, and initial stages of infection (recognition and interaction).

The inhibitor present in ODD and in the juice of *T. ulmifolia* failed in preventing papaya ring spot virus transmission by *Myzus persicae*. But they were effective in reducing TMV spread by handling when transplanting tomato or tobacco seedlings. Commercial detergents are discussed as being of practical application in minimizing losses due to virus diseases in which mechanical transmission is epidemiologically important and can be used in handling the plants or the sterilization of tools.

9. ABREVIATURAS

- EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
- IAC - Instituto Agronômico de Campinas
- NAA - ácido naftaleno acético
- PVX - vírus X da batata
- PVY - vírus Y da batata
- 6-BA - ácido 6-benzilaminopurínico
- SDS - dodecilsulfato de sódio
- SSEM - "serologically specific electron microscopy"
- TMV - vírus do mosaico do fumo ("tobacco mosaic virus")
- TNBS - ácido trinitrobenzenosulfônico
- TNN - fumo turkish NN
- VMM - vírus do mosaico do mamoeiro

10. LITERATURA CITADA

- ABIDI, S.M.H.; SRIVASTANA, K.M.; GUPTA, R.P., SINGH, B.P. 1977. Effect of some medicinal drugs on distortion ring spot virus of papaya. *New Botanist*, 4(1/4):13-14.
- ALLARD, H.A. 1918. The mosaic disease of *Phytolacca decandra*. *Phytopathology*, 8:51-54.
- BANCROFT, J.B. e KEY, J.L. 1964. Effect of actinomycin D and ethylenodiamine tetracetic acid on multiplication of a plant virus in etiolate soybean hypocotyls. *Nature*, 202:729-730.
- BAWDEN, F.C. 1954. Inhibitors and plant viruses. *Adv. Virus Res.*, 2: 31-57.
- BHARDWAJ, S.V., DUBEY, G.S. e SHARMA, I. 1982. Effect of benlate on infection and transmission of urdbean (*Vigna radiata* var. mungo) leaf crinkle virus. *Phytopath. Z.*, 105(1):87-91.
- BLACK, L.M. 1939. Inhibition of virus activity by insect juices *Phytopathology*, 29:331-337.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analyt. Biochem.*, 72:248-254.

- CALDWELL, J. 1936. Factor affecting the formation of local lesions by tobacco mosaic virus. *Proc. R. Soc.*, 119:493-507.
- COMMONER, B. e MERECER, F. 1951. Inhibition of the biosynthesis of tobacco mosaic virus by thiouracil. *Nature*, 168:43-114.
- DERRICK, K.S. 1973. Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy. *Virology*, 56:652-653.
- EBRAHIM-NEBAST e NIENHAUS, F. 1972. Beeinflussung von tabakmosaikviren. *Phytopath. Z.*, 73:235-250.
- FAZIO, G., CANER, J. e VICENTE, M. 1978. Inhibiting effect of Virazole (Ribavirin) on the replication of tomato white necrosis virus (VNBT). *Archs Virology*, 58:153-166.
- FAZIO, G., CANER, J. e VICENTE, M. 1980. Effect of Virazole on tomato spotted wilt virus in two systemic hosts, tomato and tobacco. *Archs. Virology*, 63:305-309.
- FELDMAN, J. 1963. Effect inhibiteur des extraits de semence de piment (*Capsicum annuum* L.) sur le pouvoir infectieux de quelques virus des plantes. *Ann. Epiphyties*, 14:377-365.
- FELTON, L.D., PRESCOTT, B., KAUFFMANN, G. e OTTINGER, B. 1955. Antigens of vegetable origin active in pneumococcus infections. *J. Bact.* 69: 519-528.
- FERNANDEZ, T.E., GOBORJAMY, R. 1976. Reversion of dwarfing induced by virus infection: effect of polyacrylic acid and gibberellic acids. *Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung.*, 11:271-275.
- FISCHER, H. e NIENHAUS, F. 1973. Virushemmende prinzipien in paprikapflanzen (*Capsicum annuum* L.) *Phytopath. Z.*, 78:25-41.
- FRITZCHE, R. 1970. Hemmung der infektion von pflanzen mit pflanzenpathogenen viren spinnmiebenhomogenate (*Tetranychus urticae* Koch.) *Arch. Pflanzenschutz*, 6:31-40.

- FULTON, R.N. 1943. The sensitivity of plant viruses to certain inactivators. *Phytopathology*, 33:674-682.
- FURAKAYA, N. e TANIGUCHI, T., 1979. Some properties of an inhibitor of plant virus infection occurring in the leaves of *Phytolacca americana*. *Phytopath. Z.*, 94(1):132-138.
- GIECHERMAN, G. e LOEBENSTEIN, G. 1968. Competitive inhibition by foreign acids and induced interference by yeast RNA with the infection of tobacco mosaic virus. *Phytopathology*. 58:405-409.
- GILLASPIE, Jr., A.G., THOMAS, C.A. e PRESCOTT, B. 1981. Inhibition of sugarcane mosaic virus symptoms on sorghum by microbial and plant polysaccharides and their antigenic relationship. *Phytopath. Z.*, 102(2):107-113.
- GLENDRON, Y. e KASSANIS, B. 1954. The importance of the host species in the action of virus inhibitors. *Ann. appl. Biol.*, 41:183-188.
- GOVINDASWAMY, C. PADMANABAN, P. e ALAGIANAGALINGAM, M.N. 1977. Studies on bunchy top diseases of banana. *Madras Agric. J.*, 64:205-206.
- GRASSO, S. de ROSA, R.O. 1979. Identification of a substance inhibiting virus infection isolated from a marine alga. *Riv. Patol. Veg.*, 15:(3/4)133-148.
- GRASSO, S. e SHEPHERD, R.J. 1977. Isolation and partial characterization of virus inhibitors from plant species taxonomically related to *Phytolacca*. *Phytopathology*, 68:109-205.
- GRAY, E.A. 1955. Activity of an antiviral agent from *Nocardia* on two viruses in intact plants. *Phytopathology*, 45:281-285.
- GUPTA, B.M. e PRICE, W.C. 1950. Production of plant virus inhibitors by fungi. *Phytopathology*, 40:642-652.

- HARDER, D.E. e KIRKPATRICK, H.C. 1970. Inhibition of tobacco mosaic virus by 8-azaguanine and 2-thiouracil in diploid and tetraphid *Phy-salis floridana*. *Phytopathology*, 60:1255-1258.
- HARE, W.W. e LUCAS, G.B. 1959. Control of contact transmission of tobacco mosaic virus with milk. *Pl. Dis. Reprtr.* 43:152-154.
- HEIN, A. 1964. Die wirkung eines milchfilms auf die ubertragung eines nichtpersistenten virus durch blattlause. *Z. Pflkrankl. PflPath. Pfl Schutz*, 71:267-270.
- HIRAI, T. 1977. Action of antiviral agents. In: HORSFALL e COWLING (eds.) *Plant Disease*. Vol. 1. Academic Press New York. pp. 285-306.
- HIRAI, T. e SHIMOMURA, T. 1960. The mode of action of some antibiotics in their inhibitory effect on tobacco mosaic virus multiplication. *Phytopath. Z.*, 40:35-44.
- HIRAI, T. e SHIMOMURA, T. 1965. Blastocidin, S. an effective inhibitory against plant virus multiplication. *Phytopathology*, 55:291-295.
- HIRAI, T. HIRASHIMA, A. ITOH, T. TAKAHASHI, T. SHIMOURA, T. e HAYACHI, Y. 1966. Inhibitory effect of Blastocidin S on tobacco mosaic virus multiplications. *Phytopathology*, 56:1236-1240.
- IRVIN, J.D., KELLY, T., ROBERTUS, J.D. 1980. Purification and properties of a second antiviral protein from *Phytolacca americana* with inactivates eukariotic ribosomes. *Archs. Biochem. Biophys.*, 200(2): 418-425.
- JAEGER, S. 1966. Milch as infektionshemmstoff mecanisch ubertragbarer viren in tomaten-und gurkenkulturen. *Phytopath. Z.*, 56:340-352.
- JOHNSON, J. 1941. Chemical inactivation and the reactivation of a plant virus. *Phytopathology*, 31:579-701.
- JOHNSON, J. e HOGGAN, I.A. 1937. The inactivation of the ordinary tobacco mosaic virus by microorganisms. *Phytopathology*, 27:1014-1027.

- KASSANIS, B. e KLECZKOWSKI, A. 1948. The isolation and some properties of a virus inhibiting protein from *Phytolacca esculenta*. *J. Gen. Microbiol.* 2:143-153.
- KASSANIS, B., WHITE, R.F. e WOODS, R.D. 1975. Inhibition of multiplication of tobacco mosaic virus in protoplasts by antibiotics and its prevention by divalent metals. *J. Gen. Virol.*, 28:185-199.
- KIRALY, Z. e SZIRMAI, J. 1964. The influence of Kinetin on tobacco mosaic virus production in *Nicotiana glutinosa* leaf disks. *Virology*, 23:286-288.
- KO, K., MATZUZAWA, Y., WATANABE, T., MISATO, T. 1980. Effects of some alkybenzenesulfonates, alkylsulfates and alkanesulfonates on disease development of some plant viruses. *J. Pest. Sci.*, 5(4):481-486.
- KUNTZ, J.E. e WALKER, J.C. 1947. Virus inhibition by extracts of spinach. *Phytopathology*, 37:561-579.
- LERCH, B. 1977. Inhibition of biosynthesis of potato virus x by Ribavirin. *Phytopath. Z.*, 89:44-49.
- LINDNER, R.C., CHEO, O.C. KIRKPATRICK, H.C. e CONVINDU, H.C. 1960. Some effects of 8-azaguanine on tobacco mosaic virus replication. *Phytopathology.*, 50:884-889.
- LOEBENSTEIN, G. 1972. Inhibition interference and acquired resistance during infection. In: KADO e AGRAWAL (eds.). Principles and techniques in Plant Virology. Van Nostrand Reinhold Ltd., New York. pp.32-75.
- LOJKIN, M. e VINSON, C.G. 1931. Effect of enzymes upon the infectivity of the virus of tobacco mosaic. *Contr. Boyce Tomson Inst. Pl. Res.* 3:147-162.
- LORING, H.S. 1942. The reversible inactivation of tobacco mosaic virus. II. Carbobenzoxy, p-chlorobenzoyl and benzene-sulfonyl virus. *J. Biol. Chem.*, 146:331-338.

- MARAMOROSCH, K. 1957. Reversal of virus-caused stunting in plants by gibberellic acid. *Science*, 126:651-652.
- MAYHEW, D.E. e FORD, R.E. 1971. An inhibition of tobacco mosaic virus produced by *Physarum polycephalum*. *Phytopathology*, 61:636-640.
- MERRET, M. 1962. The effect of uncoupling agents on the multiplication of tomato-aucuba mosaic virus in tobacco leaves. *Physiologia Pl.*, 15:200-205.
- MILNE, R.G. e LULSONI, E. 1977. Rapid immune electron microscopy of virus preparations. In: MARAMOROSCH e KOPIOWSKI (eds.). *Methods in Virology* vol. 15. Academic Press, New York. 542p.
- MINK, G.I. e SAKSENA, K.N. 1971. Studies on the mechanism of oxidative inactivation of plant viruses by o-quinones *Virology*, 45:755-763.
- MORAES, W.B.C. 1973. Estudos sobre um inibidor de vírus fitopatogênicos presente em extratos de *Abutilon striatum* Dicks. Tese de Doutorado. UNICAMP.
- MORAES, W.B.C., JULY, J.R., ALBA, A.P.C. e OLIVEIRA, A.R. 1974a. The inhibitory activity of extracts of *Abutilon striatum* leaves on plant virus infection. II. Mechanism of inhibition. *Phytopath. Z.*, 81:240-243.
- MORAES, W.B.C., MARTINS, E.M.F., CONTI, E. e OLIVEIRA, A.R. 1974b. The inhibitory activity of extract of *Abutilon striatum* leaves on plant virus infection. I. Isolation and some properties of the inhibitor. *Phytopath. Z.*, 81:142-145.
- NENE, Y.L. e THORNBERRY, H.H. 1970. Tobacco mosaic virus: bean infection inhibition by steapsin and trypsin compared with ribonuclease. *Phytopath. Z.*, 67:337-341.
- NORONHA, A.B., GIL, V.L., VICENTE, M. 1980. Occurrence of plant virus inhibitors in species of Caryophyllales I. *Alternanthera ficoidea*, *Amaranthus deflexus*, *Bougainvillea spectabilis*, *Chenopodium ambrosioides* and *Mirabilis jalapa*. *Archos Inst. Biol.*, S. Paulo, 47(3):71-76.

- PORTER, C.A. e WEINSTEIN, L.H. 1961. Incorporation of 2-thiouracil ³⁵S into RNA and acid-soluble nucleotides of Vamorr 48 tobacco. *Virology*, 15:504-506.
- RAGETLI, H.W.J. 1957. Behaviour and nature of a virus inhibition occurring in *Dianthus caryophyllus* L. T. *Plantenziekten*, 61:245-344.
- RAGETLI, H.W.J. e WEINTRAUB, M. 1962a. Purification and characteristics of a virus inhibition from *Dianthus caryophyllus* L. I. Purification and activity. *Virology*, 18:232-240.
- RAGETLI, H.W.J. e WEINTRAUB, B.M. 1962b. Purification and characteristics of a virus inhibitors from *Dianthus caryophyllus* L. Characterization and mode of action. *Virology*, 18:241-248.
- RALPH, R.K. e WOJCIK, S.L. 1966. Effects of 2-thiouracil on synthesis of double: stranded turnip yellow mosaic virus RNA in cell-free extracts. *Biochim. Biophys. Acta.*, 129:625-627.
- ROBINSON, D.J. e RASCHKE, J.H. 1977. Inactivation of tobacco rattle virus by EDTA and role of divalent metal ions in the stability of the virus. *J. Gen. Virol.*, 34(3):547-550.
- ROUSSOUW, D.J. e FULTON, R.W. 1963. The effect of certain monovalent and divalent cations on plant virus infection S. Afr. J. Agri. Sci. 6:193-204.
- SANGER, H.L. e KNIGHT, C.A. 1963. Action of actinomycin D on RNA synthesis in healthy and virus-infected tobacco leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 13:455-461.
- SCHLEGEL, D.E. e RAWLINS, T.E. 1954. A screening test of the effect of organic compounds on production of tobacco mosaic virus. *J. Bact.*, 67:103:109.
- SCHUSTER, G. 1982. Improvement in the antiphytoviral chemotherapy by combining Ribavirin (Virazole) and 2-4-dioxohydro-1,3,5-triazine (DHT). *Phytopath. Z.*, 103(4):323-328.

- SHEPARD, J.F. 1977. Regeneration of plants from protoplasts of potato virus infected tobacco leaves. II. Influence of Virazole on the frequency of infection. *Virology*, 78:261-266.
- SLAGLE, C.W., WOLCYRZ, S. e PRICE, W.C. 1952. Inhibition of plant virus infection by growth products of *Neurospora*. *Phytopathology*, 42: 240-244.
- SMOOKLER, M.M. 1971. Properties of inhibitors of plant virus infection occurring in the leaves of species of *Chenopodiales*. *Ann. Appl. Biol.*, 69:157-168.
- STAEHELIN, M. e GORDON, M.P. 1960. Effects of halogenated pyrimidines on the growth of tobacco mosaic virus. *Biochim. Biophys. Acta.*, 38: 307-315.
- STAHMANN, M.A. e GOTHOSKAR, S.S. 1958. The inhibition of the infectivity of tobacco mosaic virus by some synthetic and natural polyelectrolytes. *Phytopathology*, 48:362-365.
- STANLEY, W.M. 1934. Chemical studies on the virus of tobacco mosaic. I. Some effects of trypsin. *Phytopathology*, 24:1055-1085.
- STEIN, A. e LOEBENTEIN, G. 1970. Induction of resistance to TMV by poly C in plants. *Nature*, 226:363-364.
- STEIN, A. e LOEBENSTEIN, G. 1972. Induced interference by syntetic polyanions with the infection of tobacco mosaic virus. *Phytopathology*, 62:1461-1466.
- TANIGUCHI, T. 1976. Inhibition of tobacco mosaic virus infection by detergents. *Phytopath. Z.* 86:246-251.
- TANIGUCHI, T. 1962. Inhibition of tobacco mosaic virus by ethylenediaminetetracetic acid. *Phytopath. Z.* 104(2):151-156.
- THOMAS, J. e JOHN, V.T. 1980. Effect of gibberellic acid and indole-3-acetic-acid on the infection of rice plants by rice tungro virus. *Phytopath. Z.*, 101(2):168-174.

- TOMLINSON, J.A., FAITHFULL, E.M. e WARD, C.M. 1976. Chemical supression of two virus diseases. *Ann. Appl. Biol.*, 84:31-34.
- UMBREIT, W.W. 1964. In: UMBREIT, W.W., BURRIS, H.H. e STAUFFER, J.F. (eds.). *Manometric Techniques*, Burgess, Publisching Company, 4a ed. Minnesota, pp.305.
- UPRETI, G.C., NAGAICH, B.B. e LAL, S.P. 1964. Inhibition of potato virus X and Y by some chemicals. *Indian Pot. J.*, 6:19-23.
- VAN KAMMEN, N., NORDAN, D. e THUNG, T.H. 1961. The mecanism of inhibition of infection with tobacco mosaic virus by an inhibitor from carnation sap. *Virology*, 14:100-108.
- VERMA, H.N., AWASTHI, L.P. MUKHERJEE, K. 1979. Prevention of virus infection and multiplication by extract from medicinal plants. *Phytopath. Z.*, 96(1):71-76.
- VICENTE, M., NORONHA, A.B. e COLAMARINO, E. 1977. Modo de ação de um inibidor de vírus fitopatogênicos extraído das folhas de *Chenopodium amaranticolor*. *Coste & Reyn. Archos. Inst. Biol. S. Paulo*, 44(4): 229-234.
- WILSON, C.M. 1963. Chromatografic separation of ribonucleases in corn. *Biochim. Biophys. Acta.*, 68-177-184.
- WYATT, S.D. e SHEPHERD, R.J. 1969. Isolation and Characterization of a virus inhibitor from *Phytolacca americana*. *Phytopathology*, 59:1784-1794.
- YOSHII, H. e SAKO, N. 1967. Inhibitory effect of *Chenopodium* sap on virus infection, hypersensitive reaction of plant cytoplasm against incompatible inhibitor *Chenopodium* sap. *Ann. Phytopat. Soc. Japan.*, 33:244-252.
- ZHURAYLEV, Y.N., PISETSKAYA, N.F. e LEDNEVA, V.A. 1983. Inhibition of tobacco mosaic virus reproduction in isolated tobacco protoplasts by means of pancreatic ribonuclease. *Phytopath. Z.*, 106(1):35-44.