



COORDENAÇÃO DOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO

UNICAMP AUTORIZAÇÃO PARA QUE A UNICAMP POSSA FORNECER, A PREÇO DE CUSTO, CÓPIAS DA TESE A INTERESSADOS

Nome do Aluno: **SARA POLIDO GARCIA**

Nº de Identificação: **765433**

Endereço para Correspondência: **UNICAMP, Dept. Bioquímica, I.B. CP 1170  
Campinas, SP.**

Curso: **Biol. Celular e Molecular**

Nome do Orientador: **Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira**

Título da Dissertação ou Tese:

**"Purificação e Serologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro (VMDT)"**

Data proposta para a Defesa: **18/12/80**

( O Aluno deverá assinar um dos 3 itens abaixo )

1) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas a partir desta data, a fornecer, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

9 /12/1980

Data

S Garcia  
assinatura do aluno

2) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a fornecer, a partir de dois anos após esta data, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

1 / 1  
Data

\_\_\_\_\_  
assinatura do aluno

3) Solicito que a Universidade Estadual de Campinas me consulte, dois anos após esta data, quanto à minha autorização para o fornecimento de cópias de minha Dissertação ou Tese, a preço de custo, a interessados.

1 / 1  
Data

\_\_\_\_\_  
assinatura do aluno

De acordo

Jesús Rodrigues de Oliveira  
Orientador

PURIFICAÇÃO E SEROLOGIA DO VÍRUS DO MOSAICO DOURADO  
DO TOMATEIRO (VMDT)

SARA POLIDO GARCIA

Orientador: Prof.Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Biologia.

CAMPINAS  
Estado de São Paulo-Brasil  
1980

*MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS* a todos  
que me ajudaram a realizar este trabalho e, em  
particular,

- ao *PROF. DR. AVELINO RODRIGUES DE OLIVEIRA*, mestre incansável, pelo apoio e orientação que nos tem dado;
- ao *PROF. DR. ÁLVARO SANTOS COSTA*, pelo fornecimento do material vegetal e, muito mais, pelos valiosos ensinamentos;
- ao *PROF. DR. JUAREZ ANTÔNIO BETTI*, pela atenção que dispensou durante a leitura do manuscrito, apresentando valiosas sugestões;
- ao *PROF. DR. IRINEU JOSÉ B. CAMARGO*, pelas correções e sugestões;
- ã *PROFa. DRa. NILCE C. MEIRELLES*, pela leitura e sugestões;
- ao *PROF. DR. ALDO FOCESI JÚNIOR*, por me permitir realizar este trabalho no Departamento de Bioquímica;
- ao *PROF. DR. DARCY MARTINS DA SILVA* e ã *ENG. AGR. IRENE MARIA GATTI DE ALMEIDA*, pelo estímulo, colaboração e pelas eletrofotomicrografias;
- ao *BIOL. JOSÉ OSMAR GASPAR* e ao *ENG. AGR. JORGE VEGA*, pelas fotografias dos testes serológicos e colaboração;
- ã *SRA. LEONTINA DE OLIVEIRA*, *SRTA. REGINA CÉLIA ROSSETO* e *SRA. MAIRY APARECIDA SANTOS DE SOUZA*, minhas imprescindíveis colaboradoras;
- ã *SRA. MARIA DO CARMO SARUBI DA COSTA*, pelos trabalhos de datilografia;
- aos amigos e funcionários da *SEÇÃO DE VIROLOGIA*, pela colaboração;
- ã *FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO*, pela concessão de Bolsa de Estudos.

## ÍNDICE

|  | Página |
|--|--------|
| 1. RESUMO .....  | iv     |
| 2. INTRODUÇÃO .....  | 1      |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA .....   | 3      |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS .....  | 8      |
| 4.1. Fonte de vírus .....  | 8      |
| 4.2. Técnicas de Purificação .....   | 8      |
| 4.2.1. Purificação do VMDT pela técnica do éter-<br>tetracloro de carbono .....                  | 9      |
| 4.2.2. Purificação do VMDT pela técnica do xilol .   | 11     |
| 4.2.3. Purificação do VMDT pela técnica do buta-<br>nol .....                                    | 11     |
| 4.2.4. Purificação do VMDT pela técnica de alimen-<br>tação de cloroplastos .....                | 14     |
| 4.2.5. Purificação do VMDT pela técnica do polieti-<br>lenoglicol .....                          | 16.    |
| 4.3. Avaliação da eficiência das técnicas de purifica-<br>ção .....                              | 16     |
| 4.3.1. Infectividade das preparações de VMDT .....   | 16     |
| 4.3.2. Microscopia eletrônica .....  | 16     |
| 4.3.3. Testes serológicos .....  | 18     |
| 4.4. Preparo de antissoros .....   | 18     |
| 4.4.1. Esquemas de imunização .....  | 18     |
| 4.4.2. Utilizando preparações purificadas do VMDT<br>foram preparados os seguintes antissoros... | 19     |

|   |    |
|---|----|
| 4.5. Título dos Antissoros .....  | 19 |
| 4.6. Testes serológicos com vários antígenos .....  | 21 |
| 4.6.1. Frações finais das purificações do VMDT ...  | 21 |
| 4.6.2. Suco de plantas hospedeiras .....  | 21 |
| 4.6.3. Fração do VMDT purificada pela técnica do<br>polietilenoglicol .....                               | 22 |
| 4.7. Diagnósticos serológicos da presença do VMDT .....   | 22 |
| 5. RESULTADOS .....   | 23 |
| 5.1. Purificação do VMDT .....  | 23 |
| 5.2. Título dos antissoros .....  | 26 |
| 5.3. Testes serológicos com suco de plantas hospedeiras   | 26 |
| 5.4. Testes serológicos com a fração do VMDT purifica-<br>da segundo a técnica do polietilenoglicol ..... | 31 |
| 5.5. Diagnóstico serológico da presença do VMDT .....   | 31 |
| 6. DISCUSSÃO.....   | 34 |
| 7. CONCLUSÕES .....   | 38 |
| 8. SUMMARY .....  | 39 |
| 9. LITERATURA CITADA E BIBLIOGRAFIA .....   | 40 |

## 1. RESUMO

Cinco técnicas de purificação do vírus do mosaico dourado do tomateiro (VMDT) foram testadas, visando obter antígenos para o preparo de antissoros específicos. As técnicas empregadas foram: xilol, tetracloreto de carbono, butanol, eliminação dos cloroplastos e polietilenoglicol.

A avaliação da eficiência dessas técnicas, através de testes de infectividade das frações finais, observações ao microscópio eletrônico e testes serológicos com os antissoros preparados, mostrou que polietilenoglicol é a técnica adequada para os fins propostos.

Frações do VMDT purificado segundo a técnica do polietilenoglicol mostraram-se ativas biologicamente nos testes de inoculação mecânica em plantas de *Nicotiana glutinosa* L. e *N. tabacum* L. e exibiram alta concentração de partículas com diâmetro em torno de 14 nm. Antissoros preparados com essa fração apresentaram, em testes de dupla difusão em ágar, linha de precipitação que permite diagnosticar a presença do VMDT em hospedeiras de *N. glutinosa* e *N. tabacum*.

## 2. INTRODUÇÃO

O grupo de agentes fitopatogênicos transmitidos pela mosca branca *Bemisia tabaci* Genn. (Homoptera, Aleyrodidae) infecta plantas de muitas famílias, incluindo representantes das leguminosas, solanáceas, malváceas, euforbiáceas e outras.

A relação entre essas moléstias não está ainda bem estabelecida e é possível que, em muitos casos, sejam causadas por um mesmo vírus ou variante de um complexo melhor adaptado à hospedeira.

Comumente encontradas em áreas tropicais, as viroses transmitidas pela mosca branca ocorrem também em áreas agrícolas sub-tropicais e temperadas, representando perdas econômicas bastante significativas.

No Brasil, segundo Costa (1975), condições ambientais favoráveis e o grande desenvolvimento da cultura da soja *Glycine max* (L.) Merrill, permitiram o desenvolvimento de grandes populações do inseto; conseqüentemente, as moléstias por ele transmitidas, principalmente para feijoais e tomates, tiveram sua incidência bastante aumentada. Bird and Maramorosch (1978) relatam que semelhantes aumentos foram por eles recentemente observados na América Central.

Segundo Costa (1974), são reconhecidas seis diferentes moléstias do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) transmitidas pela *B. tabaci* e que são consideradas, sob o ponto de vista patológico, como entidades distintas: três delas, o mosaico dourado, o encarquilhamento da folha e o engrujo, constituem típicas moléstias de tomateiro, sendo o agente etiológico transmissível de tomateiro para tomateiro, sob condições experimentais e também em campo; as outras três viroses, mosaico das nervuras, clorose internerval e nervuras amarelas (yellow net) representam a passagem ocasional do agente causal das fontes-de-vírus para o tomatal.

Na identificação das fitoviroses, a serologia apresenta vantagens sobre as demais técnicas usadas, pois além de ser altamente específica, permite diagnosticar a presença de patógeno em extrato bruto ou preparação purificada, independentemente da sintomatologia e planta hospedeira; permite ainda trabalhar com um grande número de amostras e obter resultados em curto período de tempo. Utilizando a técnica serológica, é possível comparar estirpes e vírus diferentes que ocorram em locais diferentes, através do intercâmbio de antissoros, sem o risco da introdução do patógeno em áreas em que não tenha sido ainda detectado.

Procurando desenvolver um método simples e eficiente para a purificação do VMDT, visando obter preparações para estudos serológicos, algumas técnicas foram testadas e antissoros específicos foram preparados para servir no diagnóstico da moléstia em hospedeira infectada e estudos das relações entre esse vírus e outros do complexo grupo de agentes transmitidos pela mosca-branca.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

A moléstia mosaico dourado do tomateiro sô foi observada ocasionalmente em tomates de São Paulo e, segundo Costa (1974), as plantas infectadas apareceram esparsas na plantaçãõ apresentando alguma semelhança de sintomas com outra moléstia do tomateiro, descrita por Flores *et alii* (1960) em São Paulo, causada pelo vírus da clorose infecciosa das malváceas. Experimentos preliminares mostraram que a mosca-branca *Bemisia tabaci* Gem. é o inseto vetor do agente causal do mosaico dourado do tomateiro.

O mosaico dourado do tomateiro (chita) caracteriza-se por apresentar mosaico amarelo bastante conspícuo, constando de áreas amarelas com ou sem relação com as nervuras. Embora essa moléstia tenha aumentado em sua distribuição nos últimos anos, não chega a constituir problema para nossas culturas, conforme relata Costa (1974).

Costa *et alii* (1977) realizaram testes de transmissão mecânica do agente causal do mosaico do tomateiro que demonstraram ser esse agente transmissível através de inoculação mecânica. Costa, em trabalhos não publicados, observou diferenças de susceptibilidade entre as diferentes hospedeiras que, aparentemente, não correspondem à susceptibilidade observada em testes de transmissão com o inseto vetor.

Durante a realização de testes de transmissibilidade, Costa *et alii* (1976) verificaram a existência de estirpe do complexo que se caracteriza por provocar amarelecimento das nervuras das folhas (yellow net) de fumo, praticamente sem afetar áreas do parênquima.

O vírus do mosaico dourado do tomateiro (VMDT) foi purificado por Matyis *et alii* (1975), a partir de material infectado de *Nicotiana glutinosa* L. tendo sido verificado que a atividade infecciosa das preparações está associada à presença de partículas esféricas geminadas, com comprimento de 25 nm, diâmetro individual de 12-13 nm, não encontradas em material sadio. Preparações parcialmente purificadas a partir de folhas de *Datura stramonium* e *Physalis* sp., infectadas com o VMDT, apresentaram o mesmo tipo de partícula. Conservadas em câmara fria (4°C), essas preparações permaneceram biologicamente ativas por um período de 8 dias.

Matyis *et alii* (1976), em estudos de morfologia de vírus transmitido por mosca-branca, observaram que uma das partículas do vírus geminado possui contorno hexagonal e a outra apresenta contorno pentagonal.

Utilizando frações de VMDT purificado pela técnica do butanol e precipitação por polietilenoglicol, Matyis (1979) realizou testes preliminares com orcinol e difenilamina, obtendo evidência da presença de RNA nas preparações; contudo, considerou que o processo de purificação foi realizado com um mínimo de operações para permitir afirmar com segurança qual a natureza do ácido nucleico do VMDT.

Com inóculo obtido de folhas de hospedeira infectada, extraído em presença de tampão fosfato de sódio e potássio 0,02M pH 7,0 contendo sulfito de sódio 0,02M, Garcia *et alii* (1980) realizaram

testes de inativação térmica do VMDT e os resultados indicaram que o ponto de inativação térmica desse vírus está entre 50 e 60°C.

Em preparações rápidas feitas segundo a técnica do "leaf dip", Vega e Costa (1979) observaram partículas dimeras de 30-32 nm de comprimento, medindo cada componente 16-18 nm de diâmetro, em material de folhas de glutinosa infectada com o VMDT. Essas partículas não foram encontradas em material sadio.

Matyis *et alii* (1980) observaram inúmeras partículas dimeras no interior do núcleo de células de glutinosa infectada com o VMDT. Embora não tenha sido possível dimensionar tais partículas, os autores sugerem que as mesmas representam o vírus. Núcleos de células sadias não apresentaram partículas semelhantes nas condições estudadas.

Garcia *et alii* (1980) realizaram estudos das propriedades serológicas do VMDT, porém, não consideraram satisfatórios os resultados obtidos.

Segundo Costa (1976), o agente causal das moléstias de plantas transmitidas por mosca-branca, particularmente pela *B. tabaci*, está parcialmente determinado, sendo provável que a morfologia geminada associada com infectividade seja a forma predominante para os agentes transmitidos por esse vetor.

Os trabalhos de Sharp and Wolf (1949) foram os primeiros a isolar o agente causal de moléstia transmitida pela mosca-branca a partir de plantas de *Nicotiana tabacum* L. infectadas com o vírus do "leaf curl" proveniente da Venezuela. Preparações parcialmente purificadas apresentaram partículas alongadas. Os mesmos pesquisadores (1951) esclareceram que tais partículas eram resultantes da contaminação com o vírus do mosaico comum do fumo e descreveram o vírus do "leaf-curl" como partículas esferoidais com 39 nm de diâmetro; entretanto, ensaios

no sentido de se reproduzir a moléstia a partir dessas preparações não foram mencionados.

Sun (1964) observou partículas esferoidais de 80 nm em secções ultrafinas de cloroplastos de *Abutilon striatum* infectado com o mosaico do Abutilon, não presentes em folhas sadias normais.

Kitajima e Costa (1974) descreveram partículas de 20-25 nm de diâmetro no lúmen de vasos de floema de folhas de muitas espécies de plantas infectadas por moléstias transmitidas pela *B. tabaci*. Utilizaram plantas de *Sida sp.* infectadas pelo vírus do mosaico do Abutilon e plantas de feijão infectadas pelo vírus do mosaico dourado do feijoeiro. Em plantas sadias, não foram vistas semelhantes partículas.

Segundo Bock *et alii* (1974) partículas ligadas aos pares, medindo 20 X 30 nm, foram observadas em preparações do vírus latente da mandioca, transmitido pela mosca-branca.

Galvez *et alii* (1975) trabalhando com dois isolados do vírus do mosaico dourado do feijoeiro (VMDF), um obtido da Colômbia e outro de El Salvador, obtiveram frações purificadas que continham numerosas partículas ligadas medindo cerca de 32 X 19 nm. Concluíram que tais partículas geminadas representam o vírus tendo sido associados à infectividade exibida pelas preparações, quando inoculadas mecanicamente em plantas de feijão.

Matyis *et alii* (1976) examinando preparações purificadas do agente causal do mosaico da eufórbia e mosaico dourado do feijoeiro, observaram partículas dímeras com diâmetro individual de 12 - 13 nm, sendo que uma das partículas exibiu contorno hexagonal e a outra, pentagonal.

Goodman *et alii* (1977) encontraram partículas geminadas de 18 nm de diâmetro em extratos purificados de plantas inoculadas com isolados de VMDF de Porto Rico. Amostras de frações centrifugadas em gradiente de sacarose, mostraram-se infectivas quando inoculadas mecanicamente em plantas de feijão ou quando inoculadas pelo vetor alimentado com tais preparações.

Embora partículas isométricas, esferoidais e geminadas tenham sido associadas com moléstias transmitidas pela mosca-branca, indicando sua predominância para os vírus transmitidos por esse vetor, alguns relatos de partículas alongadas já foram feitos.

Hollings and Stone (1976) observaram partículas alongadas de 950 nm associadas ao mosqueado fraco da batata doce, na África.

Costa *et alii* (1980) relatam a ocorrência de partículas alongadas de 630-650 nm, associadas à moléstia mosaico angular do feijoeiro Jalo. Segundo os autores, morfologicamente, esse vírus pertence ao grupo S da batata ("carnation latent virus group, carlavirus").

Sela *et alii* (1980) observaram em preparações purificadas do "cucumber vein yellowing virus" transmitido pela *B. tabaci* Gem. partículas alongadas de 740-800 X 15-18 nm.

Com referência à investigação serológica, poucos são os relatos feitos até o momento: Bird *et alii* (1978) informam que o grupo de pesquisadores da Colômbia, liderados pelo Dr. Guillermo Galvez, obtiveram sucesso no preparo de antissoro para o vírus do mosaico dourado do feijoeiro. Bock *et alii* (1978) prepararam antissoro para o vírus latente da mandioca, transmitido também pela *B. tabaci*.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.1. Fonte de vírus

Plantas de *Nicotiana glutinosa* L. (glutinosa) e *Nicotiana tabacum* L. cv Turkish com o fator necrótico N que localiza o vírus do mosaico do fumo (TMV), apresentando três a cinco folhas, foram inoculadas mecanicamente com o isolado de VMDT mantido na Seção de Virologia do Instituto Agrônômico de Campinas, que se caracteriza por causar amarelamento das nervuras (yellow net) em folhas de fumo, praticamente sem afetar áreas do parênquima. Folhas com sintomas sistêmicos foram colhidas e utilizadas nos processos de purificação.

Plantas de glutinosa e fumo infectadas com o VMDT por enxertia foram também empregadas como fonte de vírus.

##### 4.2. Técnicas de Purificação

As técnicas de purificação utilizadas foram: éter-tetracloreto de carbono, xilol, butanol, eliminação dos cloroplastos e polietilenoglicol, baseadas nos vários métodos de purificação de fitovírus citados por Noordam (1973).

As centrifugações foram feitas em ultracentrífuga preparativa Beckman L5-65, utilizando-se os rotores 30 (R 30) e SW 25.2 (SW25).

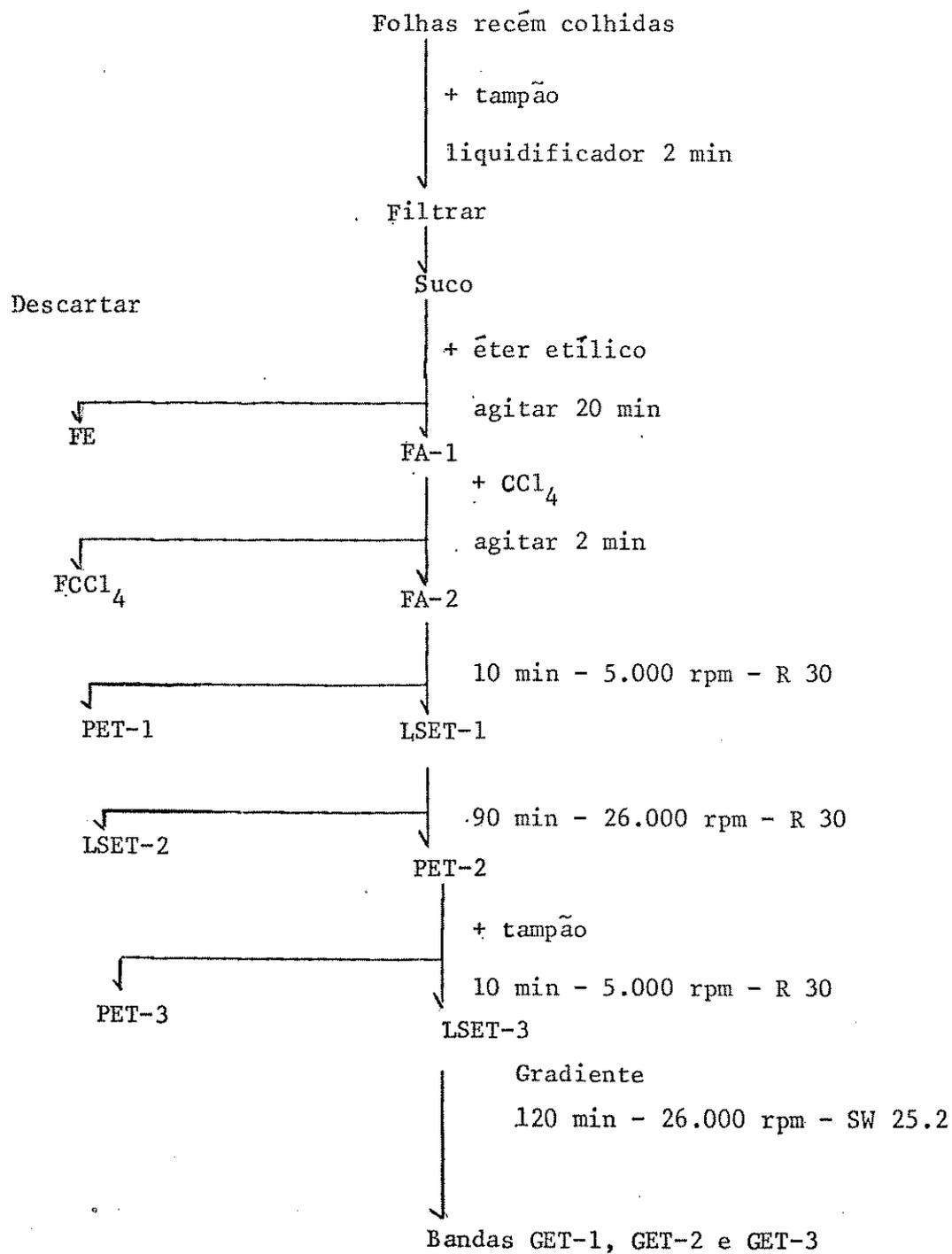
#### 4.2.1. Purificação do VMDT pela técnica do éter-tetracloro de carbono

Folhas recém colhidas (80-100g) foram homogeneizadas num liquidificador em presença de tampão fosfato 0,02M pH 7,0 e sulfito de sódio 0,02M (TF) (2ml TF/g de folha). O suco obtido foi filtrado em pano de morim duplo. Em seguida, adicionou-se éter-etílico ao suco na proporção de 1:1 (v/v) e o material permaneceu em agitação por 20 min. Eliminou-se a fase etérea com o auxílio de funil separador e a fase aquosa (FA-1) adicionou-se tetracloreto de carbono na proporção de 1/3 do volume do éter adicionado ao filtrado. Após agitar por 2 min, eliminou-se a fase contendo tetracloreto de carbono e a fase aquosa foi então centrifugada durante 10 min a 5.000 rpm no R30. O sedimento (PET-1) foi descartado e o sobrenadante (LSET-1) foi centrifugado durante 90 min a 26.000 rpm no R30. Obteve-se um "pellet" (PET-2) que foi dissolvido em TF e a seguir centrifugado durante 10 min a 5.000 rpm no R30. Após eliminar o sedimento (PET-3), submeteu-se o líquido sobrenadante a uma ultracentrifugação em gradiente de densidade em sacarose (GD) (Esquema 1).

O gradiente de sacarose foi preparado segundo Brakke (1960): volumes de 2,8, 2,8, 2,8 e 1,6 ml respectivamente de soluções de sacarose nas concentrações 40, 30, 20 e 10% foram colocadas em tubos do rotor SW25 (75 X 25 mm) e os tubos foram mantidos em repouso por 24 h em câmara fria (4°C) para formação do gradiente.

Para a centrifugação em gradiente de densidade de sacarose, foram colocados 0,5 ml da fração LSET-3 na superfície de cada tubo de GD e o material foi centrifugado durante 120 min a 26.000 rpm. Formaram-se três bandas opalescentes GET-1, GET-2 e GET-3 que foram coletadas e reservadas em pequenos frascos. Com base nos resultados obtidos

Esquema 1 - Fases da purificação do VMDT segundo a técnica do éter-tetracloro de carbono



por Matyis *et alii* (1975), considerou-se a banda superior (GDET-1) como fração purificada do vírus, sendo empregada no preparo de antissoro e em testes biológicos e serológicos.

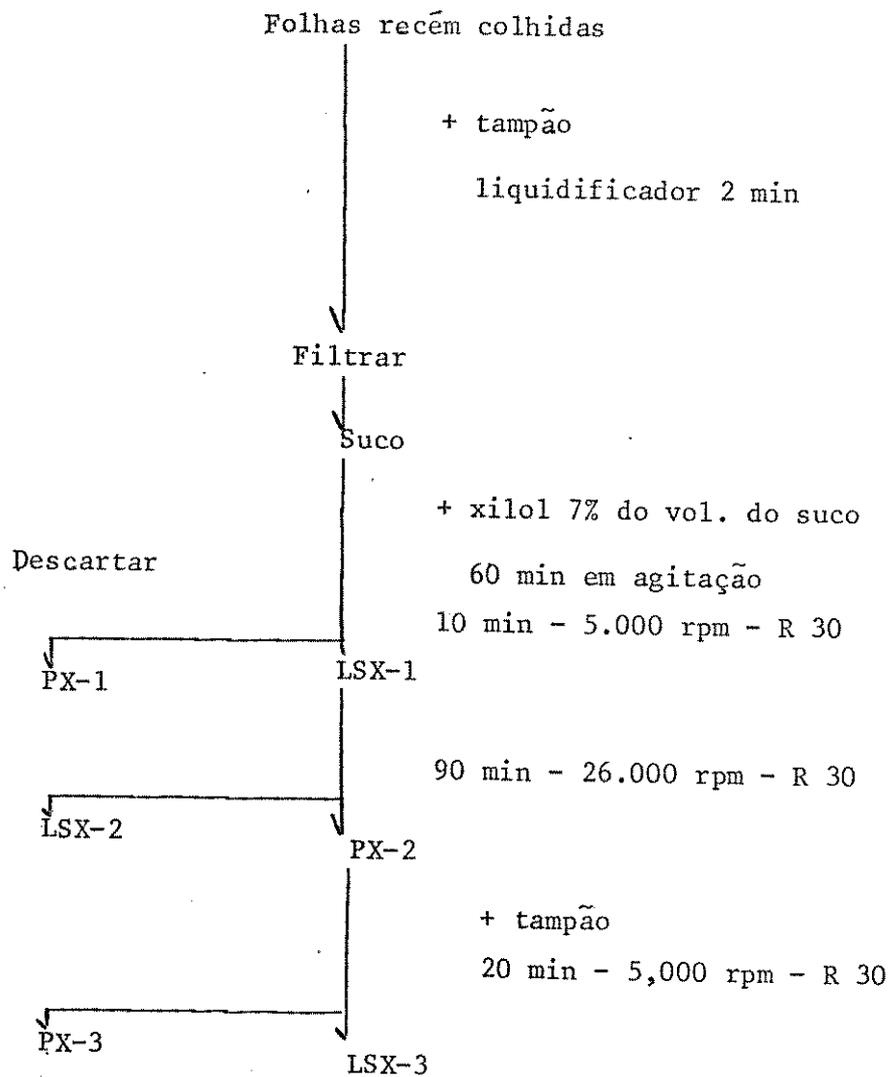
#### 4.2.2. Purificação do VMDT pela técnica do xilol

Folhas recém colhidas (80-100g) foram homogeneizadas em liquidificador em presença de TF (2ml TF/g de folha), a seguir, o material foi filtrado em pano de morim duplo (esquema 2). Ao suco, acrescentou-se xilol na concentração de 7% em relação ao volume do suco filtrado. Após 60 min em agitação constante o material foi centrifugado por 10 min a 5.000 rpm no R 30. O sedimento resultante (PX-1) foi descartado e o sobrenadante (LSX-1) foi submetido a uma ultracentrifugação por 90 min a 29.000 rpm no R30. Eliminou-se o sobrenadante (LSX-2) e o "pellet" (PX-2) foi dissolvido em TF. Após centrifugação por 20 min a 5.000 rpm no R 30 obteve-se um sedimento (PX-3) que foi eliminado e um sobrenadante (LSX-3) considerada como a fração purificada do vírus, utilizada no preparo de AS e em estudos de morfologia.

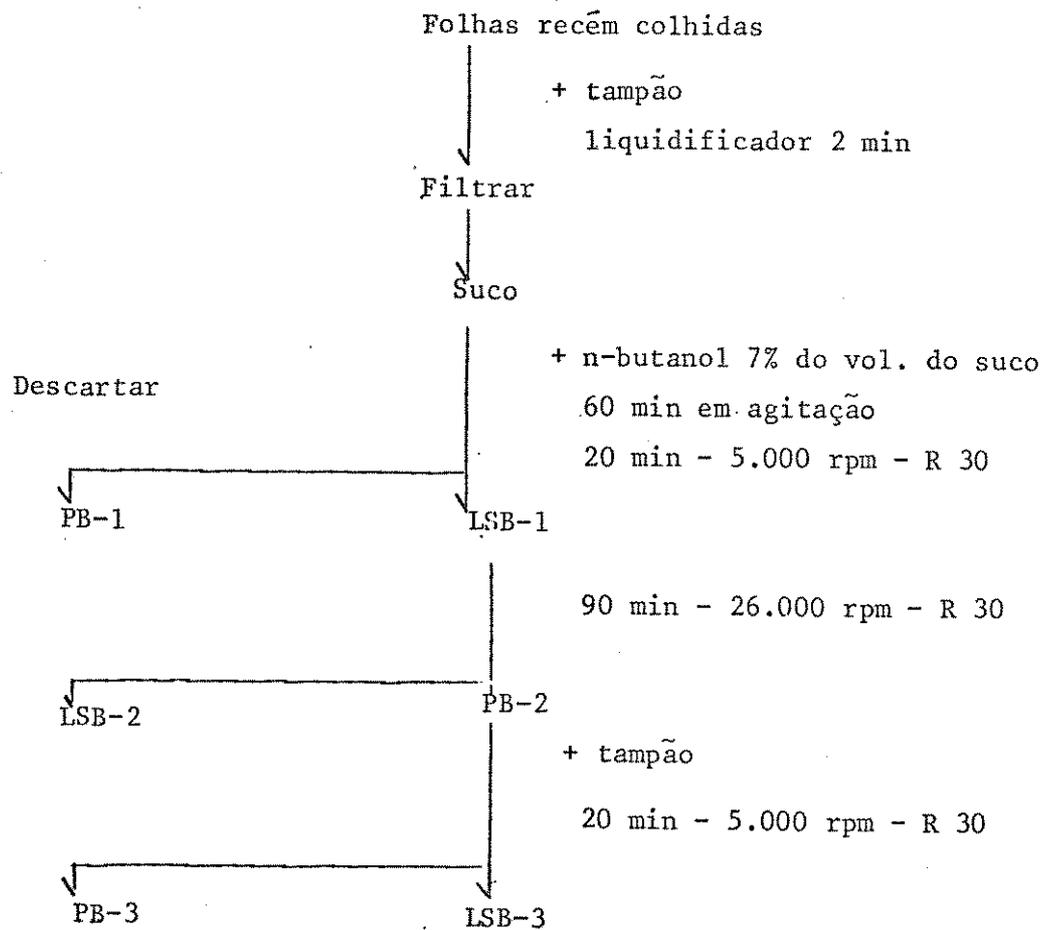
#### 4.2.3. Purificação do VMDT pela técnica do butanol

Folhas recém colhidas (100g) foram homogeneizadas em liquidificador em presença de TF (2m TF/g de folha) (esquema 3). O material foi filtrado em pano de morim e ao suco obtido adicionou-se 7% de n-butanol. Após 60 min em agitação, procedeu-se uma baixa centrifugação por 20 min a 5.000 rpm no R 30. O sedimento (PB-1) foi descartado e o sobrenadante (LSB-1) foi submetido a uma ultracentrifugação por 90 min a 26.000 rpm no R 30; eliminou-se o sobrenadante (LSB-2) e o "pellet" (PB-2) foi ressuspenso em TF para depois ser centrifugado por 20 min a 5.000

Esquema 2 - Fases da purificação do VMDT segundo a técnica do xilol



Esquema 3 - Fases da purificação do VMDT segundo a técnica do butanol



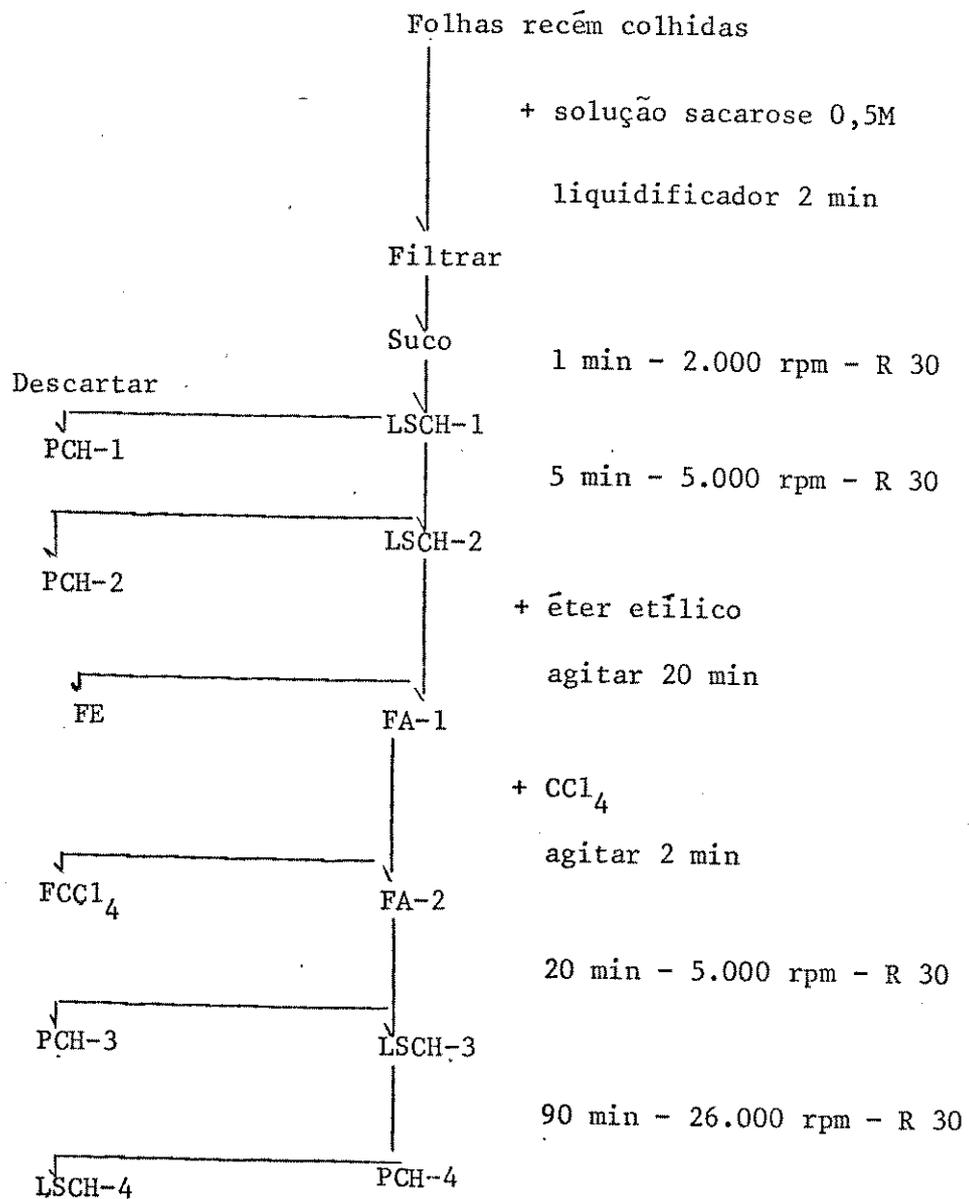
rpm no R 30. O sobrenadante obtido (LSB-3) foi considerado fração purificada do vírus e foi utilizado no preparo de AS em estudos biológicos e serológicos.

#### 4.2.4. Purificação do VMDT pela técnica de eliminação de cloroplastos

Para eliminação dos cloroplastos, folhas recém colhidas (100g) foram homogeneizadas num liquidificador em presença de solução de sacarose 0,5M em água destilada (esquema 4). O material foi filtrado em pano de morim duplo e o suco foi centrifugado por 1 min a 2.000 rpm no R 30. O sedimento (PCH-1) foi descartado e o sobrenadante (LSCH-1) foi centrifugado durante 5 min a 5.000 rpm no R 30. Após essa centrifugação, descartou-se o precipitado (PCH-2) e o sobrenadante (LSCH-2) foi considerado livre de grande parte de cloroplastos.

Em seguida, ao sobrenadante (LSCH-2) foi adicionado igual volume de éter etílico, deixando-se o material em agitação por 20 min. A fase atérea (FE) foi eliminada através de um funil separador e a fase aquosa (FA-1) acrescentou-se tetracloreto de carbono numa proporção de 1/3 do volume do éter adicionado anteriormente ao sobrenadante (LSCH-1). Após agitar por 2 min, separou-se a fase contendo tetracloreto (FCCL-4) em funil separador e a fase aquosa (FA-2) foi centrifugada por 20 min a 5.000 rpm no R 30. O sedimento (PCH-3) foi descartado e o sobrenadante (LSCH-3) foi submetido a uma ultracentrifugação por 90 min a 26.000 rpm no R 30. O "pellet" (PCH-4) ressuspendido em TF foi considerado vírus purificado, sendo empregado no preparo de antissoro e em testes biológicos e serológicos.

Esquema 4 - Fases da purificação do VMDT segundo a técnica da eliminação dos cloroplastos



#### 4.2.5. Purificação do VMDT pela técnica do polietilenoglicol

Folhas recém colhidas (120g) foram homogeneizadas em liquidificador em presença de TF (esquema 5). Após filtrar em pano de mo rim duplo, adicionou-se ao suco obtido 7% de solução contendo n-butanol e cloroformio em partes iguais. O material permaneceu em agitação cons tante durante 60 min, sendo, a seguir, centrifugado por 20 min a 5.000 rpm no R 30; eliminou-se o sedimento (PPG-1) e o líquido sobrenadante (LSPG-1) foi submetido a tratamento com polietilenoglicol (Carbowax 6.000) a 10% mais cloreto de sódio 0,25M, permanecendo em repouso por uma noite em câmara fria (4°C). Centrifugou-se o material por 15 min a 10.000 rpm no R 30 em temperatura que não ultrapassou 4°C. O sobrenadante (LSPG-2) foi descartado e o sedimento (PPG-2) foi ressuspenso em TF, sendo essa fração centrifugada por 20 min a 5.000 rpm no R 30. O sedimento obtido (PPG-3) foi descartado e o sobrenadante (SPG-3) foi con siderado vírus purificado sendo utilizado no preparo de AS e em testes biológicos e serológicos.

#### 4.3. Avaliação da eficiência das técnicas de purificação

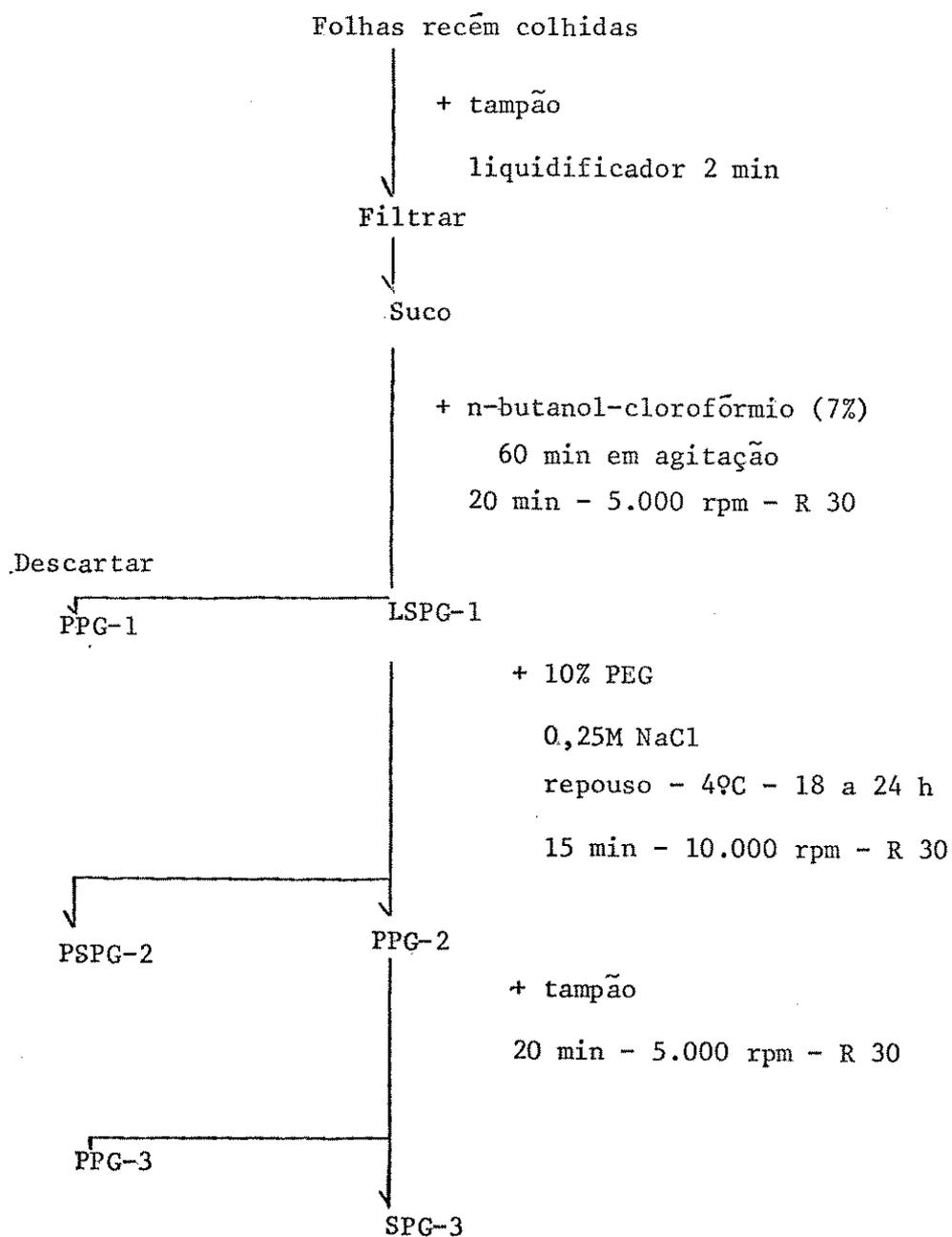
##### 4.3.1. Infectividade das preparações de VMDT

Plantas de glutinosa e fumo apresentando 3 a 5 folhas foram inoculadas mecanicamente com as frações finais obtidas nos processos de purificação do VMDT, para verificar a atividade biológica.

##### 4.3.2. Microscopia eletrônica

Alíquotas das frações finas obtidas nos diferentes processos de purificação do VMDT foram observadas ao microscópio eletrônico Siemens Elmiskop I, pela técnica de contrastação negativa, segundo Brenner and Horne (1959).

Esquema 5 - Fases da purificação do VMDT segundo a técnica do polietilenoglicol



### 4.3.3. Testes serológicos

Testes serológicos de dupla difusão em ágar com o antissoro AS-VMDT-220 que apresenta apenas reação com componentes normais das células hospedeiras foram utilizados para avaliar a pureza das frações finais de cada processo de purificação, empregadas como antígeno no preparo de antissoros.

Os antissoros preparados com as frações finais de cada processo de purificação foram testados em dupla difusão em ágar com antígenos de folhas de hospedeiras de glutinosa e fumo infectadas com o VMDT e sadias, visando observar diferença serológica entre planta sadia e doente.

### 4.4. Preparo de antissoros

Coelhos, pesando em média 3 kg, foram injetados com preparações de VMDT purificado segundo as diferenças técnicas descritas (Esquemas 1 a 5). Os animais foram submetidos aos esquemas de imunização indicados no Quadro 1, após sangria para obtenção de soro normal (SN). Tanto os SN como os AS foram colocados em frascos de plástico (1ml/frasco) e, após a adição de azida sódica (1:5.000), foram conservados em congelador (-20°C).

#### 4.4.1. Esquemas de imunização

Esquema A - os animais receberam três injeções intravenosas (iv) de 0,5ml de antígeno em dias alternados. Quinze dias após a 1ª injeção intravenosa foi feita 1 injeção no linfonódulo (iln) de 0,5 ml de antígeno emulsionado em

0,5 ml de adjuvante Freund incompleto. Durante 30 dias após a 1ª injeção de antígeno foram feitas sangrias diárias.

Esquema B - os coelhos receberam 2 doses de antígeno (0,5ml) emulsionado em adjuvante Freund in completo (0,5ml) com intervalo de 15 dias e 3 injeções intravenosas (0,5ml) de antígeno em dias alternados. Durante 30 dias após a 1ª injeção foram feitas sangrias diárias.

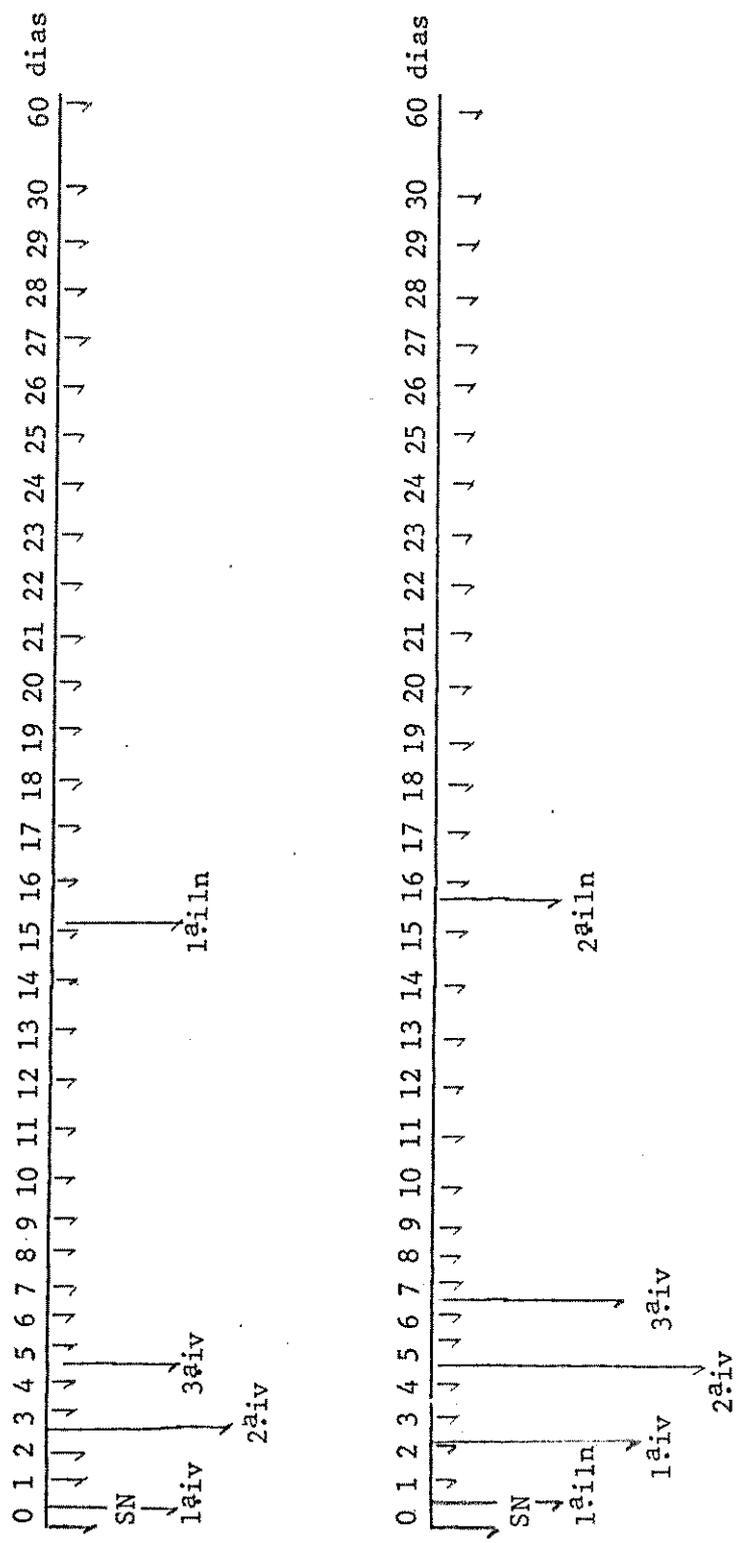
4.4.2. Utilizando preparações purificadas do VMDT foram preparados os seguintes antissoros:

| Código do Antissoro | Esquema de imunização | Antígeno utilizado na imunização |                             |
|---------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------------|
|                     |                       | Fração                           | Técnica de purificação      |
| AS-VMDT-220         | B                     | LSX-3                            | Xilol                       |
| AS-VMDT-225         | B                     | PCH-4                            | Eliminação dos cloroplastos |
| AS-VMDT-228         | B                     | "                                | "                           |
| AS-VMDT-229         | A                     | GET-1                            | Éter-tetracloro de carbono  |
| AS-VMDT-230         | A                     | LSB-3                            | Butanol                     |
| AS-VMDT-235         | B                     | "                                | "                           |
| AS-VMDT-236         | B                     | SPG-3                            | Polietilenoglicol           |
| AS-VMDT-237         | B                     | "                                | "                           |

#### 4.5. Título dos Antissoros

A determinação do título de cada antissoro foi feita em testes de dupla difusão em ágar.

Quadro 1. Esquemas de imunização utilizados no preparo de antissoros para o VMDT.



SN - soro normal  
 J - sangria  
 J - injeção  
 iv - injeção venosa  
 iln - injeção no linfonódulo com adjuvante  
           incompleto de Freund

Para os antissoros AS-VMDT-220, 225, 228, 229 230 e 235 os títulos foram determinados em relação ao componente antigênico da planta hospedeira, contaminante presente nas preparações finais das várias purificações do VMDT. A linha de precipitação observada foi denominada linha a de precipitação.

Para os antissoros AS-VMDT-236 e 237 foram determinados os títulos em relação ao componente normal das células hospedeiras (linha a de precipitação) e em relação ao vírus. A linha de precipitação obtida para o VMDT foi denominada linha b de precipitação.

#### 4.6. Testes serológicos com vários antígenos

##### 4.6.1. Frações finais das purificações do VMDT

As frações obtidas segundo as técnicas de purificação do xilol (LSX-3), eliminação dos cloroplastos (PCH-4), éter-tetracloro de carbono (GET-1), butanol (LSB-3) e polietilenoglicol (SPG-3) foram utilizadas como antígenos em testes serológicos de dupla difusão em ágar com o antissoro AS-VMDT-220 para verificar a presença do componente normal das células hospedeiras. Suco bruto de folhas de glutinosa e fumo serviram como controle.

##### 4.6.2. Suco de plantas hospedeiras

Suco bruto de folhas de glutinosa e fumo sadias e infectadas com VMDT foram empregados em testes serológicos de dupla difusão em ágar com todos os antissoros preparados para verificar diferenças serológicas entre os antígenos de plantas sadias e infectadas.

#### 4.6.3. Fração do VMDT purificada pela técnica do polietilenoglicol

A fração SPG-3 obtida na purificação do VMDT segundo a técnica do polietilenoglicol foi empregada em testes de dupla difusão em ágar para determinação do título precipitante dos antissoros AS-VMDT-236 e AS-VMDT-237.

#### 4.7. Diagnóstico serológico da presença do VMDT

A fração do VMDT purificada segundo a técnica do polietilenoglicol (SPG-3) e suco bruto de folhas de glutinosa e fumo infectadas foram utilizados como antígeno em testes de dupla difusão em ágar para diagnosticar a presença do VMDT. Os antissoros empregados no diagnóstico foram os AS-VMDT-236 e AS-VMDT-237.

Controles sadios foram incluídos, para permitir melhor interpretação dos resultados.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Purificação do VMDT

As frações finais obtidas nas purificações do VMDT segundo as técnicas do xilol (LSX-3), eliminação dos cloroplastos (PCH-4), éter-tetracloro de carbono (GET-1) e butanol (LSB-3), descritas anteriormente (esquema 1 a 4), não foram infectivas quando inoculadas mecanicamente em plantas de *Nicotiana glutinosa* L. e *N. tabacum* (Quadro 2). Observadas ao microscópio eletrônico, não apresentaram partículas que pudessem representar o vírus. Testes serológicos de dupla difusão em ágar com o antissoro AS-VMDT-220, que apresenta reação positiva com antígeno de planta sã, indicaram a presença do componente normal das células hospedeiras nessas preparações.

A fração final obtida pela técnica do polietilenoglicol (SPG-3), inoculada em plantas-teste de glutinosa e fumo, induziu o aparecimento de sintomas do mosaico dourado do tomateiro (Quadro 2). Observadas ao microscópio eletrônico, amostras dessa fração, conservadas em câmara fria (4°C) durante 10 dias, exibiram alta concentração de partículas simples de diâmetro em torno de 14 nm (Fig. 1). Os testes serológicos feitos com o AS-VMDT-220, indicaram a presença do componente normal das células hospedeiras na preparação.

Quadro 2. Resultados dos testes de infectividade de frações do VMDT purificado segundo várias técnicas

| Técnicas                         | Fração inoculada | Plantas inoculadas (INO) e infectadas (INF) |     |      |     |
|----------------------------------|------------------|---|-----|------|-----|
|                                  |                  | Glutinosa                                   |     | Fumo |     |
|                                  |                  | INO   | INF | INO  | INF |
| Xilol                            | LSX-3            | 2   | 0   | 1    | 0   |
| Cloroplastos                     | PCH-4            | 3   | 0   | 1    | 0   |
| éter-tetracloro<br>to de carbono | GET-1            | 2   | 0   | 2    | 0   |
| butanol                          | LSB-3            | 5   | 0   | 5    | 0   |
| PEG                              | Suco             | 6   | 6   | 3    | 3   |
|                                  | PPG-2            | 6   | 6   | 3    | 3   |
|                                  | SPG-3            | 6   | 6   | 3    | 3   |

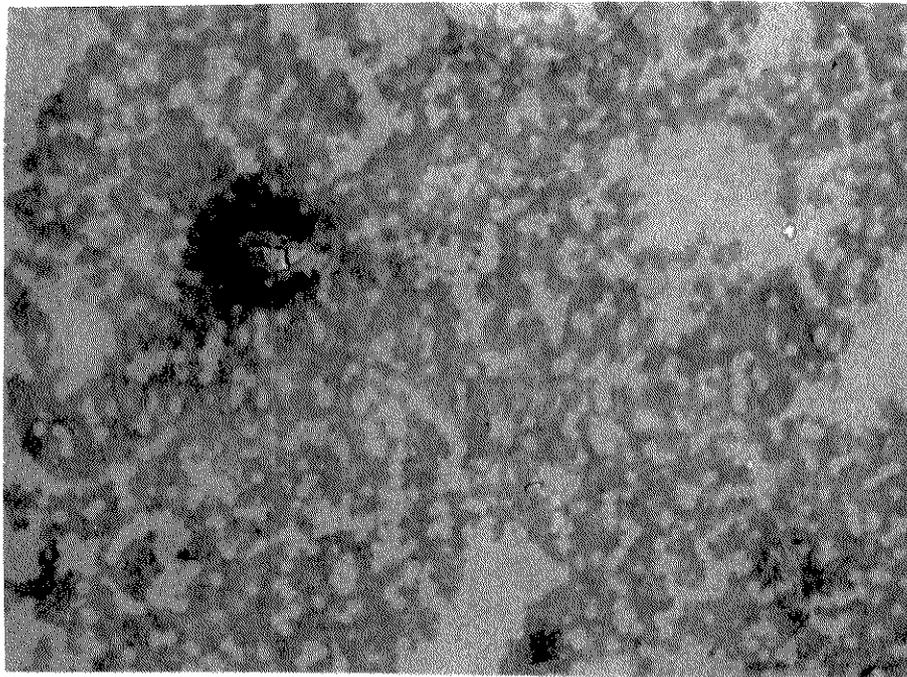


Fig. 1. Fotomicrofotografia eletrônica em contrastação ne  
gativa de preparação do VMDT purificado pela t $\tilde{e}$ c-  
nica do polietilenoglicol (SPG-3) mantida em c $\tilde{a}$ ma  
ra fria (4°C) durante 10 dias (139.800X).

## 5.2. Título dos antissoros

A determinação do título dos antissoros foi feita em testes de dupla difusão em ágar (Quadro 3).

O título dos antissoros foi determinado em relação ao VMDT e ao componente normal das células hospedeiras. A linha de precipitação obtida com o antígeno de planta sadia foi denominada linha de precipitação a e a linha obtida com o VMDT foi denominada linha de precipitação b.

O título máximo observado para o componente normal da planta hospedeira foi 1:16 apresentado pelo antissoros AS-VMDT-236. O mesmo antissoros apresentou título de 1:2 para o VMDT.

## 5.3. Testes serológicos com suco de plantas hospedeiras

Suco bruto de folhas de glutinosa e fumo sadias e infectadas com VMDT foi utilizado como antígeno nos testes de dupla difusão em ágar com os antissoros preparados com as frações finais nos diferentes processos de purificação do VMDT.

Os testes mostraram que os antissoros AS-VMDT-220, 225, 228, 229, 230 e 235 apresentam reação positiva tanto com antígeno de planta sadia como infectada com o VMDT. A Fig. 2 mostra os resultados obtidos nos testes com suco bruto de folhas de fumo sadio e infectado contra o antissoros AS-VMDT-220, evidenciando a presença apenas da linha de precipitação a.

Testes realizados com os antissoros AS-VMDT-236 apresentaram resultados (Fig. 3 e 4) que permitem diferenciar antígeno de planta sadia e infectada com o VMDT.

Quadro 3. Título (\*) máximo dos antissoros para o componente normal da planta hospedeira (linha de precipitação a) e para o VMDT (linha de precipitação b) determinado em testes de dupla difusão em ágar.

| Fração | Antígeno imunizante<br>Técnica de purificação | Código do<br>Antissoro | Esquema de<br>imunização | Número de dias após a 1.ª injeção de antígeno |   |    |   |    |   |
|--------|---|------------------------|--------------------------|---|---|----|---|----|---|
|        |   |                        |                          | 15  |   | 30 |   | 60 |   |
|        |   |                        |                          | a   | b | a  | b | a  | b |
| LSX-3  | Xilol   | AS-VMDT-220            | B                        | -   | - | P  | - | 8  | - |
| PCH-4  | Eliminação de cloroplastos                    | AS-VMDT-225            | B                        | -   | - | P  | - | 2  | - |
| "      | "   | AS-VMDT-228            | B                        | -   | - | 2  | - | 4  | - |
| GET-1  | Éter-tetracl. de carbono                      | AS-VMDT-229            | A                        | P   | - | P  | - | 2  | - |
| LSB-3  | Butanol                                       | AS-VMDT-230            | A                        | -   | - | P  | - | 2  | - |
| "      | "   | AS-VMDT-235            | B                        | -   | - | P  | - | 2  | - |
| SPG-3  | Polietilenoglicol                             | AS-VMDT-236            | B                        | P   | - | 2  | P | 16 | 2 |
| "      | "   | AS-VMDT-237            | B                        | P   | - | P  | P | 2  | P |

(\*) Os títulos são representados pelo inverso da diluição

P Antissoro puro

(-) Ausência de linha de precipitação

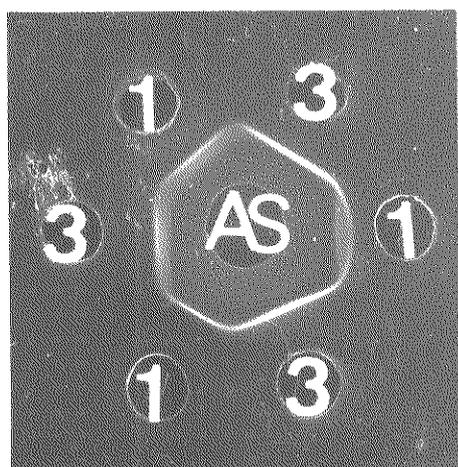


Fig. 2. Linhas de precipitação obtidas no teste serológico de dupla difusão em ágar com (1) suco bruto de folhas de fumo sadio e (3) infectado com VMDT. O antissoro utilizado foi o AS-VMDT 220.

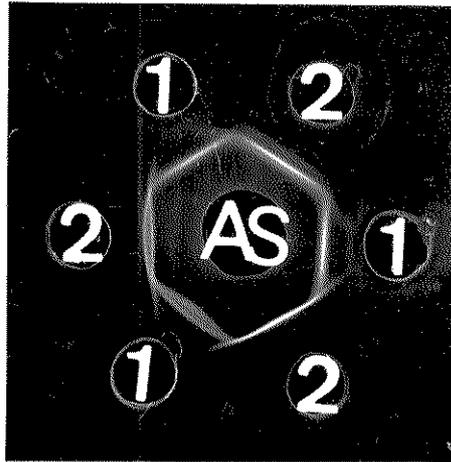


Fig. 3. Linhas de precipitação obtidas no teste serológico de dupla difusão em ágar com (1) suco de folhas de fumo sadio e (2) infectado com o VMDT. O antissoro empregado foi o AS-VMDT - 236.

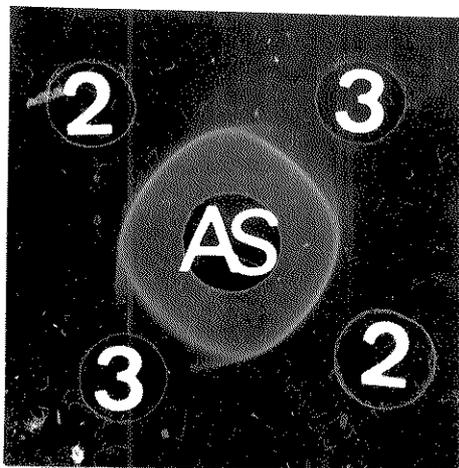


Fig. 4. Linhas de precipitação obtidas no teste serológico de dupla difusão em ágar com (2) suco bruto de folhas de glutinosa infectada com VMDT e (3) sadia. O antissoro utilizado foi o AS-VMDT-236.

#### 5.4. Testes serológicos com a fração do VMDT purificada segundo a técnica do polietilenoglicol

A fração final obtida na purificação do VMDT segundo a técnica do polietilenoglicol (SPG-3) apresentou reação positiva em testes serológicos de dupla difusão em ágar com os antissoros AS-VMDT-236 e AS-VMDT-237 evidenciando a presença de linha de precipitação com o VMDT (linha de precipitação b) (Fig. 5 e 6).

Os controles sadios incluídos nos testes permitiram observar a ocorrência de reação positiva também com componente normal da planta hospedeira (linha de precipitação a).

#### 5.5. Diagnóstico serológico da presença do VMDT

No diagnóstico serológico da presença do VMDT em suco bruto de hospedeira de glutinosa e fumo infectados, apenas o AS-VMDT-236 a apresentou resultados satisfatórios que permitem observar diferença serológica entre antígeno de planta infectada e controle sadio (Fig. 3 e 4).

Utilizando-se como antígeno preparação de VMDT obtida segundo a técnica do polietilenoglicol, foi possível evidenciar a presença do vírus em testes de dupla difusão com os antissoros AS-VMDT-236 e AS-VMDT-237.

Em todos os testes em que se utilizou como antígeno preparações de VMDT purificadas segundo a técnica do polietilenoglicol e os antissoros AS-VMDT-236 e AS-VMDT-237, foi possível observar a linha de precipitação b decisiva no diagnóstico da presença do VMDT (Fig. 5 e 6).

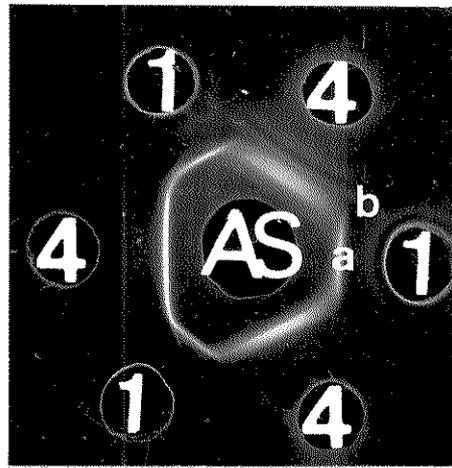
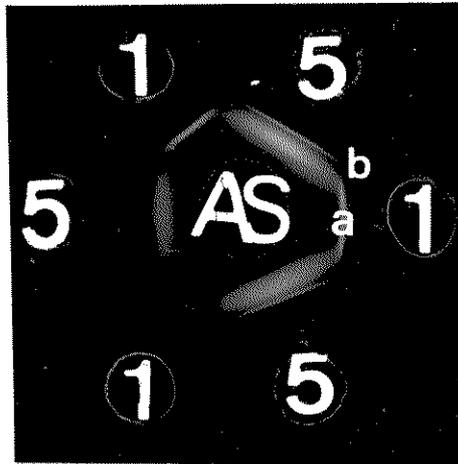


Fig. 5. Testes serológicos de dupla difusão em ágar com (1) suco de folhas de glutinosa sadia e (4) e (5) preparação purificada de VMDT (SPG-3). O an tissoro utilizado foi AS-VMDT-236.

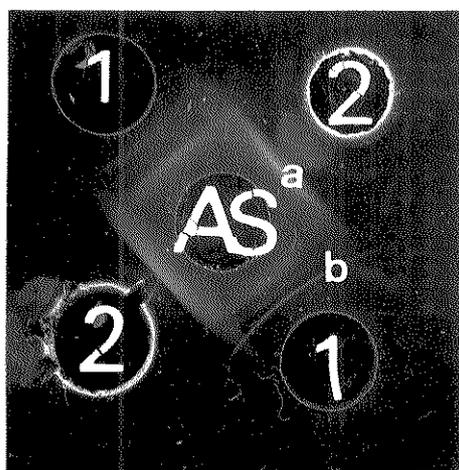


Fig. 6. Linhas de precipitação observadas em testes serológicos de dupla difusão em ágar com (1) suco bruto de folhas de fumo sadio e (2) fração (SPG-3) purificada segundo a técnica do polietilenoglicol. O antissoro empregado foi o AS-VMDT-237.

## 6. DISCUSSÃO

Embora sejam muitas as técnicas e métodos já descritos em trabalhos de purificação de vírus de plantas, nem sempre se obtém os resultados desejados, sendo, muitas vezes, necessária a introdução de algumas variações e adaptações para o material a ser estudado.

Várias técnicas foram adotadas na purificação do VMDT (esquemas 1 a 5) e os resultados indicaram que o método do xilol, butanol, éter-tetracloro de carbono e eliminação de cloroplastos íntegros não são adequados para esse vírus. As frações finais obtidas segundo esses esquemas não foram infectivas nem apresentaram qualquer tipo de partícula e os antissoros com elas preparados apresentaram reação positiva apenas com o componente normal da planta hospedeira.

A fração final obtida segundo a técnica do polietilenoglicol mostrou ser infectiva quando inoculada mecanicamente em plantas-teste e apresentou alta concentração de partículas simples com diâmetro em torno de 14 nm.

A técnica do polietilenoglicol, além de apresentar bons resultados com relação à preservação da atividade biológica e serológica do VMDT, é um método simples sem muitas operações e que permite

obter, num curto período, uma preparação de pureza e concentração satisfatórias para o preparo de antissoros.

Com referência à morfologia das partículas observadas nas nossas preparações de VMDT, acreditamos não ser essa forma simples a que representa o vírus. Relatos e trabalhos anteriores de Matyis *et alii* (1975), mostraram com muitas evidências que a infectividade da preparação está associada à forma geminada. Observações semelhantes foram feitas por Galvez e Castaño (1976), quando estudaram o vírus do mosaico dourado do feijoeiro (VMDF) que apresenta também morfologia geminada; segundo esses autores, a dissociação das partículas resulta no total perda de infectividade.

As observações de Vega e Costa (1979) que encontram partículas geminadas em preparações feitas segundo a técnica do "leaf dip", e os trabalhos de Matyis *et alii* (1980), que observaram partículas dímeras no núcleo de células infectadas com o VMDT, contribuem diretamente para a aceitação de que as partículas geminadas devem representar o vírus do mosaico dourado do tomateiro (VMDT).

Ponto importante a ser determinado é se a infectividade do VMDT está dependente de partículas geminadas ou se, mesmo separadas, permanecem infectivas. Nossos resultados não permitem abordar esse aspecto, pois, as preparações que apresentaram partículas simples não foram utilizadas em testes biológicos. Costa (1976) cita que preparações purificadas do VMDT mostraram-se ainda infectivas após 8 dias a 4°C, porém, observações ao microscópio eletrônico dessas frações não foram mencionadas.

A explicação mais viável para a discordância dos nossos resultados em relação aos citados em literatura é que durante a conservação da fração purificada do VMDT em câmara fria, alterações ocorreram e as partículas dimeras se dissociaram e passaram a constituir complexos com número variado de componentes como se observa na Fig. 1.

Goodman *et alii* (1977) acreditam que as partículas do VMDF sejam simples e que as técnicas de purificação e fixação para fins de microscopia eletrônica sejam responsáveis pelas formas dimeras ou mesmo trimeras, baseados em observações que fizeram quando estudaram o vírus do mosaico dourado do feijoeiro em preparações purificadas. Para os autores, partículas geminadas seriam resultantes da fixação com formaldeído ou glutaraldeído.

Os inúmeros relatos da ocorrência de formas dimeras associadas aos agentes de moléstias transmitidas pela mosca-branca *Bemisia tabaci*, tanto em preparações purificadas como em observações feitas em secções ultrafinas de material infectado, conforme citam Kim *et alii* (1978) e Kim and Flores (1979) nos levam a aceitar, sem qualquer dúvida, que a morfologia dimeras representa a forma predominante dentro do complexo grupo de fitovírus associado àquele inseto vetor, não sendo essa forma decorrente de técnicas de fixação purificação empregadas.

Na investigação serológica, os resultados atendem aos objetivos inicialmente propostos; após inúmeras tentativas, foi possível obter antissoros que permitem diagnosticar a presença do vírus do mosaico dourado do tomateiro. Resultados não satisfatórios anteriormente observados devem ser atribuídos à ausência de partículas de vírus nas preparações empregadas como antígeno imunizante, em concentração suficiente para promover produção de anticorpos específicos.

A avaliação serológica da eficiência das várias técnicas de purificação empregadas mostrou que a técnica do polietilenoglicol é indicada no preparo de antissoros. Constatou-se nos testes serológicos que essa técnica promove também a precipitação de grande quantidade de material das células hospedeiras e, principalmente, quando é feita preparação de material infectado com o VMDT, pois há indicações seguras de que esse vírus induz aumento considerável do contaminante antigênico, provavelmente a "Fraction-1 protein" mencionada por Regenmortel (1964).

As amostras diárias das sangrias feitas durante o preparo dos antissoros para o VMDT estão sendo empregadas também em estudos do comportamento antigênico dessa fração, a fim de se obter dados que permitam, futuramente, proceder purificações que forneçam antígenos com maior pureza.

## 7. CONCLUSÕES

1. A técnica do polietilenoglicol apresentou resultados que permitem considerá-la como um método eficiente na purificação do vírus do mosaico dourado do tomateiro (VMDT).
2. O VMDT precipitado segundo a técnica do polietilenoglicol conserva suas propriedades biológicas e antigênicas.
3. Fração considerável do componente normal das células hospedeiras é também precipitada e concentrada pela técnica do polietilenoglicol.
4. Resultados negativos no diagnóstico da presença do VMDT em suco bruto de folhas de hospedeira de glutinosa e fumo não devem ser considerados definitivos.
5. A fração obtida pela técnica do polietilenoglicol a partir de material de hospedeira de fumo e glutinosa permite um diagnóstico serológico da presença do VMDT, podendo os resultados serem considerados conclusivos.
6. Os antissoros preparados para o VMDT poderão, eventualmente, contribuir para estudos das relações entre esse agente transmitido pela mosca-branca *Bemisia tabaci* e outros do mesmo complexo, que apresentam algumas semelhanças.

## 8. SUMMARY

TITLE: "TOMATO GOLDEN MOSAIC VIRUS (TGMV) PURIFICATION AND SEROLOGY"

In order to prepare specific antisera to the tomato golden mosaic virus (TGMV), a whitefly-transmitted agent, five purification methods were tried. The techniques used in this work were: xylol, carbon tetrachloride, butanol, chloroplasts elimination, and polyethylene glycol.

Bio-assays and serological tests have shown that the polyethylene glycol technique was the best for purification. It was carried out, as follows: infected leaves of *Nicotiana glutinosa* L. and *N. tabacum* L. were homogenized in 0.02M potassium phosphate buffer at pH 7.0 plus 0.02M  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ; the clarification was carried out with 7% chloroform combined with n-butanol and TGMV precipitated with 10% PEG (Carbowax-6.000)-0.25M NaCl, followed by low-speed centrifugation.

TGMV is an immunogenic virus type and double diffusion tests performed with purified preparations against their antisera showed a precipitin line (line b), seen in Fig. 5,6.

9. LITERATURA CITADA E BIBLIOGRAFIA

- BALL, ELLEN, M. and MYRON K. BRAKKE. 1968. Leaf-dip serology for electron microscopic identification of plant viruses. *Phytopathology*, 36:152-155.
- BIRD, J. and K.MARAMOROSCH. 1978. Viruses and virus diseases associated with whiteflies. *Adv. Virus Res.*, 22:55-110.
- BIRD, J. AMELIA C. MONLLOR, JOSEFINA SANCHEZ & RITA RODRIGUEZ. 1977. Propiedades de los virus transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci* Genn. en Puerto Rico. *Fitopatología*, 12(1):31-32.
- BIRKELAND, JORGEN M., 1936. On the classification of plant viruses. *Phytopathology*, 26:455-458.
- BOCK, K.R., E.J. GUTHRIE and R.D. WOODS. 1974. Purification of maize streak virus and its relationship to viruses associated with streak diseases of sugar cane and *Panicum maximum*. *Ann. Appl. Biol.*, 77:289-296.
- BOCK, K.R., E.J. GUTHRIE and GINA MEREDITH. 1978. Distribution, host range, properties and purification of cassava latent virus, a geminivirus. *Ann.Appl.Biol.*, 90:361-367.

- BOCK, K.R., E.J. GUTHRIE, GINA MEREDITH and H.BARKER. 1977. RNA and protein components of maize streak and cassava latent viruses. *Ann.Appl.Biol.*, 85:305-308.
- BRAKKE, M.K. 1969. Isolation and purification of vector-borne plant viruses. In Maramorosch, K. and Koprowski, H. eds. *Viruses, vectors and vegetation*. New York, Interscience, pp. 527-555.
- BRENNER, S. and R.W. HORNE. 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochem.Biophys. Acta*, 34:103-110.
- CHILDS, J.F.L., G.G. NORMAN and J.L. EICHORN, 1958. A color test for exocortis infection in *Poncirus trifoliata*. *Phytopathology*, 48:426-432.
- COSTA, A.S. 1955. Studies on Abutilon mosaic in Brasil. *Phytopatologische Zeitschrift*, 24(1):97-112.
- COSTA, A.S. 1969. White flies as virus vectors. In *Viruses, Vectors, and Vegetation*. Ed. K.Maramorosch. 95-119. New York: Interscience, 666 pp.
- COSTA, A.S. 1974. Moléstias do tomateiro no Brasil transmitidas pela mosca-branca *Bemisia tabaci*. VII Reunião An.Soc.Bras.Fitopatol., Brasília, DF. 3-8 de fevereiro.
- COSTA, A.S. 1975. Increase in the populational density of *Bemisia tabaci* a threat of widespread virus infection of legumes crops in Brasil. In *Tropical Diseases of Legumes*, 27-50. Ed. J. Bird & K.Maramorosch. N.York, San Francisco & London Academic.
- COSTA, A.S., A.R. OLIVEIRA e D.M. SILVA. 1977. Transmissão mecânica do agente causal do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica*, 3:194-200.

- COSTA, A.S., J.O. GASPAR e J. VEGA. 1980. Mosaico angular do feijoeiro causado por um vírus do grupo S transmitido por mosca-branca. I Seminário sobre Pragas e Doenças do Feijoeiro. Campinas, 6-7 maio.
- COSTA, A.S., D.M. SILVA, A.R. OLIVEIRA e J.C. MATYIS. 1976. Estirpe do vírus do mosaico dourado do tomateiro que causa nervuras amarelas em fumo. IX Congresso Anual da Soc. Bras. de Fitopatologia. Campinas, SP. 2-6 fevereiro.
- DIENER, T.O. 1972. Viroids. *Adv. Virus Res.*, 17:295-313.
- DIENER, T.O. 1977. Viroids. *Acta Botanica Indica*, 5:95-106.
- FLORES, E., SILBERSCHMIDT, K. and KRAMER, M. 1960. Observações de clorose infecciosa das malváceas em tomateiros do campo. *Biológico*, 26:65-69.
- GALVEZ, G.E. and M. CASTAÑO. 1976. Purification of the whitefly transmitted bean golden mosaic virus. *Turrialba*, 26:205-207.
- GARCIA, SARA, P., A.R. OLIVEIRA e A.S. COSTA. 1980. Inativação térmica do vírus do mosaico dourado do tomateiro (VMDT). III Cong. Paulista de Fitopatologia, 28-30 janeiro.
- GARCIA, SARA, P., A.R. OLIVEIRA e A.S. COSTA. 1980. O uso do xilol em purificação do vírus do mosaico dourado do tomateiro (VMDT). III Cong. Paulista de Fitopatologia 28-30 janeiro.
- GOODING JR., G.V. and J.P. TSAKIRIDIS. 1971. Sodium azide as a protectant of serological activity and infectivity of plant viruses. *Phytopathology*, 61:943-944.
- GOODING, JR., G.V. and W.W. BING. 1970. Serological identification of potato virus Y and tobacco etch virus using immunodiffusion plates containing sodium dodecyl sulfate. *Phytopathology*, 60:1293.

- GOODMAN, ROBERT, M., J. BIRD and P. THONGMEEARKOM. 1977. An unusual virus like particle associated with golden yellow mosaic of beans. *Phytopathology*, 67:37-42.
- HAMILTON, R.I. 1964. Serodiagnosis of barley stripe mosaic facilitated by detergent. *Phytopathology*, 54:1290-1291.
- HOLLINGS, M. and OLWEN M. STONE. 1976. Purification and properties of sweet potato mild mottle, a white-fly borne virus from sweet potato (*Ipomea batatas*) in East Africa. *Ann. Appl. Biol.*, 82:511-528.
- KIM, K.S. and E.M. FLORES. 1979. Nuclear changes associated with Euphorbia mosaic virus transmitted by the whitefly. *Phytopathology*, 69:980-984.
- KIM, K.S., T.L. SHOCK and R.M. GOODMAN. 1978. Infections of *Phaseolus vulgaris* by bean golden mosaic virus: Ultrastructural aspects. *Virology*, 89:22-23.
- KITAJIMA, E.W. and COSTA, A.S. 1974. Elongated particles found associated with cassava brown streak. *East African Agr. Forestry J.*, 30:28-30.
- LANGENBERG, WILLEM G. 1974. Leaf-dip serology for the determination of strain relationship of elongated plant viruses. *Phytopathology*, 64:128-131.
- MATTHEWS, R.E.F. 1967. Serological techniques for plant viruses. In: *Methods in Virology*, Vol. III. Academic Press Inc., New York, 766 pp.
- MATTHEWS, R.E.F. 1970. *Plant Virology*. New York: Academic, 778 pp.

- MATYIS, J.C. 1979. Purificação e propriedades bio-físico-químicas do vírus do mosaico dourado do tomateiro e uma de suas estirpes, do mosaico dourado do feijoeiro e do mosaico da Euforbia. Piracicaba, ESALQ, USP. 48 p. (Tese de Mestrado).
- MATYIS, J.C., IRENE M.G. ALMEIDA e D.M. SILVA. 1980. Partículas intranucleares do vírus do mosaico dourado do tomateiro em células foliares de *Nicotiana glutinosa* L. 32ª Reunião Anual da SBPC. Rio de Janeiro, 6-12 de julho.
- MATYIS, J.C., D.M. SILVA, A.R. OLIVEIRA e A.S. COSTA. 1975. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica*, 1(4):267-274.
- MATYIS, J.A., D.M. SILVA, A.R. OLIVEIRA e A.S. COSTA. 1976. Morfologia de três vírus transmitidos por *Bemisia tabaci*. IX Congresso Anual da Soc.Bras.Fitopat., Campinas, SP. 2-6 de fevereiro.
- MINK, G.I. and P.E. THOMAS. 1974. Purification of curly top virus. *Phytopathology*, 64:140-142.
- MOEHEAD, ELLEN L. 1961. The enhancement of antibody response by the use of adjuvants in rabbits immunized with purified plant viruses. *Virology*, 13:249-255.
- MUMFORD, DAVID, L. 1974. Purification of curly top virus. *Phytopathology*, 64:136-139.
- NOORDAM, D. 1973. Identification of plant viruses. *Methods & Experiments*. Centre for Agric. Publ.Doc. Wageningen, 207 pp.
- OLIVEIRA, A.R. 1975. Considerações sobre anti-soros obtidos pela técnica de injeção de antígeno no linfonóculo. *Summa Phytopathologica*, 1:61-64.

- OLIVEIRA, A.R., A.P.C. ALBA e M.B. FIGUEIREDO. 1976. Serologia aplicada ao estudo dos vírus de plantas. *Summa Phytopathologica*, 2: 69-96.
- ROBARDS, A.W. and CAROLYN L. ROBINSON. 1968. Further studies on phytoferritin. *Planta (Berl.)*, 82:179-188.
- ROBARDS, A.W. and P.G. HUMPHERSON. 1967. Phytoferritin in plastids of the cambial zone of willow. *Planta (Berl.)*, 76:169-178.
- SELA, I., I. ASSOULINE, E. TANNE, S. COHEN and S. MARCO. 1980. Isolation and characterization of a rod-shaped, whitefly transmissible, DNA - containing plant virus. *Phytopathology*, 70:226-228.
- SHARP, D.G. and F.A. WOLF. 1949. The virus of tobacco leaf curl I. *Phytopathology*, 39:225-230.
- SHARP, D.G. and F.A. WOLF. 1951. The virus of tobacco leaf curl II. *Phytopathology*, 41:94-98.
- SHEPHERD, ROBERT, J. 1979. DNA plant viruses. *Ann.Rev.Plant Physiol.*, 30:405-423.
- SUN, C.N. 1964. Das auftreten von virus partikeln in Abutilon-chloroplasten. *Experientia*, 20:497.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V. 1964. Purification of plant viruses by zone electrophoresis. *Virology*, 23:495-502.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V. 1964. Separation of an antigenic plant protein from preparations of plant viruses. *Phytopathology*, 54:282-289.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V. 1966. Plant virus serology. *Adv.Virus Res.*, 12: 207-271.

VEGA, J. e A.S. COSTA. 1979. Observação de partículas geminadas do vírus do mosaico dourado do tomateiro pela técnica do "leaf-dip" II Congresso Paulista de Fitopatologia. 17-19 de janeiro.

WETTER, C. 1965. Serology in virus diseases diagnosis. Ann. Rev. Phytopath., 3:19-42.