

WALKYRIA BUENO DE CAMARGO MORAES
Biologista
Bioquímica Fitopatológica
Instituto Biológico - São Paulo
Bolsista do CNPq

ESTUDOS SOBRE UM INIBIDOR DE VÍRUS FITOPATOGÊNICOS PRESENTE
EM EXTRATOS DE ABUTILON STRIATUM DICKS

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

Orientador:

Prof. Dr. AVELINO RODRIGUES DE
OLIVEIRA

Campinas - São Paulo
1973

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNICAMP

"In Memoriam"
Dr. MARIO MENECHINI

AGRADECIMENTOS

Nossos sinceros agradecimentos

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

Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Aldo Focesi Jr.
Universidade Estadual de Campinas

Dr. Alvaro Santos Costa
Instituto Agrônômico de Campinas

Prof. Dr. Darcy Martins da Silva
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Prof. Dr. Humberto de Araújo Rangel
Universidade Estadual de Campinas

Dr. José Reis July
Instituto Biológico

Dr. Adolpho Martins Penha
Instituto Biológico

Dr. Takao Namekata
Instituto Biológico

Dr. Irineu J. B. Camargo
Universidade Estadual de Campinas

Dra. Victoria Rossetti
Instituto Biológico

Biologista Maria Raphaela Musumeci
Instituto Biológico

Biologista Elza Maria Frias Martins
Instituto Biológico

Eng^a. Agr^a. Ednei de Conti Macedo
Instituto Biológico

Eng^o. Agr^o. Aluisio Paiva de Carvalho Alba
Instituto Biológico

Sra. Raquel D'Alessandro Pires
Instituto Biológico

Srta. Erna Elisabeth Bach
Instituto Biológico

Srta. Mariangela de Figueiredo
Bolsista da FAPESP no Instituto Biológico

Sra. Cecilia Abeid Teixeira
Instituto Biológico

Sra. Edith Mackrodt -

Demais funcionários da Secção de Bioquímica Fitopatológica do
Instituto Biológico

Em particular, ao meu marido, Dr. Mario Barreto Figueiredo
Instituto Biológico.

Í N D I C E

	pag.
I. Relação das plantas e microrganismos citados	I
II. Siglas e abreviações	III
III. Relação das tabelas	V
IV. Relação das figuras	VII
1. <u>INTRODUÇÃO</u>	1
2. <u>REVISÃO DA LITERATURA</u>	3
2.1. Presença de inibidores de vírus em plantas superiores	3
2.2. Presença de inibidores de vírus em microrganismos	8
3. <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	12
3.1. Fonte de material	12
3.2. Extração e purificação da substância inibidora	12
3.3. Tratamentos realizados com o inibidor	13
3.3.1. Tratamento por carvão ativo	14
3.3.2. Tratamento por solução amoniacal	14
3.3.3. Filtração em gel de Sefadex	14
3.3.4. Tratamentos enzimáticos	15
3.4. Ensaio para a determinação da substância inibidora	15
3.5. Ensaio sobre inibição de vírus	16
3.6. Ensaio biológico para avaliação da atividade do inibidor sobre a infectividade do TMV em plantas de glutinosa	18
3.7. Comportamento da mistura vírus - inibidor (VI)	19
3.8. Mecanismos de ação do inibidor	20
3.9. Ação do inibidor sobre diferentes vírus, em diferentes hospedeiros	20

	pag.
4. <u>RESULTADOS</u>	22
4.1. Efeito da diálise sobre a ação do inibidor	22
4.2. Efeito do tratamento desproteinizador sobre a ação do inibidor	23
4.3. Efeito do tratamento do inibidor por carvão ativo	23
4.4. Efeito do tratamento do inibidor por solução amoniacal	24
4.5. Efeito do tratamento do inibidor por filtração em gel de Sefadex	25
4.6. Efeito do tratamento do inibidor pelas enzimas diastase e pectinase	30
4.7. Espectro de absorção do inibidor ao ultravioleta	31
4.8. Resultado dos ensaios de coloração ou precipitação realizados com o inibidor	32
4.9. Comportamento da mistura TMV-inibidor (VI)	32
4.9.1. Ação da ultracentrifugação sobre a mistura VI	32
4.9.2. Características da ultra-estrutura da mistura VI	35
4.9.3. Comportamento serológico do TMV em presença do inibidor	35
4.9.4. Efeito de diferentes concentrações do inibidor sobre a infectividade do TMV	35
4.9.5. Efeito do inibidor sobre a infectividade do TMV em diferentes concentrações	38
4.10. Mecanismo de ação do inibidor	45
4.10.1. Inoculação do TMV e do inibidor, <u>se</u> paradamente, com diferentes intervalos de tempo	45
4.10.2. Inoculação do TMV e do inibidor, <u>se</u> paradamente, em faces opostas da mesma folha	46
4.10.3. Ação do inibidor sobre diversas combinações vírus-hospedeiro	47

	pag.
5. <u>DISCUSSÃO</u>	50
5.1. Algumas características físico-químicas da substância inibidora	50
5.2. Algumas características da mistura vírus-inibidor e considerações sobre o mecanismo de ação do inibidor	55
6. <u>CONCLUSÕES</u>	69
7. <u>RESUMO</u>	71
8. <u>SUMMARY</u>	73
9. <u>LITERATURA CITADA</u>	75

I. RELAÇÃO DAS PLANTAS E MICRORGANISMOS CITADOS

NOME CIENTÍFICO	NOME VULGAR
<u>Abutilon striatum</u> Dicks	abudelom, abútilom
<u>Anthirrinum majus</u> L.	boca-de-leão
<u>Beta vulgaris</u> L.	beterraba
<u>Capsicum annum</u> L.	pimentão
<u>Capsicum frutescens</u> L.	pimenteira doce
<u>Chenopodium album</u> L.	-
<u>Chenopodium amaranticolor</u> Coste e Reyn..	-
<u>Chenopodium hybridum</u> L.	-
<u>Chenopodium quinoa</u> Willd	-
<u>Citrullus vulgaris</u> Schrad	melancia
<u>Cucumis melo</u> L.	melão
<u>Cucumis sativus</u> L.	pepino
<u>Cucurbita maxima</u> L.	moranga
<u>Cucurbita pepo</u> L.	aboboreira
<u>Datura stramonium</u> L.	estramonio, figuei ra do inferno.
<u>Dianthus barbatus</u> L.	-
<u>Diantus caryophyllus</u> L.	craveiro
<u>Fragaria vesca</u> L.	morangueiro
<u>Gomphrena globosa</u> L.	gonfrena
<u>Lycopersicon esculentum</u> Mill.	tomateiro
<u>Malva parviflora</u> L.	malva
<u>Nicotiana glutinosa</u> L.	glutinosa
<u>Nicotiana tabacum</u> L.	fumo
<u>Physalis peruviana</u> L.	camapú
<u>Phytolacca decandra</u> L.	carurú de cacho, guaiaco ou uva ame ricana.
<u>Phytolacca esculenta</u> L.	-
<u>Phytolacca rigida</u> Small	-
<u>Pirus malus</u> L.	macieira

NOME CIENTÍFICO

NOME VULGAR

<u>Prunus avium</u> L.	cerejeira
<u>Prunus domestica</u> L.	ameixeira
<u>Prunus persicae</u> Batsch.	pessegueiro
<u>Rhus semialata</u> Murr.	-
<u>Rubus idaeus</u> L.	framboesa
<u>Solanum tuberosum</u> L.	batatinha, batata inglesa
<u>Spinacia oleracea</u> L.	espinafre
<u>Tetragonia expansa</u> Murr.	espinafre da Nova Zelandia
<u>Vigna sinensis</u> (L.) Endl.	caupí

Aerobacter aerogenes (Kruse) Bergey et al

Bacillus radiobacter Beij. & van Deld

Bacillus uniflagellatus Mann.

Phytomonas tumefaciens (= Agrobacterium tumefaciens) (E.F. Sn
& Town) Conn.

Rhacodiella castaneae Peyr.

Aspergillus flavus Link.

Aspergillus niger van Tiegh

Neurospora crassa Shear & Dodge

Neurospora sitophila Shear & Dodge

Physarum polycephalum Schw.

Phytophthora infestans (Mont.) d By

Saccharomyces cerevisiae Meyen

Trichothecium roseum Link.

II. SIGLAS E ABREVIACOES

AMV	vírus do mosaico do abútilom
BYMV	vírus do mosaico amarelo do feijoeiro
CMV	vírus do mosaico do pepino
LMV	vírus do mosaico da alface
LPRSV	vírus da mancha anular latente da batata
NPRSV	vírus da mancha anular necrótica da batata
PVX	vírus X da batata
PRNV	vírus do anel necrótico da batata
SBMV	vírus do "southern bean"
STMV	vírus da necrose branca do fumo
TMV	vírus do mosaico do fumo
TNV	vírus da necrose do fumo
TBSV	vírus do "bushy stunt" do tomateiro
TRSV	vírus da mancha anular do fumo
EB	extrato bruto
FND	fração não dialisável
FD	fração dialisável
FA	fase aquosa
FO	fase orgânica
ED	extrato desproteinizado
IN	inibidor
SC	suco clarificado
VI	mistura vírus-inibidor
S	sintomas sistêmicos
L	sintomas locais
SAB	soro albumina bovina
P	pectina
BD	"Blue dextran 2000"
V _o	volume externo da coluna de Sefadex
V _i	volume interno da coluna de Sefadex

Sd sedimento
Sn sobrenadante
rpm rotações por minuto
v/v volume por volume
nm nanômetro

III. RELAÇÃO DAS TABELAS

Tabelas	pag.
1	Vírus empregados nos ensaios de inibição 16
2	Plantas hospedeiras e tipos de sintomas induzidos pelos diferentes vírus utilizados 21
3	Resultados dos ensaios biológicos efetuados para verificar a ação do EB sobre a infectividade do TMV em folhas de glutinosa 22
4	Resultados dos ensaios biológicos efetuados para verificar a ação do EB desproteínizado sobre a infectividade do TMV em folhas de glutinosa 23
5	Resultados dos ensaios biológicos efetuados para verificar a ação do filtrado do IN, através de carvão ativo, sobre a infectividade do TMV em folhas de glutinosa 24
6	Resultados dos ensaios biológicos efetuados para verificar a ação do IN submetido a um tratamento com solução amoniacal sobre a infectividade do TMV em folhas de glutinosa 25
7	Resultado de um ensaio biológico típico obtido com as frações eluídas, após a filtração do IN em gel de Sefadex G50, sobre a infectividade do TMV em folhas de glutinosa 26
8	Resultado de um ensaio biológico típico obtido com as frações eluídas, após a filtração do IN em gel de Sefadex G25, sobre a infectividade do TMV em folhas de glutinosa 28
9	Resultados dos ensaios biológicos efetuados com o IN, tratado, por 24 ou 48 h, com diastase, sobre a infectividade do TMV em folhas de glutinosa 30

Tabelas

pag.

10	Resultados dos ensaios biológicos efetuados com o IN tratado, por 24 ou 48h, com pectinase, sobre a infectividade do TMV em folhas de glutinosa	31
11	Resultados dos testes biológicos efetuados com as frações Sd e Sn, resultantes da ultracentrifugação da mistura VI, sobre a infectividade do TMV em folhas de glutinosa	34
12	Resultados dos ensaios biológicos efetuados para avaliar a ação de diferentes concentrações do IN sobre a infectividade do TMV em folhas de glutinosa	38
13	Resultado do ensaio biológico efetuado para verificar a ação do IN sobre a infectividade de diferentes concentrações do TMV em folhas de glutinosa	41
14	Valores de y obtidos para cada dose de X (log 1000X), tanto para o TMV tratado com o IN como para o TMV controle	43
15	Média dos probitos para cada dose de X (log 1000), tanto para o TMV tratado com o IN, como para o TMV controle	43
16	Resultados dos ensaios biológicos efetuados para verificar a ação do IN quando aplicado antes, simultâneo ou após o TMV em folhas de glutinosa	45
17	Inoculação do TMV e do IN, separadamente, em faces opostas da mesma folha	46
18	Resultados dos ensaios biológicos efetuados para verificar a ação do IN sobre a infectividade de diversos vírus inoculados em diferentes hospedeiros, nos quais os sintomas induzidos foram locais	48

IV. RELAÇÃO DAS FIGURAS

Figuras	pag.
1	Absorbância das frações eluídas após a filtração do IN e do "Blue Dextran 2000", em coluna de gel de Sefadex G50. Resultado do ensaio biológico realizado com as frações eluídas e combinadas, sobre a infectividade do TMV, em folhas de glutinosa 27
2	Absorbância das frações eluídas após a filtração do IN e do "Blue Dextran 2000", em coluna de gel de Sefadex G25. Resultado do ensaio biológico realizado com as frações eluídas e combinadas, sobre a infectividade do TMV, em folhas de glutinosa 29
3	Espectro de absorção ao ultravioleta de uma solução aquosa do IN comparado aos espectros obtidos para as soluções aquosas de SAB, P e BD 33
4	Eletromicrografias de TMV controle, do IN e da mistura TMV-IN, coradas por <u>contrastação</u> negativa (PTK a 1%, pH 7,0) 36,37
5	Efeito de diferentes concentrações do IN sobre a infectividade do TMV (0,1 mg/ml em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0) em folhas de glutinosa 39
6	Diagramas do número médio de lesões por meia-folha, correspondente ao TMV (controle) e ao TMV-IN, e do efeito do IN (2 mg/ml) sobre a infectividade do TMV, em diferentes concentrações, em folhas de glutinosa 42
7	Linhas de regressão calculadas para o TMV controle e para o TMV-IN, a partir dos resultados do ensaio biológico sobre o efeito do IN na infectividade do TMV em diferentes concentrações 44
8	Aspectos de folhas de diferentes plantas hospedeiras inoculadas na metade direita com a mistura vírus-inibidor e na metade esquerda apenas com o vírus (controle), mostrando a redução de infectividade do vírus causada pelo IN 49

1. INTRODUÇÃO

Os estudos sobre os inibidores naturais presentes em extratos de plantas, e que agem sobre os vírus fitopatogênicos, retardando, inibindo ou paralisando a replicação dos mesmos, são importantes sob vários aspectos dentro do campo da Virologia Vegetal.

Na maioria das vezes, o insucesso nas transmissões mecânicas de vírus fitopatogênicos está relacionada à presença de inibidores nas plantas hospedeiras ou nas usadas como fonte de inóculo.

Um melhor conhecimento da natureza química e do mecanismo de ação destas substâncias sobre os vírus ou sobre os hospedeiros facilitaria, sem dúvida, os trabalhos sobre a transmissão mecânica de certos vírus, tidos, até hoje, como não transmissíveis por suco.

Outro aspecto importante é o que trata da purificação de vírus. Como no caso anterior, a presença de inibidores, nos extratos de plantas, pode interferir nos trabalhos de purificação. O conhecimento das características desses inibidores possibilitaria o emprego de substâncias específicas capazes de bloquear a ação dos inibidores, ou, de métodos físico-químicos capazes de retirá-los do meio de suspensão do vírus.

Um terceiro aspecto a ser considerado é o que se refere à possibilidade de se descobrir, entre as substâncias presentes em extratos de plantas, uma que seja altamente eficien-

te no combate aos vírus de vegetais, sem ser fitotóxica, e que pudesse ser empregada, na prática, como um meio de controle às viroses. Um amplo conhecimento das características e da natureza química dos inibidores, traria a possibilidade dos mesmos poderem ser sinteticamente produzidos, em larga escala e por baixo custo, para que tivessem aplicabilidade prática.

Abutilon striatum Dicks, conhecido vulgarmente por Abudelôn ou Abútilom, é uma planta ornamental pertencente à família Malvaceae, exótica ao Brasil, e suscetível à doenças causadas por vírus, entre as quais, ao mosaico do abútilom (AMV), cujo sintoma é uma variegação intensa do tipo mosaico (COSTA, 1955). FLORES et al. (1967), estudando a possibilidade de transmitir mecanicamente o AMV para plantas de A. striatum e malva (Malva parviflora L.), verificaram que o insucesso de seus experimentos era devido à ação inibidora do extrato de folhas de abútilom. No mesmo trabalho, os autores demonstraram que esse extrato agia também sobre o vírus do mosaico do fumo (TMV), reduzindo consideravelmente a sua infectividade em plantas de glutinosa (Nicotiana glutinosa L.). Tanto o extrato de plantas sadias como o de plantas infectadas pelo AMV demonstraram possuir essa ação inibidora.

O aprimoramento do método de extração e purificação da substância inibidora presente em extratos de folhas de abútilom; o efeito de diversos tratamentos sobre o inibidor; o estudo das principais características e da natureza química do mesmo; o comportamento da mistura inibidor-TMV sob ação de diferentes tratamentos; o provável mecanismo de ação do inibidor sobre a replicação de diversos vírus ou sobre a expressão dos sintomas causados pelos mesmos nas plantas hospedeiras, foram os principais objetivos da presente tese.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Presença de inibidores de vírus em plantas superiores

Segundo BAWDEN (1954), os trabalhos que deram as primeiras indicações de que extratos de certas plantas pudessem conter substâncias inibidoras de vírus, foram realizados com Phytolacca decandra L., conhecida vulgarmente em nosso meio como carurú de cacho, guaiaco ou uva americana. Assim, ALLARD (1918) não obteve sucesso ao tentar transmitir mecanicamente o vírus causador de sintomas de mosaico em plantas de P. decandra para plantas de fumo (Nicotiana tabacum L.) e vice-versa verificando, entretanto, que era possível reproduzir sintomas idênticos de mosaico em plantas de P. decandra, quando estas eram inoculadas com suco de plantas da mesma espécie apresentando sintomas de mosaico.

DOOLITTLE & WALKER (1925), não conseguiram transmitir, mecanicamente, o vírus do mosaico do pepino (CMV) de plantas de P. decandra para plantas sadias de pepino (Cucumis sativus L.). Entretanto, quando usaram afídeos, como vetor, a transmissão pôde ser feita com êxito. DUGGAR & ARMSTRONG (1925) demonstraram que a transmissão mecânica não ocorria devido à presença de substâncias inibidoras presentes no suco de plantas de P. decandra. GRANT (1934), trabalhando com suco de diversas plantas, verificou que a infectividade de TMV era imediatamente anulada quando se adicionava ao inóculo suco de plantas de P. rigida Small. JOHNSON (1938, 1941) e FULTON (1943) estudaram algumas características dessa substância e, KASSANIS & KLECZKOWSKI (1948) conseguiram isolar e identificar um inibidor extraído de P. esculenta L.. Segundo estes autores o inibidor - uma glicoproteína - mostrou-se ativo sobre os vírus TMV, CMV, da necrose do fumo (TNV) e o

"bushy stunt" do tomateiro (TBSV).

KUNTZ & WALKER (1947) verificaram que o extrato de folhas de espinafre (Spinacia oleracea L.) inibia a infectividade dos vírus TMV, CMV, A do repolho, da mancha anular do fumo (TRSV), da mancha anular necrótica da batata (NPRSV), e da mancha anular latente da batata (LPRSV). Segundo estes autores o extrato de espinafre conteria, provavelmente, dois componentes inibidores, um dos quais termolábil, que agiria sobre o TMV e o outro, termoestável, ativo sobre o vírus A do repolho. BLASZCZAK et al. (1959) também demonstraram que o suco de plantas de espinafre da variedade Bloomsdale inibia em cerca de 90% a infectividade do vírus X da batata (PVX), quando inoculado em gonfrena (Gomphrena globosa L.).

Com relação à presença de inibidores em extratos de plantas pertencentes à família Rosaceae, BAWDEN & KLECZKOWSKI (1945) demonstraram a existência de uma ação inibidora sobre o TMV e atribuíram a mesma, à presença de taninos nos extratos de plantas de morango (Fragaria vesca L.) e de framboesa (Rubus idaeus L.). Os autores sugeriram, inclusive, que esses taninos fossem os responsáveis pelos insucessos na transmissão mecânica dos vírus ocorrentes em certas rosáceas. THRESH (1956) relatou a inibição dos vírus TMV e TNV, quando em presença de extratos de folhas de morangueiro, de framboesa ou de ácido tânico obtido de galhas produzidas por afídeos, em folhas de Rhus semialata Murr. CADMAN (1959) estudou o efeito de extratos de folhas de pessegueiro (Prunus persicae Batsch.), macieira (Pirus malus L.), cerejeira (Prunus avium L.), ameixeira (Prunus domestica L.), morangueiro e de plantas de framboesa sobre a infectividade de diversos vírus, dando especial ênfase à ação sobre o vírus do anel necrótico da batata (PRNV), uma vez que este apresentou-se mais intensamente inibido pelas substâncias tânicas presentes nos extratos en-

saiados.

Van der WANT (1951), na Holanda, verificou a existência, em suco de plantas sadias de cravo (Dianthus caryophyllus L.), de um fator capaz de inibir a transmissão do TNV para plantas de cravo ou de D.barbatus L., do TMV para plantas de glutinosa e, de certos vírus do grupo "rattle" para plantas de fumo. Esse inibidor poderia ser a causa das dificuldades encontradas na transmissão mecânica do vírus do mosaico do cravo, de plantas de cravo para plantas da mesma espécie ou para D.barbatus.

WEINTRAUB & GILPATRICK (1952) demonstraram, no Canada, que o extrato de folhas de várias plantas do gênero Dianthus, especialmente de D.barbatus dificultava a transmissão do TRSV de plantas de D.barbatus, para fumo, pepino, estramonio (Datura stramonium L.) e boca-de-leão (Anthirrinum majus L.). Segundo os autores haveria um inibidor no extrato de D.barbatus responsável por tais dificuldades. Verificaram, porém, que o inibidor não tinha efeito sobre a transmissão do TRSV entre plantas de D.barbatus. Além da ação inibidora exercida sobre o TRSV, o inibidor mostrou-se ativo sobre outros vírus reduzindo a infectividade do TMV, CMV e do vírus "etch" do fumo (TEV). Os estudos sobre esse inibidor culminaram com RAGETLI & WEINTRAUB (1962a, 1962b) que purificaram o inibidor, caracterizando-o e determinando o modo de ação do mesmo. A substância, de natureza proteica, foi obtida a partir de extratos de plantas de cravo e ensaiada, quanto à ação inibidora, sobre o TMV em plantas de glutinosa.

SILL (1951) estudou a ação inibidora do extrato de plantas de pepino na transmissão do CMV, verificando que o inibidor estava presente tanto nas folhas como nos tecidos do caule,

raiz e sementes. De várias outras Cucurbitaceae ensaiadas, apenas a melancia (Citrullus vulgaris Schrad.) mostrou possuir uma ação comparável à encontrada em pepino. SILL & WALKER (1952) demonstraram que em plantas de pepino tanto os extratos de tecidos sadios como de tecidos de plantas infectadas pelo CMV eram altamente inibidores de vírus. Comparando a ação dos extratos de plantas de pepino com a de outras plantas, como melancia e espinafre, verificaram que estes se mostraram, também, altamente inibidores. Os extratos de plantas de melão (Cucumis melo L.), moranga (Cucurbita maxima L.), abóbora (Cucurbita pepo L.), caupí (Vigna sinensis (L.) Endl.), fumo, tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) e glutinosa mostraram uma ação inibidora menos acentuada. WEINTRAUB & WILLISON (1953) confirmaram a existência de um inibidor presente em extratos de pepino e sugeriram que fosse uma substância instável. BLASZCZAK et al. (1959) comprovaram a ação inibidora do extrato de pepino sobre a infectividade do PVX quando este era inoculado em gonfrena. FRANCKI (1964), demonstrou que quando extratos de plantas sadias de pepino ou de glutinosa eram adicionados à preparações parcialmente purificadas de CMV, a infectividade era reduzida até cerca de 100 vezes.

McKEEN (1954, 1956) demonstrou que o suco de pimenteira doce (Capsicum frutescens L.), contém uma substância capaz de provocar um decréscimo na formação de lesões locais e primárias por CMV, TEV e do TRSV, quando estes, eram inoculados em plantas de caupí e de Chenopodium hybridum L. Este efeito foi menos evidente, para os mesmos vírus, quando inoculados em fumo, camapú (Physalis peruviana L.). A inibição do número de lesões independeria do vírus inoculado, estando relacionada apenas com as espécies de plantas hospedeiras. Estudando a natureza química dessa substância sugeriu que ela fosse de natureza proteica. A ação inibidora do suco

de pimenteira doce sobre o PVX foi demonstrado por BLASZCZAK et al. (1959). FELDMAN (1963) estudou o efeito de extratos de sementes de pimentão (Capsicum annuum L.) sobre a infectividade do TMV quando este era inoculado em fumo da variedade Xanthi, glutinosa, estramonio, Chenopodium amaranticolor Coste & Reyn e feijão. O extrato também se mostrou ativo para o vírus "Southern bean" (SBMV) quando este era inoculado sobre plantas de feijão. Em trabalhos realizados com batata (Solanum tuberosum L.), BLASZCZAK et al. (1959), JERMOLJEV & ALBRECHTOVA (1965, 1966) puderam verificar a existência de um inibidor da infectividade do PVX em diferentes hospedeiros. Segundo os testes realizados o inibidor seria de natureza proteica.

KUNTZ & WALKER (1947), GREENLEAF (1953) e BLASZCZAK et al. (1959) relataram o efeito inibidor do suco de folhas de plantas pertencentes a família Chenopodiaceae, sobre diversos vírus. THOMSON & PEDDIE (1965) comprovaram a existência de um inibidor em folhas de C. amaranticolor e de C. album L. capaz de inibir a infecção pelo TMV em glutinosa.

CROWLEY (1955), tentando obter uma explicação para a rara transmissibilidade de doenças de vírus através de sementes, conseguiu extrair substâncias que inibiam o CMV e o TMV de sementes de alguns de seus hospedeiros. Verificou ainda que as mesmas eram de natureza proteica e que, embora inibissem a infecção, agiam sobre os hospedeiros, sendo incapazes de inativar os vírus.

FLORES et al. (1967) verificaram a presença de um inibidor em folhas de abútilom, capaz de reduzir a infectividade do TMV em glutinosa. Extratos de plantas de abútilom, tanto sadias como apresentando sintomas causados pelo AMV, quando adicionados ao suco de folhas de malva infectada com AMV impediam a

transmissão deste vírus para plantas sadias de malva. Segundo os autores, quando plantas de abútilom estivessem envolvidas no processo de transmissão de vírus, quer como fonte de inóculo, quer como planta hospedeira, a infecção não se processava.

BENDA (1956) demonstrou que o suco de plantas de espinafre da Nova Zelândia (Tetragonia expansa Murr.) causava um retardamento no aparecimento dos sintomas do TRSV em plantas de caupí.

EBRAHIM-NESBAT & NIENHAUS (1972) trabalharam com extratos de 17 plantas diferentes, estudando o efeito inibidor dos mesmos, para o TMV e o CMV e verificaram que para o caso da beterraba (Beta vulgaris L.) o inibidor era de natureza polissacarídica, enquanto que aquele extraído de espinafre era de natureza proteica.

2.2. Presença de inibidores de vírus em microrganismos

MULVANIA (1926), numa tentativa de explicar a aparente perda de infectividade do TMV quando este era incorporado ao solo, estudou o efeito de culturas de bactérias sobre a infectividade do mesmo e, verificou que certas bactérias eram capazes de inibir completamente o vírus.

JOHNSON & HOGGAN (1937) demonstraram que culturas de Aerobacter aerogenes (Kruse) Bergey et al., inibiam o TMV, enquanto que culturas de Bacillus radiobacter (Beij. & Van Deld) e de Phytomonas tumefaciens (= Agrobacterium tumefaciens (E.F. Sm & Town) Conn. possuíam apenas uma discreta ação inibidora.

GENDRON (1950) referiu-se a uma ação inibidora presente no filtrado de culturas de Rhacodiella castaneae Peyr. capaz de retardar a infecção pelo TMV e PVX em plantas de fumo.

MANN (1969) observou que quando culturas de Bacillus uniflagellatus Mann. eram adicionadas ao solo onde cresciam plantas de fumo var. Xanthi, antes destas serem inoculadas com TMV, havia uma redução no número de lesões locais causadas pelo vírus. O mesmo efeito foi verificado quando extratos de culturas de bactéria eram adicionados ao solo ou pulverizados sobre as folhas, antes destas serem inoculadas.

JOHNSON & HOGGAN (1937) cultivaram Saccharomyces sp em meio contendo TMV e não verificaram qualquer alteração na concentração do vírus que pudesse ser tomada como uma ação do fungo ou de seus metabólitos sobre o vírus. JOHNSON (1938) sugeriu que certos metabólitos lançados no meio de cultura por Aspergillus niger van Tiegh seriam os prováveis responsáveis pela inibição do TMV. TAKAHASHI (1942) demonstrou a presença de um inibidor do TMV em extratos de Saccharomyces cerevisiae Meyen, sugerindo que a substância fosse um polissacárido. Em 1946, o mesmo autor voltou a estudar as propriedades físico-químicas da substância, confirmando a natureza química da mesma.

GUPTA & PRICE (1950) estudaram cerca de 50 espécies de fungo, cultivadas em meios sintéticos, para determinar a capacidade das mesmas em produzir compostos inibidores de vírus. Os ensaios foram feitos com os vírus SBMV, TMV e TNV. Os filtrados de Neurospora sitophila Shear & Dodge e de Trichothecium roseum Link. demonstraram possuir o mais alto poder inibidor entre todos os filtrados ensaiados. Estudando, em detalhes, as propriedades do inibidor presente no filtrado de T.roseum, os autores concluíram que não se tratava de

uma substância de natureza proteica.

SLAGLE et al. (1952), com a finalidade de elucidar o mecanismo da ação inibidora dos filtrados de N.sitophila e N.crassa Shear & Dodge sobre a infectividade dos vírus TMV, TNV, SBMV e TRSV, observaram que a maior ou menor eficácia dos filtrados, em reduzir o grau de infecção, dependia exclusivamente da planta hospedeira empregada. GUPTA & PRICE (1952), trabalhando com I.roseum e com os vírus SBMV, TMV e TNV, sugeriram, com base em muitas evidências, que a atividade inibidora era devida a alterações na suscetibilidade da planta hospedeira e não da ação direta do inibidor sobre as partículas de vírus.

WIGGS (1968) estudou a ação de 25 fungos sobre a infectividade do TMV verificando que a maioria das espécies ensaiadas continham substâncias que inibiam o vírus, sendo que as representantes dos gêneros Amannita e Lepiota possuíam os inibidores mais eficientes.

HODGSON & MUNRO (1966) verificaram que o extrato preparado do micélio de Phytophthora infestans (Mont.) d By inibia o PVX e, HODGSON et al. (1969) isolaram e estudaram algumas características de um polissacárido extraído do micélio deste fungo.

GROHMANN & MUSUMECI (1970, 1972) estudaram a ação inibidora de metabólitos lançados por certos fungos no meio líquido de cultura. Os metabólitos de todos os fungos ensaiados mostraram uma atividade inibidora acima de 60%, sendo que os de I.roseum, Aspergillus flavus Link. e A.niger reduziram a infectividade do TMV em mais de 90%.

MAYHEW & FORD (1971) estudaram um inibidor produzido por

Physarum polycephalum Schw. capaz de prevenir a infecção pelo TMV quando inoculado sobre plantas de fumo ou feijão. Segundo os autores a substância seria um polissacárido de alto peso molecular. O inibidor reduziu, também, a infecção pelo TRSV em caupí, mas não teve qualquer efeito sobre a infecção pelo SBMV em feijão. Os autores sugeriram que o inibidor agiria diretamente sobre o vírus e não sobre o hospedeiro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Fonte de material

Plantas sadias de abútilom (Abutilon striatum Dicks) cuja idade variava de 3 a 4 anos, cultivadas numa mistura de terra e areia (3:1) em vasos de barro (30cm x 60cm de altura), e mantidas em condições de ripado, serviram de fonte de material para a obtenção da substância inibidora. As folhas foram coletadas entre as plantas disponíveis, evitando-se, apenas, a retirada daquelas amarelcidas e senescentes ou que apresentassem deformações morfológicas.

3.2. Extração e purificação da substância inibidora

A metodologia empregada na extração da substância inibidora presente em folhas de abútilom baseou-se naquela utilizada por FLORES et al. (1967), com modificações.

Folhas de abútilom, recém-coletadas, foram lavadas em água corrente, deixadas secar sobre papel absorvente por 48 h e submetidas à desidratação em estufa (Thelco, Mod.18) a 60°C. Posteriormente, o material desidratado foi triturado em almofariz, à temperatura ambiente. Adicionou-se água destilada ao pó obtido (10 ml/g de peso seco), resultando numa suspensão altamente viscosa, que foi deixada em repouso por 48 h e, em seguida, fervida por 10 min, sob agitação constante. A suspensão foi comprimida através de pano de morim e o filtrado foi tratado com etanol (1:3, v/v) e novamente submetido à filtração através de papel xarope. O volume do filtra

do foi reduzido, por aquecimento, de 10 vezes o volume original e posteriormente filtrado através de funil de placa sílica de porosidade ultra-fina (Jena G4). Este filtrado constituiu o Extrato Bruto (EB)

O EB foi dialisado, na geladeira, por 168 h, contra água destilada trocada frequentemente. A solução retida no interior da membrana de diálise (diâmetro médio do poro: 48Å) foi novamente filtrada em funil de placa sílica (G4), constituindo a Fração Não Dialisável (FND). A água da diálise, resultante da combinação de todas as trocas realizadas durante o processo, foi evaporada, por aquecimento, até um volume equivalente ao da FND e constituiu a Fração Dialisável (FD). De ambas as frações foram retiradas alíquotas para posterior ensaio biológico.

A FND foi tratada (v/v) com uma mistura de álcool iso-amílico/clorofórmio/fenol (2:48:50). A mistura foi vigorosamente agitada por 10 min, e em seguida centrifugada a 5000 rpm (Tominaga, Mod.TD-65), à temperatura ambiente. Repetiu-se o tratamento acima com a fase aquosa (FA). A FA final foi tratada 5 vezes com éter etílico (1:2, v/v). Em seguida, esta foi concentrada, por aquecimento, até a obtenção de uma concentração equivalente a 10 g de peso seco por ml, e novamente dialisada por 48 h na geladeira, contra água destilada. Esta solução, após filtração (Millipore 0,8µ, Millipore Co. USA), constituiu o Extrato Desproteínizado (ED). Este foi liofilizado (Liofilizador Edwards Alto Vuoto, Milano, Mod. L 40) e conservado, sob vácuo, a -15°C, constituindo a fração que passaremos a chamar de Inibidor (IN).

3.3. Tratamentos realizados com o inibidor

3.3.1. Tratamento por carvão ativo

Dissolveu-se o IN em água destilada (2,0 mg/ml), adicionou-se 1,0 g de carvão ativo e o material foi agitado por 10 min, sendo, posteriormente, submetido à filtração em funil de placa de sílica (G4).

3.3.2. Tratamento com solução amoniacal

O IN dissolvido em água destilada (mg/ml) foi tratado com uma solução concentrada de hidróxido de amônio (NH_4OH contendo 25% NH_3) (1:1, v/v). A mistura foi centrifugada a 10000 rpm, por 15 min (Spinco, Mod.L, rotor nº 30). O volume sobrenadante (Sn) foi reduzido à metade, por evaporação e em seguida, guardado a 4°C. O sedimento (Sd) foi ressuspenso em 10 ml de uma mistura de etanol/éter etílico (1:1, v/v) e posteriormente centrifugado a 2000 rpm, por 15 min (Spinco, Mod.L, rotor nº 40). O Sn foi rejeitado e o Sd após secagem em estufa (60°C) foi retomado em água destilada, num volume equivalente ao do Sn obtido da precipitação com o hidróxido de amônio.

3.3.3. Filtração em gel de Sefadex

Uma solução aquosa do IN foi submetida à filtração em gel de Sefadex G50 e G25 (Pharmacia, Uppsala, Sw.). Como colunas foram utilizados dois tubos de vidro (2,3 cm de diâmetro interno) fechados numa das extremidades por uma placa de sílica (G1) tendo sobre esta um disco de papel de filtro (Whatmann nº 1). Uma solução aquosa de "Blue dextran 2000"

(BD) (Pharmacia, Uppsala, Sw.) foi usada como marcadora do volume externo (V_0) eluído. No caso da coluna de Sefadex G50, para a obtenção do leito de filtração foram usados 6 g do gel previamente embebidos em excesso de água destilada. A preparação do gel e o preenchimento da coluna foram feitos segundo as instruções do manual preparativo da PHARMACIA (1966). 1,0 ml de uma solução aquosa do IN (5 mg/ml) foi aplicado sobre o leito da coluna protegido por um disco de papel de filtro (Whatmann nº 1), e como eluente usou-se água destilada. Foram coletadas 30 frações de 3 ml cada, que foram submetidas à leitura da absorbância, em 270 nm, num espectrofotômetro (Pye Unicam Mod. SP 1800). No caso de Sefadex G25 utilizou-se 10 g do gel para o preparo do leito de filtração.

3.3.4. Tratamentos enzimáticos

Uma solução aquosa do IN (4 mg/ml) foi submetida a tratamentos enzimáticos por diastase (NBC, Co., USA) e por pectinase (NBC, Co., USA). As soluções de enzimas foram preparadas em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0, nas concentrações de 0,4 mg/ml e 40 mg/ml, respectivamente.

3.4. Ensaio para a determinação da substância inibidora

Foram preparadas diversas soluções aquosas do IN, as quais foram submetidas a espectrofotometria ao ultravioleta, e aos testes de coloração ou precipitação de Molisch, Bial, Biuret, Ninhidrina (in TASTALDI, 1955) e de Antrona (in BELL, 1955).

3.5. Ensaio sobre inibição de vírus

Os vírus utilizados para os ensaios de inibição (Tabela 1) foram submetidos às técnicas de purificação ou clarificação. O TMV foi purificado por meio de ultracentrifugações diferenciais, segundo o método de STEERE (1959) e, posteriormente, a preparação purificada foi tratada por clorofórmio /álcool isoamílico, de acordo com a técnica de SCHNEIDER (1953). A preparação purificada foi mantida em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0, a temperatura de -15°C .

Tabela 1. Vírus empregados nos ensaios de inibição

Vírus	Plantas utilizadas para a manutenção dos vírus
Mosaico do fumo (TMV)	<u>Nicotiana tabacum</u> var. "White Burley"
X da batata (PVX)	<u>N. tabacum</u> var. "White Burley"
Mosaico do pepino (CMV)	<u>Chenopodium</u> <u>amaranticolor</u>
Mosaico amarelo do feijão (BYMV)	<u>Phaseolus vulgaris</u> var. "Scotia"
Vira-cabeça do tomateiro (TSWV)	<u>Datura stramonium</u>
Necrose branca do fumo (STMV)	<u>N. tabacum</u> var. "White Burley"
Mosaico da alface (LMV)	<u>Chenopodium</u> <u>quinoa</u> Willd

Os demais vírus, utilizados nos ensaios de inibição, foram

preparados da seguinte forma: folhas recém-coletadas (2 g) , de plantas infectadas, foram trituradas num almofariz em presença de 5,0 ml de tampão de fosfato 0,01M de pH 7,0 mais sulfito de sódio (0,4%) COSTA, 1957). O mascerado foi filtrado através de papel de filtro (Whatmann nº 54) e o filtrado constituiu o Suco Clarificado (SC) utilizado nos ensaios de inibição.

Os métodos de inoculação, para os vírus relacionados na Tabela 1, variaram de acordo com o tipo de sintomas manifestados pelas plantas hospedeiras. Para qualquer tipo de inóculo usado (suspensão de vírus purificado ou suco clarificado) a inoculação foi sempre mecânica e feita com o auxílio de um abrasivo (Carborundum, 200-400 mesh).

Nos casos em que os vírus ensaiados induziam, nas plantas hospedeiras, o aparecimento de sintomas locais, foram empregados os métodos de inoculação em folhas opostas ou em meias-folhas conforme SAMUEL & BALD (1933). No primeiro caso, o vírus tratado pelo inibidor foi inoculado em toda a superfície foliar, sendo a folha oposta, empregada como controle, inoculada apenas com o vírus diluído em água destilada, na mesma concentração que o tratado pelo inibidor. No segundo caso, apenas uma metade de cada folha foi inoculada com o vírus tratado pelo inibidor, sendo a outra metade usada como controle.

Para os vírus que induziam o aparecimento de sintomas sistêmicos, a inoculação foi feita em toda a superfície foliar de duas folhas de cada planta, usando-se 2 grupos de 10 plantas cada, sendo um deles inoculado com o vírus tratado pelo inibidor e o outro, grupo controle, inoculado apenas com o vírus diluído com água destilada.

Para lesões locais, cloróticas ou necróticas, a avaliação dos sintomas consistiu na contagem do número total de lesões nas folhas ou meias-folhas tratadas e nos respectivos controles. Após a contagem, o número total de lesões, correspondente ao tratamento, foi deduzido do número total de lesões referente ao controle. A diferença, multiplicada por 100 e dividida pelo número total de lesões correspondente ao controle, forneceu o resultado expresso como porcentagem de inibição (% inibição) (NITZANY & COHEN, 1960).

Nos casos em que os sintomas foram sistêmicos, a avaliação foi feita segundo o aspecto e o grau de severidade dos sintomas observados nas plantas tratadas, quando comparados aos sintomas apresentados pelas plantas do grupo-controle. Nestes casos foi adotado o critério de notas, variando de I (nenhum indício aparente de inibição) até V (inibição completa). O mesmo critério foi adotado no caso de plantas que manifestaram sintomas locais, mas que não foi possível a contagem do número de lesões.

3.6. Ensaio biológico para avaliação da atividade do inibidor sobre a infectividade do TMV em plantas de glutinosa

Plantas de glutinosa foram inoculadas mecanicamente, segundo o processo anteriormente descrito, com uma mistura de iguais volumes de uma suspensão de TMV purificado (0,1 mg/ml em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0) e de uma solução aquosa do IN ou da amostra a ser ensaiada. A mistura foi feita "in vitro" e, em seguida, inoculada. Como controle da inoculação usou-se uma mistura de iguais volumes

de água destilada e da mesma suspensão de TMV. Para cada amostra foram usadas 5 plantas de glutinosa, das quais foram retirados, previamente, o broto apical e as folhas mais velhas, deixando-se, apenas, 4 folhas por planta. A avaliação dos sintomas foi feita 3 dias após a inoculação, através da contagem do número de lesões. As plantas foram mantidas à temperatura ambiente após a inoculação.

3.7. Comportamento da mistura vírus-inibidor (VI)

A mistura VI foi submetida à ultracentrifugação, à análises ao nível da microscopia eletrônica, à testes serológicos e a bioensaios.

Com referência à ultracentrifugação, preparou-se uma mistura (v/v) de uma solução aquosa do IN (2 mg/ml) e de uma suspensão de TMV (0,2 mg/ml em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0). Como controle foi utilizada uma suspensão de TMV na mesma concentração final da mistura VI. As amostras foram submetidas à ultracentrifugação (Spinco Mod.L, rotor nº 40) a 40000 rpm, por 90 min. Após a centrifugação o Sd foi ressuspendido em 24 ml de tampão de fosfato 0,01M de pH 7,0. Ao Sn, juntou-se igual volume de TMV purificado (0,1 mg/ml em tampão de fosfato 0,01M de pH 7,0). As amostras foram conservadas a 4°C, para ensaios biológicos. Uma amostra da mesma preparação VI, não submetida à ultracentrifugação e diluída na proporção de 1:2 com tampão de fosfato 0,01M de pH 7,0, foi empregada como controle do ensaio.

Uma solução aquosa do IN (2 mg/ml) e de uma suspensão de TMV purificado (0,1 mg/ml em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0) foram juntados (v/v) e a mistura resultante foi exami-

nada e fotografada ao microscópio eletrônico (Phillips Mod. EM 300), por contrastação negativa HORNE, 1959). Como controles, usaram-se preparações do TMV e do IN nas mesmas concentrações, diluídas de 1:2 com água destilada.

Com referência aos testes serológicos, empregou-se antissoro específico para TMV e como antígenos foram utilizadas suspensões de TMV purificado, tratadas ou não pelo IN. O teste desenvolvido foi o de dupla-difusão em agar, idealizado por OUCHTERLONY (1949, 1958, 1962) e BALL (1961) e, posteriormente modificado por OLIVEIRA (1967).

O ponto final da diluição do inibidor foi ensaiado contra uma concentração constante de TMV, e vice-versa.

3.8. Mecanismo de ação do inibidor

A ação do inibidor, sobre a infectividade do TMV, foi ensaiada na mesma face ou em faces opostas de folhas de glutinosa, variando-se o intervalo de tempo entre a aplicação do IN e a inoculação com o TMV. Nos dois ensaios foram usadas uma suspensão de TMV (0,1 mg/ml em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0) e uma solução aquosa do IN (2 mg/ml).

No caso da inoculação em faces opostas, a suspensão de TMV foi inoculada em toda a superfície da face superior (ventral) das folhas, enquanto que o IN foi aplicado apenas numa metade da face inferior (dorsal), sendo a metade correspondente da mesma face tratada com água destilada.

3.9. Ação do inibidor sobre diferentes vírus em diferentes hospedeiros

Todos os vírus utilizados foram ensaiados, pelo menos, em duas plantas hospedeiras diferenciais, uma que apresentasse sintomas locais e outra, sistêmicos. As combinações empregadas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Plantas hospedeiras e tipos de sintomas induzidos pelos diferentes vírus utilizados

Vírus	Hospedeiras	Sintomas
TMV	<u>N. tabacum</u> var. "White Burley"	S
	<u>N. glutinosa</u>	L
	<u>D. stramonium</u>	L
	<u>G. globosa</u>	L
	<u>P. vulgaris</u> var. "Scotia"	L
	<u>P. vulgaris</u> var. "manteiga"	-
PVX	<u>N. glutinosa</u>	S
	<u>G. globosa</u>	L
CMV	<u>N. glutinosa</u>	S
	<u>C. amaranticolor</u>	L
YBMV	<u>N. tabacum</u> var. "White Burley"	L
	<u>G. globosa</u>	L
	<u>P. vulgaris</u> var. "Scotia"	S
	<u>P. vulgaris</u> var. "manteiga"	S
TSWV	<u>P. vulgaris</u> var. "manteiga"	L
	<u>P. vulgaris</u> var. "Scotia"	L
	<u>N. tabacum</u> var. "White Burley"	S
STMV	<u>N. tabacum</u> var. "White Burley"	L e S
	<u>P. vulgaris</u> var. "Scotia"	L
	<u>G. globosa</u>	L
	<u>P. vulgaris</u> var. "manteiga"	L
LMV	<u>C. quinoa</u>	S
	<u>G. globosa</u>	L

S=sintomas sistêmicos; L=sintomas locais e -=ausência de sintomas.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da diálise sobre a ação do inibidor

Os testes biológicos efetuados com as frações provenientes da diálise, permitiram verificar que o inibidor ficou retido no interior da membrana de diálise. As porcentagens de inibição decorrentes da ação inibidora do EB e da FND foram as mesmas, demonstrando, assim, não haver qualquer alteração da atividade da substância extraída de folhas de abútilom, quando submetida ao tratamento pela diálise (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados dos ensaios biológicos efetuados para verificar a ação do EB dialisado sobre a infectividade do TMV em folhas de glutinosa.

Amostras	Nº Total de Lesões						% inibição **
	Tratamento			Controle *			
	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.1	Exp.2	Exp.3	
1	110	50	70	1480	300	430	89,5
2	520	280	70	660	295	70	15,1
3	45	170	110	1225	1030	635	88,7

1 - 1,0 ml da FND + 1,0 ml da suspensão de TMV (0,1 mg/ml em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0)

2 - 1,0 ml da FD após concentrada + 1,0 ml da mesma suspensão de TMV

3 - 1,0 ml do EB + 1,0 ml da mesma suspensão de TMV

* 1,0 ml de água destilada + 1,0 ml da mesma suspensão de TMV

** % de inibição da média de três experimentos.

4.2. Efeito do tratamento desproteinizador sobre a ação do inibidor

O EB, antes ou após ter sido submetido à diálise seguida de desproteíntização, foi ensaiado biologicamente em folhas de glutinosa, e os resultados indicaram que o tratamento efetuado para retirar as proteínas, não alterou a ação do inibidor (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados dos ensaios biológicos efetuados para verificar a ação do EB desproteíntizado sobre a infectividade do TMV em folhas de glutinosa.

Amostras	Nº Total de Lesões						% inibição**
	Tratamento			Controle*			
	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.1	Exp.2	Exp.3	
1	620	750	140	2155	3100	490	73,7
2	500	440	225	1980	2190	890	76,9

1 - 1,0 ml do ED + 1,0 ml da suspensão de TMV (0,1 mg/ml em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0)

2 - 1,0 ml do EB + 1,0 ml da mesma suspensão de TMV

* 1,0 ml de água destilada + 1,0 ml da mesma suspensão de TMV

**% da inibição da média de três experimentos.

4.3. Efeito do tratamento do inibidor por carvão ativo

Os ensaios biológicos realizados com o IN, submetido ou não ao tratamento pelo carvão ativo, revelaram que este retém completamente o inibidor, sendo que, em consequência disto, o filtrado resultante do tratamento não mostrou qualquer ação

inibidora sobre a infectividade do TMV (Tabela 5).

Tabela 5. Resultados dos ensaios biológicos efetuados para verificar a ação do filtrado do IN, através de carvão ativo, sobre a infectividade do TMV em folhas de glutinosa.

Amostras	Nº Total de Lesões				% inibição**
	Tratamento		Controle*		
	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2	
1	85	70	85	70	0,0
2	110	35	635	185	82,3

1 - 1,0 ml do filtrado resultante do tratamento do IN pelo carvão ativo + 1,0 ml da suspensão de TMV (0,1 mg/ml em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0)

2 - 1,0 ml do IN + 1,0 ml da mesma suspensão de TMV

* 1,0 ml de água destilada + 1,0 ml da mesma suspensão de TMV

** % de inibição da média de dois experimentos.

4.4. Efeito do tratamento do inibidor por solução amoniacal

Os resultados dos ensaios biológicos efetuados com o inibidor submetido ou não ao tratamento com uma solução concentrada de hidróxido de amônio (NH₄OH contendo 25% de NH₃), apresentando a mistura um pH em torno de 11,0, revelaram não haver qualquer diferença significativa na ação do inibidor, após o tratamento, sobre a infectividade do TMV (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados dos ensaios biológicos efetuados para verificar a ação do IN submetido a um tratamento com solução amoniacal sobre a infectividade do TMV em folhas de glutinosa.

Amostras	Nº Total de Lesões				% inibição**
	Tratamento		Controle*		
	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2	
1	15	120	80	640	81,2
2	55	595	80	805	26,5
3	20	135	90	830	83,1

1 - 1,0 ml do Sn da precipitação do IN com hidróxido de amônio + 1,0 ml da suspensão de TMV (0,1 mg/ml em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0)

2 - 1,0 ml do Sd, retomado em água, + 1,0 ml da mesma suspensão de TMV

3 - 1,0 ml do IN + 1,0 ml da mesma suspensão de TMV

* 1,0 ml de água destilada + 1,0 ml da mesma suspensão de TMV

**% de inibição da média de dois experimentos.

4.5. Efeito do tratamento do inibidor por filtração em gel de Sefadex

Uma solução aquosa do IN quando submetida à filtração em gel de Sefadex G50, mostrou que o máximo da capacidade inibidora da substância foi eluída após 63 ml, enquanto que o BD, usado como marcador do V_0 , teve o seu máximo de eluição em 27 ml.

As frações do inibidor eluídas da coluna, após terem sido com

4 - 1,0 ml da solução aquosa do IN (2 mg/ml) +
1,0 ml da mesma suspensão de TMV

* 1,0 ml de água destilada + 1,0 ml da mesma
suspensão de TMV

Velocidade do fluxo da coluna: 180 ml/h
Volume de cada fração eluída : 3 ml
A combinação das frações foi feita segundo a
absorbância em 270 nm.

binadas em três amostras, de acordo com as absorvâncias óticas de cada uma, e, posteriormente, evaporadas e retomadas em 1,0 ml de água destilada, foram submetidas a ensaios biológicos. Os resultados destes ensaios demonstraram que a fração 1, resultante da combinação dos primeiros 30 ml eluídos, e correspondente ao V_0 da coluna, não teve qualquer efeito inibidor sobre a infectividade do TMV; a fração 2, resultante da combinação dos 18 ml seguintes, inibiu 36,2% a infectividade do TMV. O máximo de ação inibidora correspondeu à fração 3, resultante da combinação dos 42 ml subsequentes. O máximo da absorvância ótica, coincidiu com a fração eluída após 63 ml que apresentou o máximo de inibição sobre a infectividade do TMV (Tabela 7 e Figura 1).

Tabela 7. Resultado de um ensaio biológico típico obtido com as frações eluídas, após a filtração do IN em gel de Sefadex G50, sobre a infectividade do TMV em folhas de glutinosa.

Amostras	Nº Total de Lesões		% inibição
	Tratamento	Controle*	
1	710	695	0,0
2	610	960	36,4
3	195	975	80,0
4	680	2090	67,4

1 - 1,0 ml resultante da combinação e concentração das frações de 1 a 9 eluídas da coluna + 1,0 ml da suspensão de TMV (0,1 mg/ml em tampão de fosfato 0,02 M de pH 7,0)

2 - 1,0 ml das frações de 10 a 15, combinadas e concentradas + 1,0 ml da mesma suspensão de TMV

3 - 1,0 ml das frações de 16 a 30 combinadas e concentradas + 1,0 ml da mesma suspensão de TMV

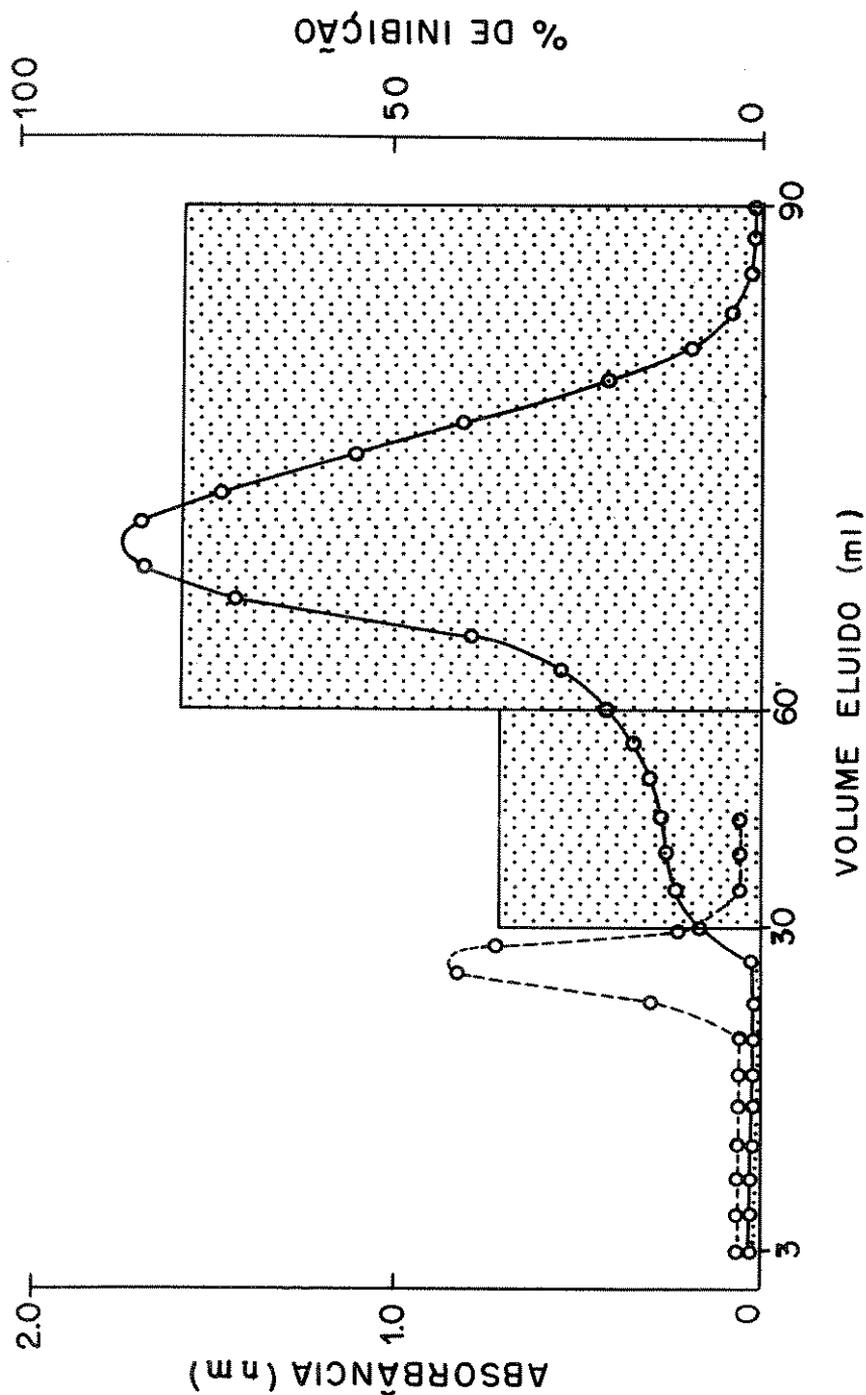


Figura 1- Absorbância das frações eluídas após a filtração do IN (—○—) e do "Blue dextran 2000" (---○---), em coluna de gel de Sefadex G50. Resultado do ensaio biológico realizado com as frações eluídas e combinadas, sobre a infectividade do TMV, em folhas de glutinosa (▨).

Com relação à filtração do inibidor em gel de Sefadex G25, verificou-se que tanto o inibidor como a solução de BD foram eluídos no V_0 da coluna. As frações eluídas foram agrupadas em três amostras, conforme a absorbância ótica de cada uma, e submetidas ao mesmo processo de evaporação, descrito para as frações eluídas da coluna de Sefadex G50, sendo, posteriormente, ensaiadas biologicamente. Os resultados destes ensaios demonstraram que a atividade inibidora estava restrita à amostra correspondente ao V_0 da coluna (Tabela 8 e Figura 2).

Tabela 8. Resultado de um ensaio biológico típico com as frações eluídas após a filtração do IN em gel de Sefadex G25, sobre a infectividade do TMV em folhas de glutinosa.

Amostras	Nº Total de Lesões		% inibição
	Tratamento	Controle*	
1	2260	2290	1,3
2	320	2065	84,5
3	1145	1255	8,7
4	680	2090	67,4

1 - 1,0 ml resultante da combinação e concentração das frações de 1 a 5, eluídas da coluna + 1,0 ml da suspensão de TMV (0,1 mg/ml em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0).

2 - 1,0 ml (frações 6 a 14) + 1,0 ml da mesma suspensão de TMV

3 - 1,0 ml (frações 15 a 20) + 1,0 ml da mesma suspensão de TMV

4 - 1,0 ml da solução aquosa do IN (2 mg/ml) + 1,0 ml da mesma suspensão de TMV

* 1,0 ml de água destilada + 1,0 ml da mesma suspensão de TMV

Velocidade do fluxo da coluna: 180 ml/h

Volume de cada fração eluída : 3 ml

Leitura da absorbância de cada fração: 270 nm

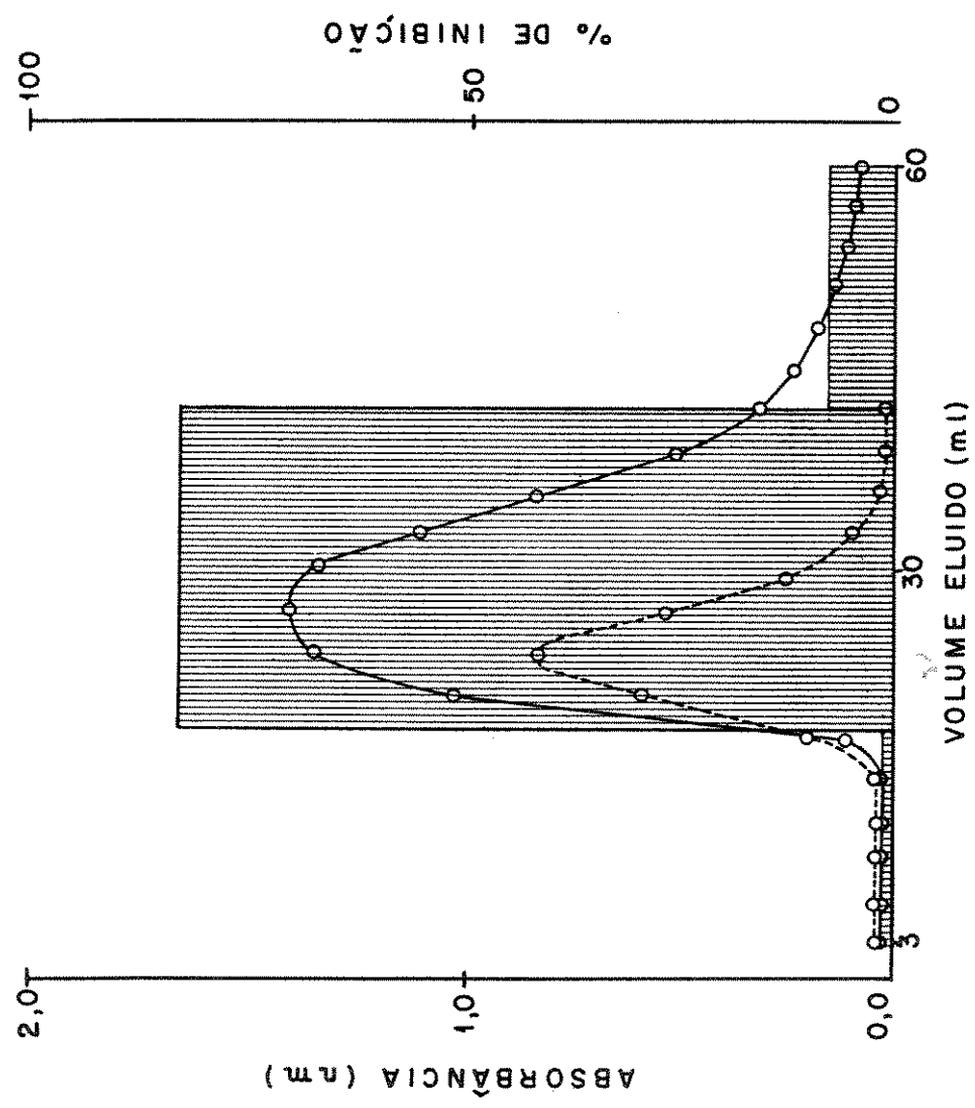


Figura 2 - Absorbância das frações eluídas após a filtração do IN (o--o) e do "Blue dextran 2000" (o--o), em coluna de gel de Sedafex G 25. Resultado do ensaio biológico realizado com as frações eluídas e combinadas, sobre a infectividade do TMV, em folhas de glutinosa (▨).

- 1 - Mistura de 1,0 ml da solução de diastase (0,4 mg/ml) em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0 e de 1,0 ml da solução aquosa do IN (4 mg/ml) incubada a 37°C, e posteriormente juntada a 2,0 ml de uma suspensão de TMV (0,1 mg/ml em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0)
 - 2 - Mistura de 1,0 ml de tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0 e de 1,0 ml da mesma solução do IN incubado a 37°C, e posteriormente juntado a 2,0 ml da mesma suspensão de TMV
 - 3 - Mistura de 1,0 ml de água destilada e de 1,0 ml da solução de diastase, incubada a 37°C, e posteriormente juntada a 2,0 ml da mesma suspensão de TMV
 - 4 - Mistura de 1,0 ml de água destilada e de 1,0 ml da solução do IN, mantida a 4°C, e posteriormente juntada a 2,0 ml da mesma suspensão de TMV
- * 2,0 ml de água destilada + 2,0 ml da mesma solução de TMV

4.6. Efeito do tratamento do inibidor pelas enzimas diastase e pectinase

Nos experimentos realizados com as enzimas diastase ou pectinase, foram preparadas 4 amostras que, posteriormente, foram ensaiadas biologicamente em presença do TMV, em folhas de glutinosa. As amostras: 1 (mistura de inibidor mais enzima), amostra 2 (mistura de inibidor mais o tampão usado na preparação da enzima) e a amostra 3 (enzima mais água destilada) foram incubadas por 24 ou 48 h, a 37°C, enquanto que a amostra 4 (preparada como a amostra 2) foi mantida a 4°C, durante os mesmos intervalos de tempo que as demais, servindo de controle para a amostra 2.

Os resultados dos ensaios biológicos realizados com o IN submetido a tratamentos enzimáticos, por 24 ou 48 h, com diastase ou pectinase, revelaram que não houve qualquer alteração na ação inibidora sobre a infectividade do TMV, ensaiado em folhas de glutinosa, quando estes resultados foram comparados àqueles obtidos para o IN não tratado (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9. Resultados dos ensaios biológicos efetuados com o IN tratado, por 24 ou 48 h, com diastase, sobre a infectividade do TMV em folhas de glutinosa.

AMOSTRAS	24 HORAS			48 HORAS		
	Nº total de lesões		% inibição	Nº total de lesões		% inibição
	Tratamento	Controle*		Tratamento	Controle*	
1	75	220	65,9	400	1160	65,5
2	145	515	71,8	1000	2630	61,9
3	290	355	18,3	2230	2775	19,6
4	95	380	75,0	640	1700	62,3

Tabela 10. Resultados dos ensaios biológicos efetuados com o IN tratado, por 24 ou 48 h, com pectinase, sobre a infectividade do TMV em folha de glutinosa.

AMOSTRAS	24 HORAS			48 HORAS		
	Nº total de lesões		% inibição	Nº total de lesões		% inibição
	Tratamento	Controle*		Tratamento	Controle*	
1	150	320	53,1	480	1075	55,3
2	140	490	71,4	450	1355	66,7
3	190	265	28,3	660	860	23,2
4	135	325	58,4	175	405	56,7

1 - Mistura de 1,0 ml de solução de pectinase (40 mg/ml em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0) e de 1,0 ml da solução aquosa do IN (4 mg/ml), incubada a 37°C, e posteriormente juntada a 2,0 ml de uma suspensão de TMV (0,1 mg/ml em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0)

2 - Mistura de 1,0 ml de tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0 e de 1,0 ml da mesma solução do IN, incubado a 37°C, e posteriormente juntado a 2,0 ml da mesma suspensão de TMV

3 - Mistura de 1,0 ml de água destilada e de 1,0 ml da solução de pectinase, incubada a 37°C, e posteriormente junta da a 2,0 ml da mesma suspensão de TMV

4 - Mistura de 1,0 ml de água destilada e de 1,0 ml da solução do IN, mantida a 4°C, e posteriormente juntada a 2,0 ml da mesma suspensão de TMV

* 2,0 ml de água destilada + 2,0 ml da mesma suspensão de TMV

4.7. Espectro de absorção do inibidor ao ultravioleta

A análise do espectro de absorção, realizado no intervalo entre 210nm e 450nm, de uma solução aquosa do IN (0,1 mg/ml), re

velou um discreto aumento da absorvância ótica nas bandas compreendidas entre os comprimentos de onda de 260nm a 276nm (Banda I) e de 310nm a 330nm (Banda II). O máximo de absorvância para a Banda I correspondeu a 270nm. A Banda II revelou-se apenas como uma ligeira ondulação ("shoulder").

Os espectros de absorção obtidos para as soluções aquosas de soro albumina bovina (SAB) (0,01%), BD (0,001%), e pectina (P) (0,005%) serviram de comparação ao obtido para o IN (Figura 3).

4.8. Resultado dos ensaios de coloração ou precipitação realizados com o inibidor

Nos testes de Molisch, Antrona e Bial, as reações obtidas para a solução aquosa do IN (1,0 mg/ml) foram positivas apenas para os dois primeiros e, equivalentes em intensidade, aproximadamente, às verificadas para padrões de glucose de 0,5 mg/ml e 0,4 mg/ml, respectivamente.

Nos testes de Biureto e Ninhidrina, as reações obtidas para a solução aquosa do IN (3,5 mg/ml) foram negativas, embora a sensibilidade dos métodos tenha sido positiva para padrões de caseína de até 0,0035 mg/ml.

4.9. Comportamento da mistura TMV-inibidor (VI)

4.9.1. Ação da ultracentrifugação sobre a mistura VI

A mistura VI, submetida à ultracentrifugação, resultou num Sd

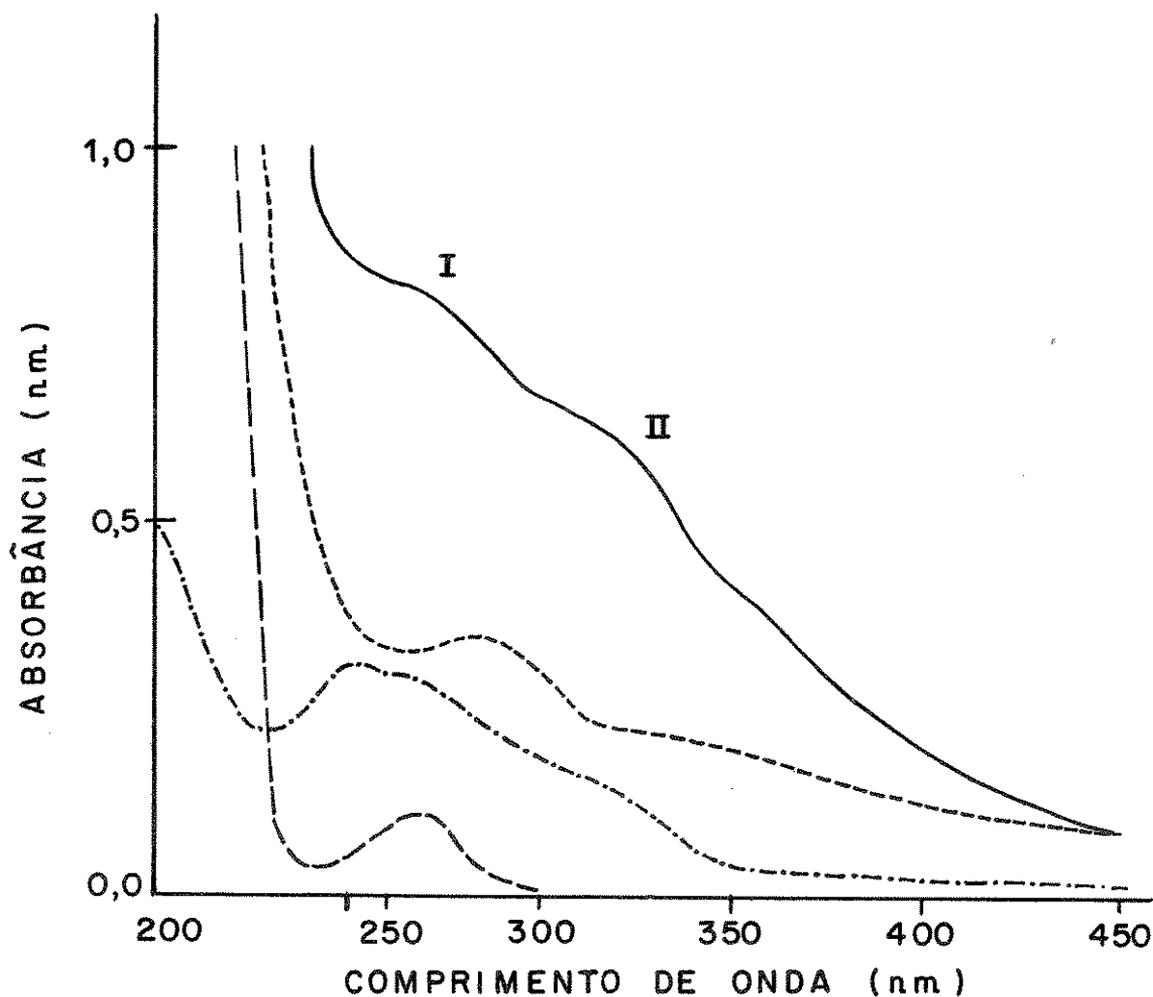


Figura 3 — Espectro de absorção ao ultravioleta de uma solução aquosa do IN (o—o) comparado aos espectros obtidos para as soluções aquosas de SAB (o—o), P (o----o) e BD (o.....o)

- *2 Sd da centrifugação de 6,0 ml de água destilada + 6,0 ml da mesma suspensão de TMV, retomado em 24 ml de tampão de fosfato 0,01M de pH 7,0
- *3 Mistura de iguais volumes do Sn da centrifugação da amostra controle e da suspensão de TMV (0,1 mg/ml em tampão de fosfato 0,01M de pH 7,0)
- ** % de inibição da média de dois experimentos.

e num Sn (item 3.7.) que foram, em separado, ensaiados biologicamente. Os resultados foram comparados com os obtidos para uma preparação constituída da mesma mistura de VI, porém, não submetida ao tratamento acima. Os resultados dos ensaios biológicos revelaram que tanto o inibidor como o TMV, após separados pela ultracentrifugação da mistura VI, mantiveram suas características inalteradas, isto é; o inibidor contido no Sn, não perdeu a sua capacidade inibidora quando em presença de uma suspensão de TMV não tratado previamente, e o vírus (Sd) manteve-se infectivo (Tabela 11).

Tabela 11. Resultados dos testes biológicos efetuados com as frações Sd e Sn, resultantes da ultracentrifugação da mistura VI, sobre a infectividade do TMV em folhas de glutinosa.

Amostras	Nº Total de Lesões				% inibição **
	Tratamento		Controle*		
	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2	
1	265	195	600	640	62,9
2	350	720	465	990	26,4
3	240	800	705	2115	63,1

1 - 2,0 ml da solução aquosa do IN (2 mg/ml) + 2,0 ml da suspensão de TMV (0,2 mg/ml em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0; a mistura foi diluída (1:2) com tampão de fosfato 0,01M de pH 7,0.

2 - Sd da centrifugação da mistura de 6,0 ml da mesma solução de IN e 6,0 ml da mesma suspensão de TMV, retomado em 24 ml de tampão de fosfato 0,01M de pH 7,0

3 - Sn da centrifugação juntado a igual volume de uma suspensão de TMV (0,1 mg/ml em tampão de fosfato 0,01M de pH 7,0).

*1 2,0 ml de água destilada + 2,0 ml da mesma suspensão de TMV usado em 1. A mistura foi diluída (1:2) com tampão de fosfato 0,01M de pH 7,0.

4.9.2. Características da ultra-estrutura da mistura VI

A mistura VI, bem como amostras do TMV purificado (0,1 mg/ml em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0) e da solução aquosa do IN (2,0 mg/ml) foram examinadas ao microscópio eletrônico por contrastação negativa (PTK a 1%, pH 7,0).

As eletromicrografias das partículas de TMV tratadas pelo IN, quando comparadas às de partículas normais (Figura 4-A) mostraram variações acentuadas do diâmetro, maior frequência de pontos de quebra e maior número de partículas fragmentadas (Figura 4-C a M).

O IN apresentou-se como uma massa granulosa, de diferentes formas e tamanhos e pouco densa eletronicamente (Figura 4-B).

4.9.3. Comportamento serológico do TMV em presença do inibidor

Os resultados do estudo efetuado sobre o comportamento serológico do TMV sob a ação de diferentes concentrações do inibidor (8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,10 mg/ml) mostraram que não houve diferença visível entre as linhas de precipitação formadas nas reações entre o antissoro para o TMV e os antígenos, TMV ou VI, no teste de dupla-difusão em agar.

4.9.4. Efeito de diferentes concentrações do inibidor sobre a infectividade do TMV

O efeito de diferentes concentrações do inibidor sobre a in-

Figura 4. Eletromicrografias de TMV controle, do IN e da mistura TMV-IN, coradas por contrastação negativa (PTK a 1%, pH 7,0).

- A - TMV normal.
- B - Aspecto do IN mostrando as circunvoluções características.
- C - TMV-IN: partículas com acentuadas alterações do diâmetro.
- D - TMV-IN: partículas fragmentadas na região próxima de contato com o IN.
- E - TMV-IN: partículas com alterações do diâmetro (espessamento ou adelgaçamento).
- F - TMV-IN: partículas mostrando, além de alterações do diâmetro, deposição de grânulos do IN sobre as mesmas, com evidentes quebras e modificações da estrutura nas extremidades das partículas.

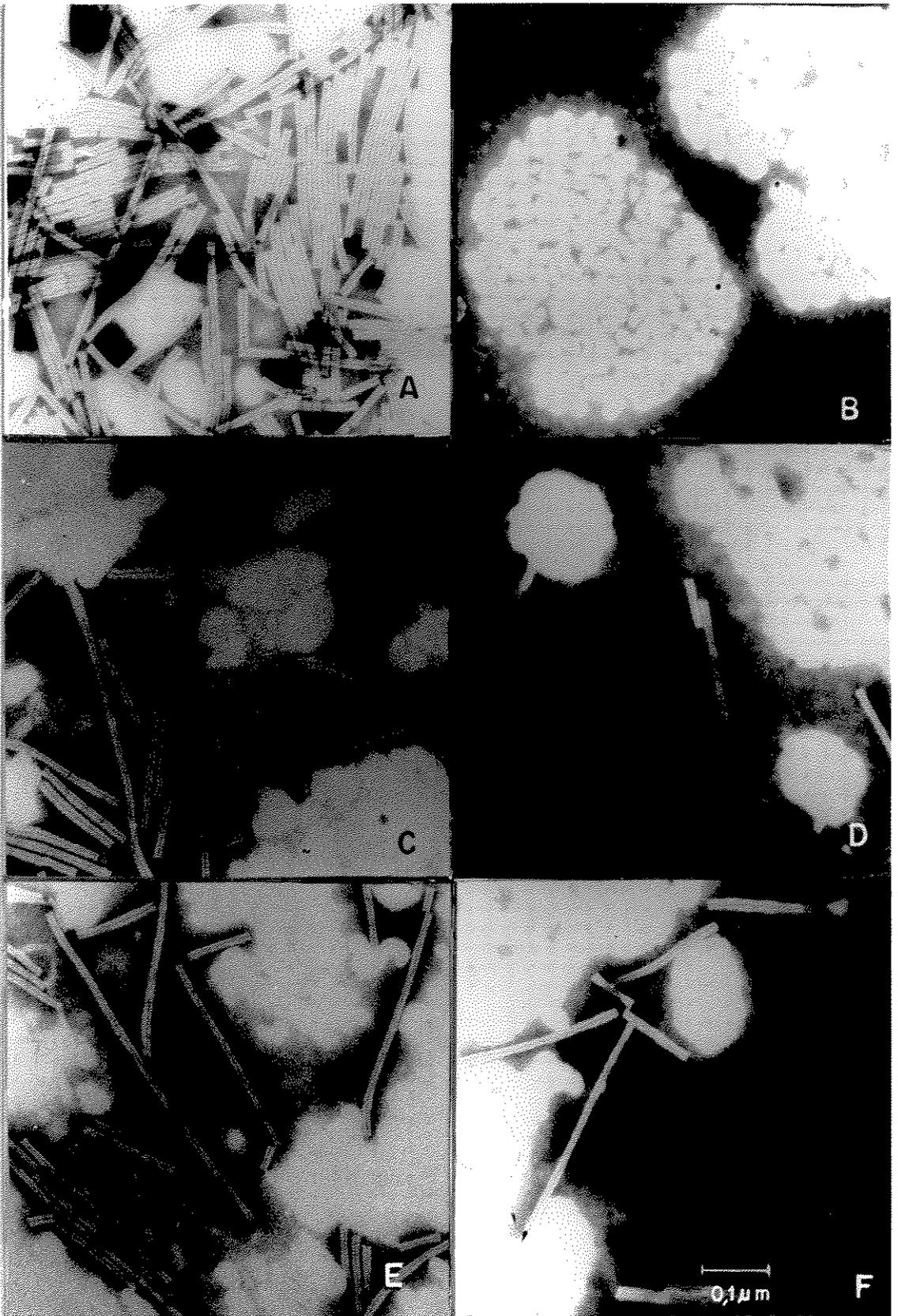


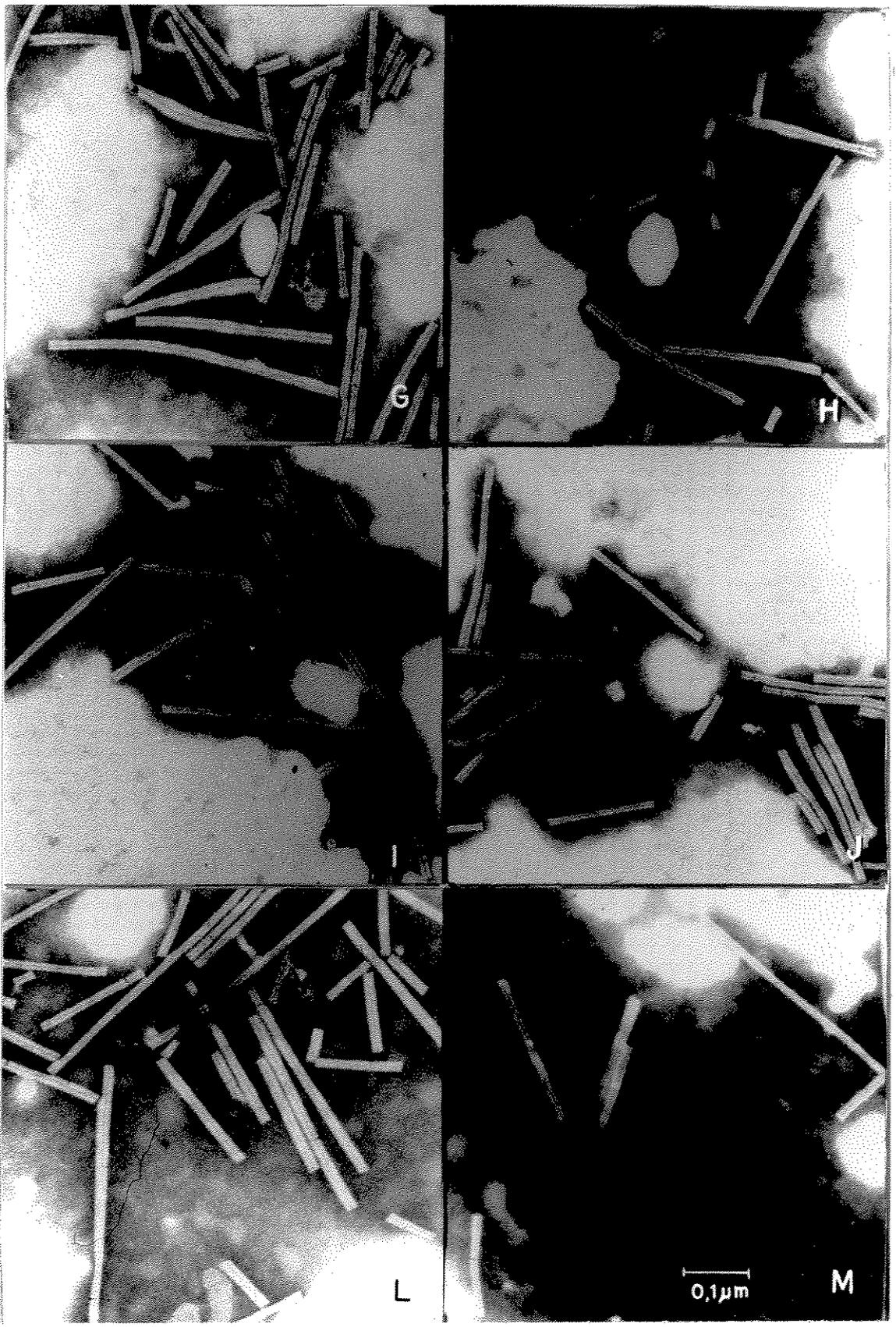
Figura 4. Eletromicrografias de TMV controle, do IN e da mistura TMV-IN, coradas por contrastação negativa (PTK a 1%, pH 7,0).

G - TMV-IN: partículas com alterações do diâmetro.

H, I e M - TMV-IN: além de alterações do diâmetro das partículas, deposição de grânulos sobre as mesmas, com evidentes quebras e modificações de estrutura nas extremidades das partículas.

J - TMV-IN: partículas com alterações do diâmetro.

L - TMV-IN: além das alterações citadas anteriormente, presença de numerosas partículas fragmentadas.



fectividade do TMV (0,1 mg/ml em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0) foi verificado, através de ensaios biológicos, em folhas de glutinosa. A concentração inicial do inibidor foi de 4,0 mg/ml e a partir desta, foram preparadas as diluições com água destilada, até 1:200. Os resultados demonstraram que há proporcionalidade entre o logaritmo das concentrações do inibidor ($\log X$) e a porcentagem de inibição obtida (Tabela 12 e Figura 5).

Tabela 12. Resultados dos ensaios biológicos efetuados para avaliar a ação de diferentes concentrações do IN sobre a infectividade do TMV em folhas de glutinosa.

Concentração do IN (mg/ml)	% inibição						Média*
	1	2	3	4	5	6	
4,0	90,1	88,0	86,0	88,2	81,6	92,2	87,6
2,0	81,5	80,0	73,5	79,3	80,6	84,0	79,8
1,0	68,3	76,4	62,8	60,7	62,7	68,0	66,4
0,5	65,7	64,2	56,4	55,3	50,2	50,6	57,0
0,2	43,1	41,0	43,9	41,7	42,5	42,0	42,3
0,1	28,2	27,8	26,4	28,6	29,2	34,8	29,1
0,02	3,6	2,0	2,5	3,0	2,8	3,0	2,8

Para cada repetição foi usado:

1,0 ml do IN, em cada concentração, + 1,0 ml da suspensão de TMV (0,1 mg/ml em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0).

Controle: 1,0 ml de água destilada + 1,0 ml da mesma suspensão de TMV.

* Na Figura 5 foram empregadas as médias aproximadas.

4.9.5. Efeito do inibidor sobre a infectividade do TMV em diferentes concentrações

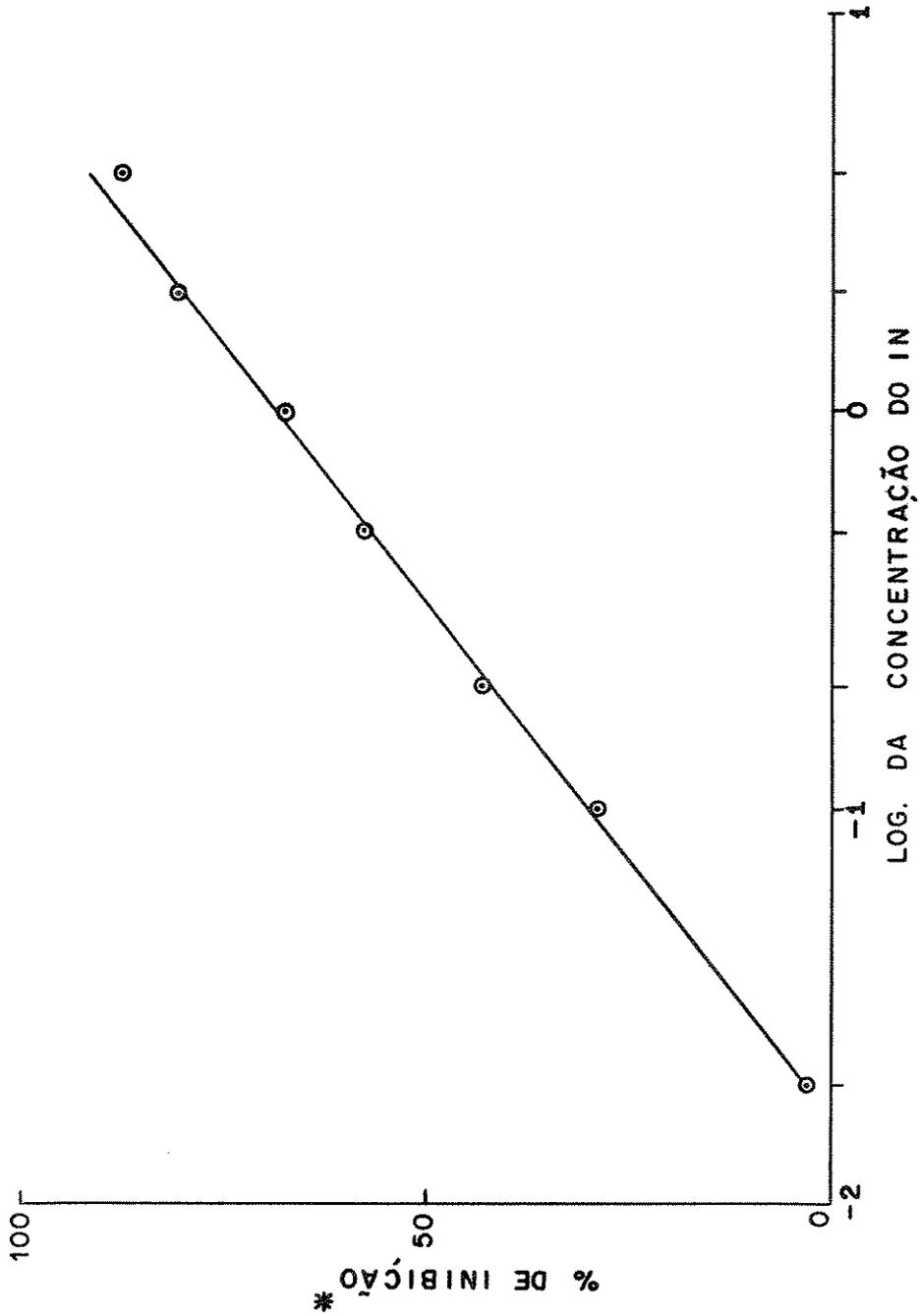


Figura 5 - Efeito de diferentes concentrações do IN sobre a infectividade do TMV (0,1 mg/ml em tampão de fosfato 0,02 M, de pH 7,0) em folhas de glútenosa.

* Média de 6 repetições.

Foi verificado, através de ensaios biológicos, o efeito de uma concentração constante do IN (2 mg/ml) sobre a infectividade de diferentes concentrações de TMV em folhas de glútinosa. A concentração inicial do TMV foi de 1,0 mg/ml, em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0. A partir desta, foram feitas diluições, usando-se o mesmo tampão como diluente, até 1:1000.

Os resultados dos ensaios biológicos (Tabela 13 e Figura 6), revelaram que a porcentagem de inibição aumentou proporcionalmente ao decréscimo da concentração do TMV, representada no gráfico como logaritmo da concentração de TMV ($\log X$). Na mesma figura, pode-se observar que as curvas obtidas a partir do número médio de lesões por meia-folha em função do $\log X$, para o TMV tratado e para o TMV controle, não são proporcionais.

Considerando-se cada concentração de TMV como uma dose de X e transformando-se as mesmas em $\log 1000X$, tomou-se o maior número de lesões por meia-folha encontrado, para o TMV tratado e para o TMV controle, como 100% e, calculou-se as porcentagens correspondentes ao número de lesões em cada meia-folha, para cada dose de X, no tratamento e no controle. A partir destas porcentagens foram calculados os probitos (Y) correspondentes. Através do conhecimento dos valores de Y, foram calculados os valores para o coeficiente angular de regressão (b para o TMV controle e b' para o TMV tratado), e a partir destes, calcularam-se as respectivas linhas de regressão, segundo a fórmula: $y - \bar{Y} = b(X - \bar{X})$. Os valores resultantes do cálculo de y foram colocados, no gráfico, no eixo das ordenadas contra o $\log 1000X$ no eixo das abscissas. (Tabela 14 e Figura 7). A análise da variância da regressão, tanto para os valores de y obtidos para o TMV tratado como para o TMV controle, mostrou

Tabela 13. Resultado do ensaio biológico efetuado para verificar a ação do IN sobre a infectividade de diferentes concentrações do TMV em folhas de glutinosa

Concentração do TMV (X) (mg/ml)	Nº total de lesões		% inibição	Nº médio de lesões por meia folha		Nº de folhas
	Tratamento ^a	Controle ^b		Trat.	Contr.	
1,0	525	2353	77,6	37,5	168,0	14
0,5	436	2168	79,8	27,2	135,5	16
0,1	149	1094	86,2	9,9	72,9	15
0,05	94	841	88,9	4,4	40,0	21
0,01	28	314	91,0	1,6	18,4	17
0,005	6	192	96,8	0,4	12,8	15
0,001	2	71	97,1	0,1	4,4	16

a - 1,0 ml do IN (2,0 mg/ml) + 1,0 ml da suspensão de TMV em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0

b - 1,0 ml de água destilada + 1,0 ml da mesma suspensão de vírus

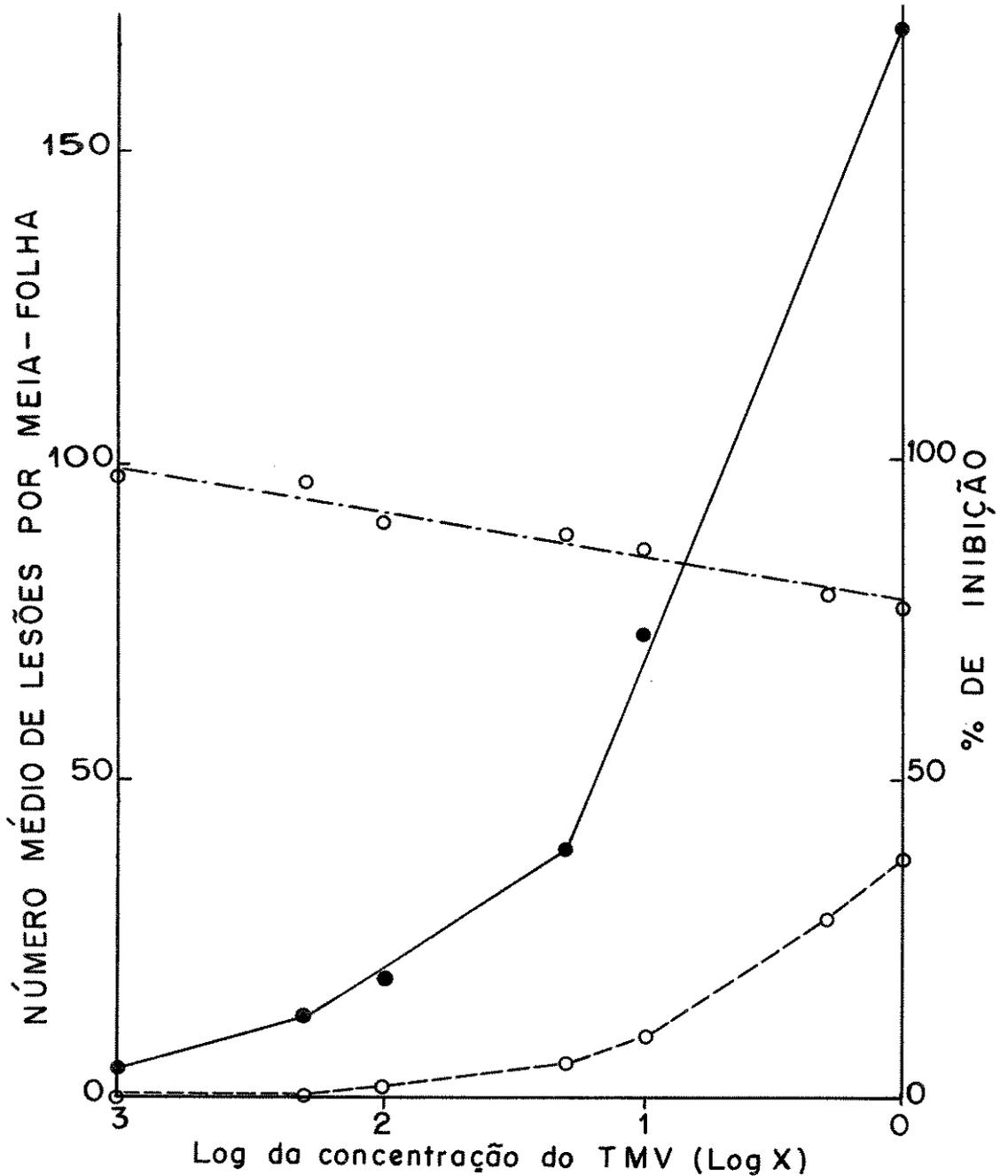


Figura 6-Diagramas do número médio de lesões por meia-folha correspondente ao TMV (●—●) e ao TMV + IN (○—○) e do efeito do IN (2mg/ml) sobre a infectividade do TMV, em diferentes concentrações, em folhas de glutinosa (○---○)

que a inclinação das linhas difere significativamente de zero, ao nível de 0,1%.

Foi calculado para cada dose de X a média dos probitos (Y) e os resultados estão apresentados na Tabela 15 e Figura 7.

Tabela 14. Valores de y obtidos para cada dose de X (log 1000X), tanto para o TMV tratado com o IN como para o TMV controle.

X	log 1000X	Valores de y*	
		Tratamento	Controle
1,0	3,00	4,84	5,00
0,5	2,69	4,37	4,88
0,1	2,00	3,34	4,13
0,05	1,69	2,87	3,88
0,01	1,00	1,84	3,27
0,005	0,69	1,38	3,00
0,001	0,00	0,34	2,40

$$* y - \bar{Y} = b (\log 1000X - \log 1000\bar{X})$$

Tabela 15. Média dos probitos para cada dose de X, (log 1000), tanto para o TMV tratado com o IN, como para o TMV controle

X	log 1000X	Média dos probitos (Y)	
		Tratamento	Controle
1,0	3,00	4,66	4,89
0,5	2,69	4,17	4,70
0,1	2,00	3,56	4,18
0,05	1,69	3,08	3,58
0,01	1,00	2,22	3,39
0,005	0,69	0,73	3,12
0,001	0,00	0,32	2,58

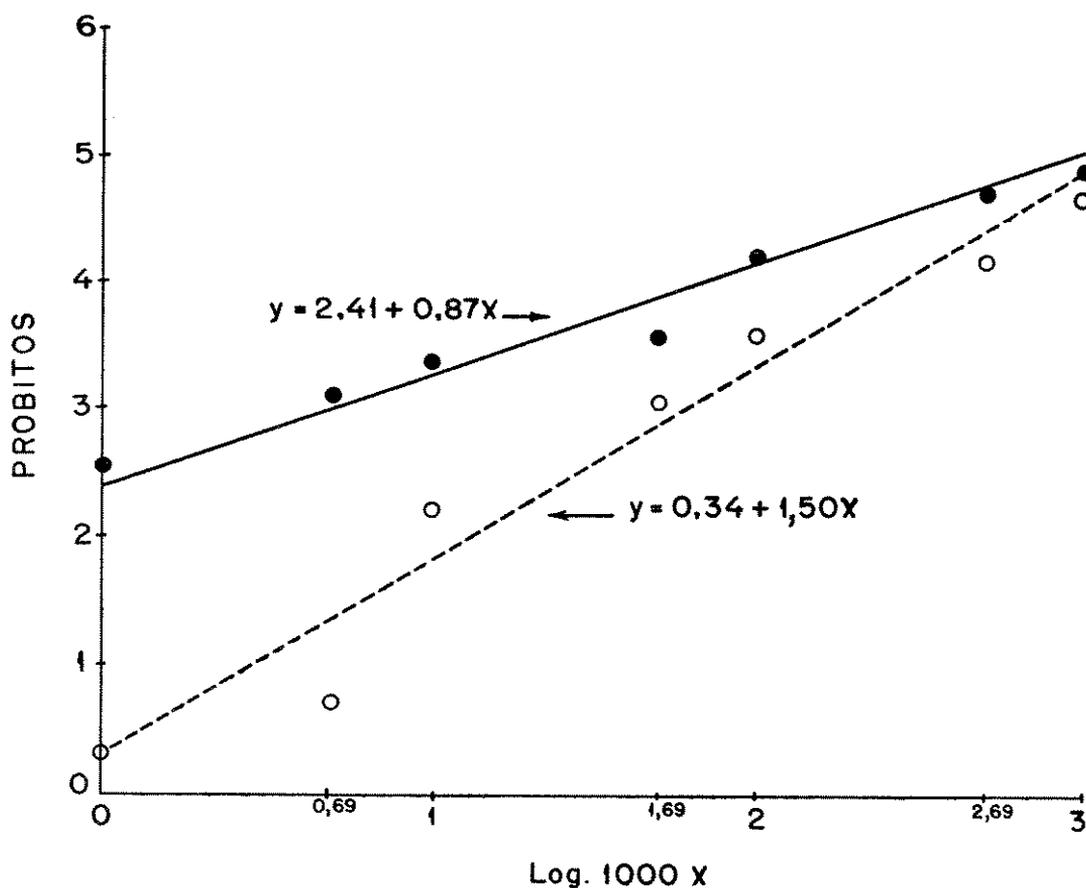


Figura 7- Linhas de regressão calculadas para o TMV controle (—) e para o TMV + IN (-----), a partir dos resultados do ensaio biológico sobre o efeito do IN na infectividade do TMV em diferentes concentrações.

- Média dos probitos obtidos para o TMV controle em cada dose de X (log 1000X)
- Média dos probitos obtidos para o TMV + IN em cada dose de X (log 1000X)

4.10. Mecanismo de ação do inibidor

4.10.1. Inoculação do TMV e do inibidor, separadamente, com diferentes intervalos de tempo

A aplicação prévia do inibidor (72; 48; 24; 6; 2h ou 30 min) simultânea ou posteriormente (30 min; 2; 6 ou 24h) à inoculação com o TMV, revelou que, apenas no caso da aplicação simultânea dos dois componentes (TMV e IN) houve redução da infectividade do vírus (Tabela 16).

Tabela 16. Resultados dos ensaios biológicos efetuados para verificar a ação do IN quando aplicado antes, simultâneo ou após o TMV em folhas de glutinosa.

Intervalo entre as aplicações do IN e do TMV	Nº total de lesões				% inibição*	
	Tratamento		Controle			
	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2		
IN ^a	72 h antes	750	520	855	515	7,2
	48 h antes	485	615	485	630	1,3
	24 h antes	590	570	590	585	1,2
	6 h antes	620	540	640	530	0,8
	2 h antes	550	615	560	610	0,4
	30 min antes	520	610	695	800	32,3
IN e TMV simultâneos	320	210	815	760	66,3	
TMV ^b	30 min antes	320	260	515	380	36,3
	2 h antes	385	415	380	420	0,0
	6 h antes	430	580	450	560	0,0
	24 h antes	625	525	630	525	0,4

a - Solução aquosa do IN (2 mg/ml) inoculada numa metade da folha de glutinosa. A outra metade recebeu apenas água.

b - Suspensão de TMV (0,1 mg/ml em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0), inoculada sobre toda a superfície foliar.

* % de inibição da média de dois experimentos.

4.10.2. Inoculação do TMV e do inibidor, separadamente, em faces opostas da mesma folha

A aplicação do inibidor na face inferior da folha e do TMV na face superior, com diferentes intervalos de tempo entre as aplicações, não revelou qualquer efeito inibidor sobre a infectividade do TMV, para todos os intervalos de tempo ensaiados (Tabela 17).

Tabela 17. Resultados dos ensaios biológicos efetuados para verificar a ação do IN quando aplicado antes ou simultaneamente à inoculação com o TMV, em faces opostas de folhas de glutinosa.

Intervalo entre as aplicações, em faces opostas, do IN ^a e do TMV ^b	Nº total de lesões				% inibição*
	Tratamento		Controle		
	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2	
24 h antes	210	405	205	460	7,5
IN 2 h antes	315	465	300	490	11,4
30 min antes	290	410	280	430	1,4
IN e TMV simultâneos	680	750	695	830	6,2

a - Solução aquosa do IN (2 mg/ml) aplicado à metade da folha, na face inferior. A outra metade da folha de glutinosa, foi inoculada com água destilada.

b - Suspensão de TMV (0,1 mg/ml em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0) inoculada sobre toda a superfície foliar, na face superior.

* % da média de inibição de dois ensaios.

4.10.3. Ação do inibidor sobre diversas combinações vírus-hospedeiros

Os resultados dos ensaios biológicos efetuados quanto ao comportamento do inibidor sobre os vírus TMV, PVX, CMV, BYMV, TSWV, STMV e LMV, quando estes foram inoculados em diferentes hospedeiros, demonstraram que só houve redução da porcentagem de infectividade no caso das combinações: TMV-glutinosa, TMV-datura, TMV-gonfrena, TMV-feijão "manteiga", PVX-gonfrena, BYMV-gonfrena e LMV-gonfrena.

Nestes hospedeiros, os sintomas induzidos foram do tipo local (Tabela 18 e Figura 8).

Na combinação BYMV-fumo, apesar dos sintomas serem locais a avaliação da inibição foi feita segundo uma estimativa, uma vez que as manchas cloróticas não puderam ser contadas individualmente. Conferiu-se à inibição uma nota, equivalente, aproximadamente, a 60% de inibição da infectividade do vírus.

Nas combinações TMV-fumo, PVX-glutinosa, BYMV-feijão "manteiga" ou "Scotia" e LMV-C.quinoa, para as quais os sintomas induzidos foram do tipo sistêmico, não se verificaram quaisquer diferenças no grau de infectividade resultante da inoculação (em grupos de 10 plantas, cada) da mistura VI ou dos vírus não tratados pelo IN.

Os demais vírus, TSWV, STMV e CMV, tanto quando inoculados em plantas que mostraram sintomas locais (TSWV-feijão "manteiga" ou "Scotia", STMV-gonfrena, STMV-fumo, STMV-feijão "manteiga" ou "Scotia" e CMV-C.amaranticolor), como quando inoculados em hospedeiros que desenvolveram sintomas sistêmicos (CMV-glutinosa, TSWV-fumo e STMV-fumo) não demonstra-

ram ter sofrido qualquer efeito do IN sobre sua infectividade.

Tabela 18. Resultados dos ensaios biológicos efetuados para verificar a ação do IN sobre a infectividade de diversos vírus inoculados em diferentes hospedeiros, nos quais os sintomas induzidos foram locais.

Vírus	Hospedeiros	Nº total de lesões		% inibição
		Tratamento ^a	Controle ^b	
TMV	Glutinosa	395	2470	84,0
	Datura	270	720	62,5
	Gonfrena	485	1825	73,5
	Feijão "Scotia"	125	580	78,4
PVX	Gonfrena	40	195	79,4
CMV	<u>C. amaranticolor</u>	1360	1330	0,0
BYMV	Gonfrena	530	1920	72,3
TSMV	Feijão "manteiga"	745	790	5,6
	Feijão "Scotia"	30	35	14,2
	Glutinosa	95	110	1,3
STMV	Feijão "manteiga"	210	175	0,0
	Feijão "Scotia"	10	10	0,0
	Gonfrena	420	410	0,0
LMV	Gonfrena	280	1800	84,4

a - 1,0 ml da suspensão de vírus purificado (TMV: 0,1 mg/ml em tampão de fosfato 0,02M de pH 7,0) ou do suco clarificado (demais vírus: 2 g de folhas + 5,0 ml do mesmo tampão, acrescido de sulfito de sódio 0,4%) + 1,0 ml do IN (2,0 mg/ml).

b - 1,0 ml das mesmas preparações de vírus + 1,0 ml de água destilada.

* Os dados apresentados representam uma única experiência, tomada como modelo, já que as repetições foram bastante consistentes nos resultados obtidos.

Figura 8. Aspectos de folhas de diferentes plantas hospedeiras inoculadas na metade direita com a mistura vírus-inibidor e na metade esquerda apenas com o vírus (controle), mostrando a redução de infectividade do vírus causada pelo IN.

A - TMV inoculado em glutinosa

B - TMV inoculado em datura

C - TMV inoculado em gonfrena

D - BYMV inoculado em fumo var. "White Burley".

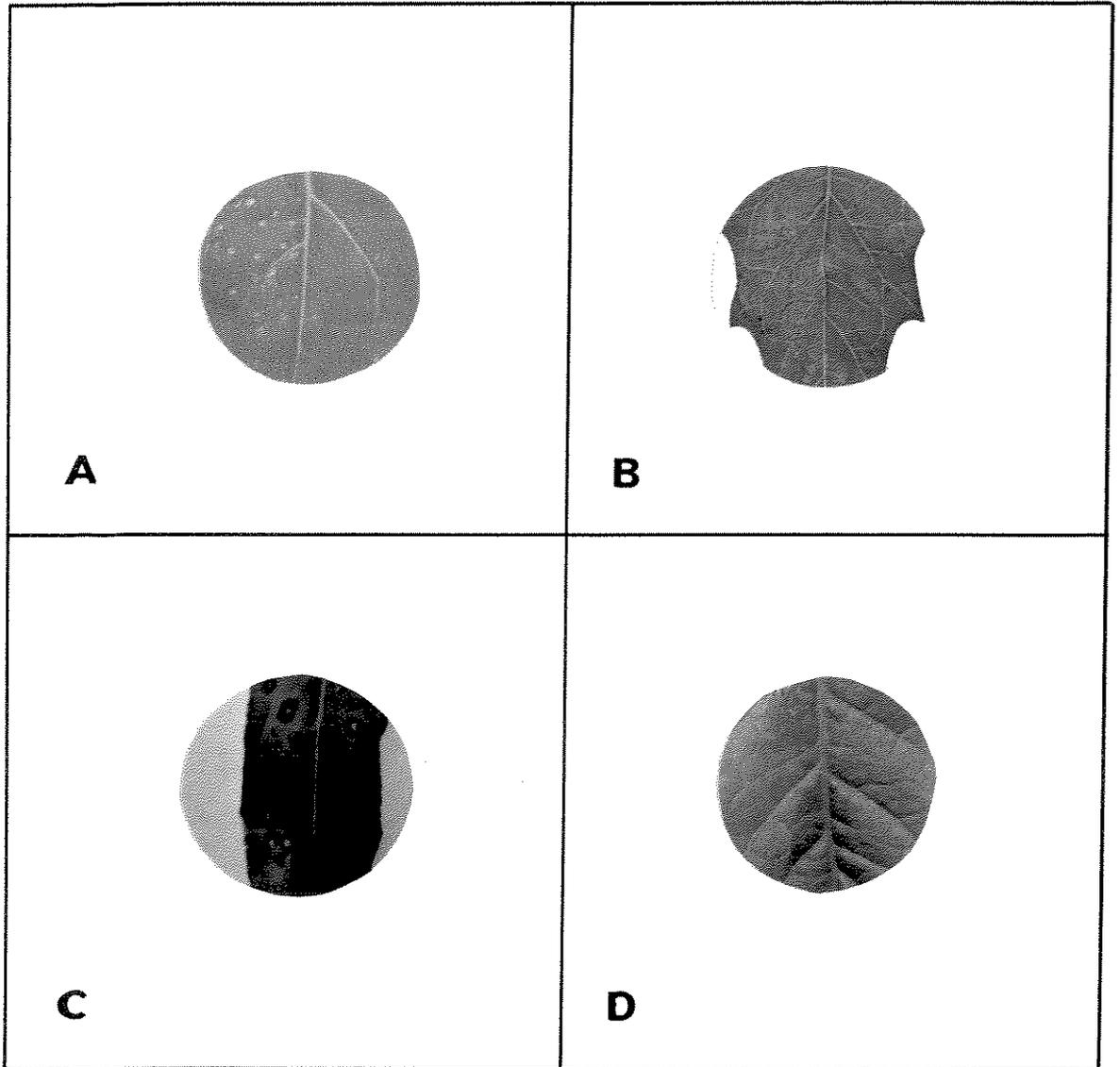


Figura 8

5. DISCUSSÃO

5.1. Algumas características físico-químicas da substância inibidora

O estudo das características físico-químicas da substância inibidora, presente no extrato aquoso de folhas de abútilom, sugere ser esta uma substância de alto peso molecular. Uma evidência deste fato se prende aos resultados apresentados na Tabela 3. A substância inibidora não é dialisável, ficando retida no interior da membrana de diálise. Estes resultados concordam com aqueles obtidos por diversos autores, como por exemplo, KUNTZ & WALKER (1947), GUPTA & PRICE (1950, 1952), SLAGLE *et al.* (1952), CROWLEY (1955), BENDA (1956), McKEEN (1956), FELDMAN (1963), FRANKI (1964), THOMSON & PEDDIE (1965), HODGSON *et al.* (1969) e GROHMANN & MUSUMECI (1970), os quais trabalhando com extratos de diferentes procedências, quer de plantas quer de microrganismos, puderam verificar também a presença de inibidores não dialisáveis.

Com base nos trabalhos de JERMOLJEV & ALBRECHTOVÁ (1966), GROHMANN & MUSUMECI (1970, 1972), MAYHEW & FORD (1971) e EBRAHIM-NESBAT & NIENHAUS (1972), o método de filtração em gel de Sefadex foi aplicado com o propósito de avaliar o peso molecular aproximado da substância inibidora. O fato do inibidor, quando submetido à filtração em gel de Sefadex, ter sido eluído no volume externo (V_0) da coluna de Sefadex G25 e no volume interno (V_1) da coluna de Sefadex G50 (Tabelas 7,8 e Figuras 1,2) está de acordo com os dados obtidos anteriormente pela diálise, confirmando tratar-se de uma substância de alto peso molecular. Sugere, ainda, de acordo com a tabela de limites de exclusão para proteínas e polissacáridos, contida no manual da PHARMACIA

(1966), que a substância tenha um peso molecular entre 5000 e 30000, se partirmos da hipótese que ela seja de natureza proteica, ou, entre 5000 e 10000 se for de natureza polissacarídica.

Os resultados obtidos pelo tratamento desproteinizador (Tabela 4), onde se verificou que o mesmo não teve qualquer efeito sobre a capacidade inibidora do suco de folhas de abutilom, sugerem que a natureza química do inibidor não seja proteica. Esta idéia é também enfatizada pela ausência de reações quando se aplicou ao inibidor os testes de Biureto e Ninhidrina, cujas reações positivas sugeririam o caráter proteico da substância. Mais uma evidência de que não se trata de uma substância proteica se baseia na grande estabilidade da substância ao calor. Durante os processos de extração e purificação, a solução contendo o inibidor foi submetida à fervura, por longos períodos de tempo, sem que perdesse a sua capacidade inibidora. Este caráter termoestável da substância também foi usado por TAKAHASHI (1942, 1946), HODGSON et al. (1969) e MAYEHW & FORD (1971) como uma indicação de que as substâncias, por eles estudadas, não eram de natureza proteica. Por outro lado, os resultados positivos obtidos com os testes de Molisch e Antrona demonstraram a presença de açúcares na molécula do inibidor, sugerindo que a substância estudada seja de natureza polissacarídica, possivelmente formada de resíduos de hexose ou hexulose. Os dados apresentados por TAKAHASHI (1942, 1946), HODGSON et al. (1969) e MAYEHW & FORD (1971) referem-se a polisacáridos, extraídos de microrganismos, com propriedades antivirais. SLAGLE et al. (1952) e GUPTA & PRICE (1950, 1952) descreveram inibidores, extraídos de fungos, de natureza não-proteica, sem chegarem, entretanto, a definir a estrutura das substâncias estudadas. KASSANIS & KLECZKOWSKI (1948) isolaram uma glicoproteína de folhas de Phytolacca esculen-

ta responsável pela inibição de vírus.

Por outro lado, a presença de inibidores de natureza proteica foi verificada por muitos autores, como KUNTZ & WALKER (1947), CROWLEY (1955), BENDA (1956), McKEEN (1956), RAGETLI & WEINTRAUB (1962a, 1962b), JERMOLJEV & ALBRECHTOVÁ (1966), que trabalharam com extratos de diferentes plantas, enquanto que LOEBENSTEIN & ROSS (1963) demonstraram que a própria proteína do TMV era dotada de propriedade inibidora.

Segundo os dados da literatura aqui referidos parece que a natureza proteica dos inibidores está, na maioria das vezes, associada àquelas substâncias extraídas de plantas superiores, enquanto que aos microrganismos estariam associados os inibidores de natureza polissacarídica. No caso do abútilom, em se tratando de planta superior, seria esperado que a natureza do inibidor fosse proteica. Porém, os resultados obtidos indicam que a substância estudada é um polissacárido. Entretanto, convém salientar que EBRAHIMNESBAT & NIENHAUS (1972) conseguiram extrair, de beterraba, um inibidor de natureza polissacarídica.

Durante o trabalho experimental com o inibidor extraído de abútilom foi verificado que a substância era estável ao envelhecimento "in vitro", quer em solução aquosa, quer após ter sido liofilizada. Esta estabilidade se mantinha por mais de uma semana, se a solução ficasse à temperatura ambiente e por meses, se fosse guardada a 4°C. No caso da substância ter sido liofilizada e mantida, sob vácuo, a 4°C a estabilidade dela se prolongou por mais de um ano. Também estas características foram observadas pelos autores que trabalharam com inibidores de caráter polissacarídico.

A substância inibidora quando tratada pelo carvão ativo ficou retida, conforme os dados da Tabela 5, da mesma maneira que outros inibidores presentes em extratos de outras plantas. KUNTZ & WALKER (1947) isolaram de folhas de espinafre um inibidor que era retido pelo carvão ativo não sendo removível deste, quer por soluções ácidas, quer por alcalinas. O mesmo fenômeno de adsorção foi observado por KASSANIS & KLECZKOWSKI (1948) estudando as propriedades da glicoproteína extraída de Phytolacca esculenta. FELDMAN (1963), também verificou o mesmo efeito de adsorção, por carvão ativo, dos inibidores por ele estudados.

Uma outra característica apresentada pela substância inibidora extraída de abútilom e comprovada através de testes biológicos (Tabela 6), foi a estabilidade em meio alcalino (pH 11). Segundo os dados obtidos, o inibidor não é precipitado pelo tratamento com hidróxido de amônio, permanecendo no sobrenadante e mantendo intacta a sua propriedade inibidora. Estes dados estão de acordo com aqueles verificados por MAYHEW & FORD (1971) em relação ao polissacárido extraído de Physarum polycephalum, com o qual trabalharam. Porém, KUNTZ & WALKER (1947), trabalhando com um inibidor de natureza proteica verificaram a instabilidade do mesmo em pH alcalino, acima de 8,0.

Dadas as características do inibidor estudado e considerando-se a possibilidade de ser ele um polissacárido, foi feito um tratamento com diastase (α - β amilase). De acordo com os resultados obtidos (Tabela 9) não houve qualquer alteração do poder inibidor da substância após o tratamento enzimático, nas condições em que foi realizado. Este fato, entretanto, não significa que não tenha havido hidrólise da molécula do inibidor pela enzima. Apenas indica que a ação inibidora da substância estudada não foi alterada pelo tra-

tamento, segundo os resultados obtidos dos ensaios biológicos. Não se deve eliminar a hipótese de que as moléculas do inibidor, após o tratamento, tenham se hidrolisado, dando origem a resíduos de menor peso molecular, porém ainda ativos quanto à ação inibidora sobre o TMV. Como no caso do tratamento por diastase, verificou-se que o tratamento do inibidor pela pectinase não alterou a ação inibidora do mesmo, sobre a infectividade do TMV. Também aqui, não se pode falar que não tenha havido ação hidrolítica da enzima sobre o inibidor, mas que, caso esta tenha ocorrido, o produto resultante da hidrólise conserva, ainda, as mesmas características inibidoras. Isto poderia indicar que o IN, em si, não é uma molécula de alto peso molecular, mas sim um radical menor ligado a um suporte de alto peso molecular, possivelmente um polissacárido. Isto no caso de que a diastase ou a pectinase tenham agido hidroliticamente sobre a substância inibidora. Mas deve-se considerar também, a hipótese de que o IN, apesar de ser de natureza polissacarídica não seja afetado pelas enzimas empregadas. Uma maneira de se tentar esclarecer este ponto seria a associação dos tratamentos enzimáticos à cromatografia, à filtração em coluna de gel de Sefadex e à espectrofotometria.

SELA et al. (1964) e GROHMANN & MUSUMECI (1970, 1972) utilizaram-se da análise espectrofotométrica ao ultravioleta como um dos métodos que lhes permitiu a caracterização das substâncias com as quais trabalharam. O inibidor extraído de folhas de abútilom quando, submetido à espectrofotometria ao ultravioleta (Figura 3), apresentou duas bandas de absorção características: I(260-276 nm) e II(310-320 nm). Estes dados corroboram com a idéia de que a substância não é uma proteína, uma vez que estas apresentam um máximo de absorbância em 280 nm, com o aparecimento de um pico bem

definido. A comparação entre o espectro obtido para o inibidor extraído de abútilom e aqueles correspondentes a outros polissacáridos, como o "Blue dextran 2000" e a pectina, ambos de alto peso molecular, mostrou algumas características semelhantes. Apesar das características consistentemente observadas para o espectro obtido, dele não se pode tirar conclusões sobre a estrutura química do inibidor. Porém, ele serviu para a avaliação do grau de pureza do inibidor e, a exemplo de outros pesquisadores como JERMOLJEV & ALBRECHTOVÁ (1966), GROHMANN & MUSUMECI (1970, 1972) e EBRAHIM-NESBAT & NIENHAUS (1972), para acompanhar a eluição do inibidor nos ensaios de filtração em gel de Sefadex (Figuras 1,2). Neste caso, as frações eluídas que mostraram maior absorvância corresponderam, exatamente, àquelas para as quais o ensaio biológico revelou a maior porcentagem de inibição da infectividade do TMV.

5.2. Algumas características da mistura vírus-inibidor e considerações sobre o mecanismo de ação do inibidor

A maioria dos autores que trabalharam com inibidores de vírus estudaram o comportamento da mistura vírus-inibidor, quando esta foi submetida à ultracentrifugação. Em todos os casos observaram que o inibidor permanecia no sobrenadante, enquanto que o vírus era separado do IN por sedimentação, sem mostrar qualquer alteração na sua infectividade quando, ressuspendido no tampão adequado e novamente submetido a ensaios biológicos. De acordo com os dados apresentados na Tabela 11, a mistura TMV-inibidor comportou-se como nos casos relatados, ou seja, o inibidor permaneceu no sobrenadante, enquanto que o TMV foi sedimentado, após o tratamento por ultracentrifugação da mistura VI. Os ensaios biológicos rea-

lizados com ambas as frações vieram comprovar que o TMV não perdeu sua infectividade e que o inibidor continuou ativo. Estes dados concordam com os da literatura, como se pode observar, entre outros, nos trabalhos de SILL (1951), GUPTA & PRICE (1952), SLAGLE et al. (1952), BENDA (1956), LOEBENS - TEIN & ROSS (1963) e FELDMAN (1963). Estes resultados vem demonstrar que a ligação entre as partículas de vírus e a molécula do inibidor é fraca, podendo ser facilmente rompida pelo processo físico da ultracentrifugação. O fato de tanto o vírus, como o inibidor, conservarem suas características, após a ultracentrifugação, sugere que o inibidor não desnatura a partícula de vírus.

Segundo MAYHEW & FORD (1971), parece que a ação do inibidor se dá sobre as partículas de vírus em si, por um processo de recobrimento e agregação das mesmas. As partículas, assim recobertas ou ficariam impedidas de penetrar nas células do hospedeiro ou não se desencapariam evitando a consequente liberação do ácido nucléico, para que se efetuasse o processo de replicação no interior da célula vegetal.

A partícula de vírus em presença do inibidor, quando analisada ao microscópio eletrônico, mostrou-se alterada quanto ao seu contorno, perdendo o caráter retilíneo e tornando-se irregular, com aumento de diâmetro. As partículas se aglomeram irregularmente, e percebe-se nitidamente o depósito de grânulos na superfície das mesmas. O canal central continua visível, apenas desaparecendo nos trechos recobertos pelo inibidor, que tem aspecto grumoso, formando massas disformes e de volumes variáveis. Notam-se vários pontos de quebra nas partículas, especialmente próximo aos pontos em que ela se aproxima ou entra em contato com o inibidor. Em geral, as extremidades das partículas, sob ação do inibidor, deixam de exibir ângulos, tornando-se arredondadas e entume

cidas. TAKAHASHI (1946) e MAYHEW & FORD (1971) observaram os mesmos detalhes e sugeriram que os inibidores, por eles estudados, agiam diretamente sobre o vírus.

A partícula de vírus, sob a ação do inibidor, não perde a sua capacidade de reagir com o antissoro específico para TMV, conforme os dados obtidos nos testes de dupla-difusão em agar. Considerando-se a idéia de que a ação do inibidor seja puramente mecânica, de recobrimento e agregação das partículas de vírus, seria possível que a substância inibidora, ao invés de recobrir completamente a superfície da partícula de vírus, pudesse formar, em torno delas, uma rede de malhas largas permitindo o desenvolvimento normal das reações serológicas entre as partículas de vírus e seu antissoro. Isto viria explicar os resultados do teste serológico, mesmo quando se usou como antígeno misturas de TMV e inibidor, este último em concentrações suficientemente altas para que, nos ensaios biológicos, a porcentagem de inibição da infectividade do TMV fosse de até 95%. O próprio agar utilizado como meio de difusão para o antígeno e antissoro, nos testes serológicos, poderia reter, por adsorção, o inibidor, liberando as partículas de vírus, o que poderia explicar os resultados iguais, obtidos quando se usou como antígenos misturas de vírus-inibidor ou suspensão de vírus purificado. FELDMAN (1963), também constatou que o TMV, em presença de extratos de pimentão, não perdia seu poder antigênico de reação quando ensaiado contra o antissoro específico para o TMV. Os resultados poderiam ainda ser explicados baseando-nos nas observações feitas ao microscópio eletrônico que evidenciou o fato das partículas de vírus, sob ação do IN, se fragmentarem, especialmente próximo às extremidades. Os fragmentos maiores poderiam reagir com o antissoro específico sem qualquer alteração sensível do título do mesmo quando comparado àque-

le verificado para o TMV purificado.

KASSANIS & KLECZKOWSKI (1948) estudaram o efeito da diluição do suco clarificado de Phytolacca esculenta sobre a redução da infectividade do TMV e demonstraram que o ponto final da diluição do inibidor, no suco clarificado, correspondia a 1:10.000, e que na diluição de 1:100 a redução da infectividade do TMV era de aproximadamente 95%. Os mesmos autores trabalhando com o inibidor purificado - uma glicoproteína - verificaram que na concentração de 0,0002% (2µg/ml) o efeito era praticamente o mesmo que o observado para o suco clarificado na diluição de 1:100. No caso do inibidor extraído e purificado a partir de folhas de abútilom, o ponto final de diluição do mesmo, em relação à inibição causada para o TMV (0,1 mg/ml), foi da ordem de 0,02 mg/ml (Tabela 12 e Figura 5). Isto significa que o ponto final de diluição do inibidor extraído de P.esculenta, sendo da ordem de 1:10.000, corresponde a uma concentração da glicoproteína equivalente a 0,02 µg/ml e, portanto, cerca de 1000 vezes mais ativo que o inibidor extraído do abútilom. Para se obter a mesma ação inibidora, de cerca de 83%, correspondente ao emprego de 2 µg/ml da glicoproteína, foi necessário o emprego de uma solução do IN de 2 mg/ml. Estes dados confirmam a eficácia 1000 vezes maior da glicoproteína, quanto à ação inibidora sobre o TMV, em relação ao inibidor aqui estudado.

Nos experimentos onde foi mantida constante a concentração do IN (2 mg/ml) e empregadas diferentes concentrações do TMV, verificou-se que, os dados obtidos para o TMV + IN e TMV controle (Tabelas 13, 14 e 15 e Figuras 6 e 7) estão de acordo com a equação da reta $Y = a+bx$, onde Y representa o probito e X o log da concentração do vírus (expresso em log 1000 X). Uma vez que os dados obtidos se distribuem segundo uma linha reta (Figura 7), isto demonstra que eles seguem uma distri -

buição normal. O fato das linhas de regressão para o TMV controle e TMV + IN, convergirem à medida que a concentração do vírus aumenta, sugere que uma concentração constante do inibidor afeta diferentemente concentrações decrescentes do vírus, donde se pode concluir que a ação do inibidor se faz sobre a partícula de vírus e não sobre a suscetibilidade da planta hospedeira. Se o efeito do IN se manifestasse sobre o hospedeiro, então uma concentração constante do IN inativaria o vírus, independente da concentração deste, o que não ocorre, segundo os resultados obtidos.

Ensaio preliminares já haviam demonstrado que a ação "in vitro" do inibidor sobre o TMV era instantânea, sendo desprezível o tempo de contato entre os componentes da mistura. Similarmente, KUNTZ & WALKER (1947), GUPTA & PRICE (1950), SLAGLE et al. (1952) e MAYHEW & FORD (1971) também demonstraram que o tempo de contato entre as substâncias inibidoras, por eles estudadas, e os vírus ensaiados não tinha qualquer efeito sobre a inibição da infectividade obtida.

Segundo BAWDEN os inibidores de vírus podem ser classificados em dois grupos: os que agem sobre a infecção e os que atuam na replicação dos vírus. Os que agem sobre a infecção também podem ser divididos em dois grupos: os que agem diretamente sobre as partículas de vírus e os que afetam a suscetibilidade do hospedeiro (BAWDEN, 1954).

A distinção entre os dois tipos de mecanismo de ação de um determinado inibidor é bastante difícil e os autores, nas suas sugestões, se baseiam na soma das evidências obtidas a partir dos experimentos por eles realizados. De um modo geral, os inibidores que afetam a suscetibilidade do hospedeiro

deiro podem ser distinguidos daqueles que agem sobre o vírus por certas características, como as sugeridas por CROWLEY (1955): a ação do inibidor depende do hospedeiro empregado; eles são mais eficazes quando a concentração do inóculo é alta; agem quando aplicados antes ou após a inoculação com o vírus ou quando aplicados na face oposta àquela onde o vírus é inoculado. Outro fato tomado por KASSANIS & KLECZKOWSKI (1948) como indício da ação do inibidor sobre o hospedeiro é que concentrações constantes do inibidor causam a mesma redução da infectividade do vírus, independente da concentração deste. Fazendo-se uma comparação entre os conceitos formulados por CROWLEY (1955) e por KASSANIS & KLECZKOWSKI (1948), para explicarem a ação do inibidor sobre o hospedeiro, verifica-se que eles são contraditórios, pois enquanto o primeiro autor salienta que a ação do inibidor sobre o hospedeiro é tanto mais eficaz quanto maior for a concentração do vírus usado, os autores seguintes sugerem que a concentração do vírus não altera a redução da infectividade causada pelo tratamento, do mesmo, com uma concentração constante de inibidor. Se compararmos, sob este aspecto, os resultados aqui obtidos com os conceitos estabelecidos nos dois trabalhos mencionados, podemos concluir que os dados apresentados (Tabelas 13, 14 e 15 e Figuras 6 e 7) estão em total desacordo com ambos os conceitos estabelecidos. No nosso caso, quanto mais alta é a concentração do vírus, menos eficaz é a ação do inibidor (contraria o conceito estabelecido por CROWLEY, 1955), sendo que a diluição do vírus resulta numa maior redução da infectividade do mesmo em presença de uma quantidade constante de inibidor (contraria KASSANIS & KLECZKOWSKI, 1948). Pelo dados apresentados na Tabela 13, pode-se verificar que a diluição de 1:1.000, do vírus, causa um aumento da redução de infectividade da ordem de 20%, para uma dada concentração do inibidor. Segundo GENDRON & KASSANIS (1954) a falta de especificidade do inibidor sobre os vírus empregados e a depen -

dência do hospedeiro utilizado, também, são tomadas como evidências que apoiam a idéia da ação do inibidor sobre o hospedeiro. Segundo nossas observações, os dados aqui obtidos não se enquadram nos demais conceitos estabelecidos por CROWLEY (1955) e por GENDRON & KASSANIS (1954). Por outro lado, TAKAHASHI (1956), LOEBENSTEIN (1962), MAYHEW & FORD (1971) e GUPTA & RAYCHAUDHURI (1972) defenderam a idéia de que a ação inibidora se faz sobre o vírus diretamente, podendo ou não ser reversível. Para isto, se baseiam, de um modo geral, na especificidade da ação do inibidor sobre certos vírus apenas; alterações na ultraestrutura da partícula infectante, quando observada ao microscópio eletrônico; ausência de ação protetora quando o inibidor é inoculado antes que o vírus; ou quando aplicado na face oposta à inoculada com o vírus. Fato é que muitas destas características quando tomadas isoladas podem confundir a interpretação do tipo de mecanismo segundo o qual se dá a ação do inibidor. A maioria dos autores como SLAGLE et al. (1952), McKEEN (1956), THOMSON & PEDDIE (1965), GROHMANN & MUSUMECI (1972) tendem a apoiar a idéia que a ação do inibidor é sobre o hospedeiro, alterando a suscetibilidade do mesmo. Entretanto, o fato da ação inibidora se fazer sobre o hospedeiro, não necessariamente significa que houve alteração da suscetibilidade da planta, pois, para que isto realmente ocorresse, seriam necessárias alterações no metabolismo da mesma, o que levaria algum tempo e não poderia ser explicado pela ação protetora, na planta, induzida pela aplicação prévia do inibidor à inoculação com o vírus, quando o intervalo entre estas aplicações fosse menor que 1 hora. Os trabalhos de LOEBENSTEIN (1962) e SELA (1962, 1964, 1966) demonstram que para que haja uma reação da planta, levando à modificação de sua suscetibilidade ou formação de um fator anti-viral, como consequência da infecção prévia da planta por um vírus, é necessário um intervalo de tempo entre os tratamentos de pelo menos 4 dias. Estas substâncias

foram inicialmente consideradas como sendo um tipo de "interferon" - em analogia ao que acontece nos organismos dos animais - porém, difere deste, especialmente pela falta de especificidade em relação ao hospedeiro, além do que a natureza química do fator anti-viral, descrito por SELA (1962, 1964, 1966), sendo um ácido nucleico discorda daquela verificada para o "interferon" animal, que é sempre uma proteína.

Similarmente, a aplicação do inibidor na face oposta à da inoculação com o vírus não poderia modificar a suscetibilidade do hospedeiro, se o intervalo entre as aplicações não fosse suficientemente longo para que as mudanças metabólicas pudessem ocorrer na planta. A ação sobre o hospedeiro pode ser, simplesmente de caráter local e físico, como por exemplo: o bloqueio dos pontos de entrada do vírus na célula; a combinação do inibidor com constituintes especiais da célula; o bloqueio competitivo dos "sites" no hospedeiro essenciais ao estabelecimento do vírus nas primeiras fases da infecção; combinação com sistemas enzimáticos específicos ou metabólitos necessários à replicação do vírus; falta de habilidade do hospedeiro para dissociar o complexo vírus-inibidor quando a mistura de ambos se dá "in vitro"; quebra das partículas de vírus, sob a ação do IN, impedindo a sua replicação. Uma vez que a maioria dos inibidores ensaiados, até o presente momento, são substâncias macromoleculares (proteínas simples ou conjugadas, polissacáridos ou ácidos nucleicos), como discutido por McKEEN (1956) eles não são dialisáveis e consequentemente moléculas muito grandes para transpor a membrana protoplasmática da célula vegetal, penetrando e migrando através do tecido, afim de poder agir no seu interior. O autor sugere, então, que outras substâncias conjugadas, de menor peso molecular e maior mobilidade possam ser seletivamente absorvidas pelas células e, translocadas para agir nos "sites" específicos, bloqueando o estabelecimento do vírus nas pri-

meiras fases da infecção ou, se considerarmos a hipótese da ação direta do inibidor sobre a partícula de vírus, impedindo a sua replicação por agregação das mesmas no interior da célula, evitando o descapamento das partículas e a consequente liberação do ácido nucléico, ou bloqueando o sistema enzimático necessário à replicação das partículas.

Levando em consideração todas estas observações e baseando-nos nas evidências já relatadas, que sugerem uma ação direta do inibidor, extraído de abútilom, sobre o vírus, procuramos analisar os resultados obtidos para os ensaios sobre a aplicação separada do inibidor e do vírus, na mesma face ou em faces opostas da mesma folha de glutinosa.

Os resultados da aplicação do inibidor e do vírus, separadamente (Tabela 16) demonstram que quando o intervalo de tempo entre as aplicações é de 30 min., tanto para o inibidor aplicado antes como após o vírus, houve uma redução da infectividade do TMV de 32,3% e 36,3%, respectivamente, em contraposição à porcentagem de inibição (66,3%) verificada quando a inoculação do TMV se deu simultaneamente à aplicação do inibidor. Para os demais tratamentos (inibidor aplicado 72, 48, 24, 6 ou 2 h antes que o TMV ou 2, 6 ou 24 h depois) não houve qualquer alteração da infectividade do vírus, quando comparada aos controles não tratados. As baixas porcentagens de inibição encontradas para alguns intervalos de tempo não tem significado estatístico, uma vez que qualquer inibição da ordem de $20\% \pm 2$ não é considerada significativa (GUPTA & PRICE, 1950). É necessário, entretanto, enfatizar que nos tratamentos em que houve redução da infectividade do vírus, as folhas ainda apresentavam um filme de solução na superfície, como consequência da aplicação prévia da solução do inibidor ou da suspensão do TMV. Havia, portanto, a presença de um meio líquido, entre as partícu

las de vírus e as moléculas do inibidor, semelhante ao que ocorre durante a reação "in vitro". Talvez seja esta a explicação para a ação inibidora da substância quando aplicada 30 min antes ou após o TMV.

GUPTA & PRICE (1950), verificaram que a aplicação do inibidor 30 min antes que o vírus reduziu a infecção em 57%, e que esta porcentagem aumentou em função de intervalos menores entre as aplicações do inibidor e do vírus. Os mesmos autores verificaram que, quando o inibidor foi aplicado até 30 min após o vírus, a redução da infectividade foi de 80% e que, neste caso, intervalos menores que 30 min não alteraram o resultado. Baseando-se nestes resultados os autores sugeriram, embora não conclusivamente, que o inibidor deveria agir sobre a planta, alterando a suscetibilidade da mesma. São da mesma opinião os autores SLAGLE et al. (1952), que obtiveram inibição satisfatória quando aplicaram o inibidor 4 h antes ou 15 min após o vírus. McKEEN (1956), verificou que a aplicação do inibidor até 24 h antes que o vírus previniu completamente a infecção, não tendo, entretanto, qualquer efeito sobre o vírus se aplicado 1 h após. FELDMAN (1963), obteve redução da infectividade do TMV quando aplicou o inibidor até 2 h antes. Com intervalos maiores ou aplicando o inibidor depois que o vírus não obteve resultados. GROHMANN & MUSUMECI (1970, 1972), obtiveram inibição do TMV mesmo quando o inibidor foi aplicado 1 h antes ou 6 h depois da inoculação com o vírus. MAYHEW & FORD (1971), por sua vez, verificaram que o inibidor aplicado após a inoculação com o vírus, com intervalos de tempo de no máximo 1 h, inibiu completamente a infectividade do mesmo. Muitos destes resultados poderiam ser interpretados como uma ação direta sobre o vírus, fora ou no interior do hospedeiro, mas dificilmente, como sugerem alguns autores, resultantes de modificação de suscetibilidade do hospedeiro.

Quanto à aplicação do inibidor na face oposta àquela que recebeu o TMV, os resultados da Tabela 17, demonstram que não houve qualquer efeito do tratamento sobre a infectividade do vírus. Contrariamente, GUPTA & PRICE (1952) usando o mesmo processo de inoculação não encontraram diferenças significativas quando compararam os dados obtidos desta experiência com aqueles resultantes do ensaio em que o vírus e o inibidor foram aplicados na mesma face da folha. Segundo estes autores não haveria necessidade que o inibidor entrasse em contato direto com as partículas de vírus para que houvesse inibição da infectividade das mesmas, sugerindo uma ação sobre a planta hospedeira. Resultados e conclusões semelhantes foram obtidos por outros autores como CROWLEY (1955), Mc KEEN (1956), FELDMAN (1963) e GROHMANN & MUSUMECI (1972). Os dados apresentados nas duas tabelas (16 e 17) vem reforçar a hipótese aqui sugerida de que o inibidor extraído de folhas de abútilom age diretamente sobre as partículas de vírus, não alterando a suscetibilidade do hospedeiro, uma vez que, se não houver um contato direto entre o inibidor e o vírus, não há qualquer alteração da infectividade do vírus.

A discussão estabelecida, anteriormente, nas considerações gerais, sobre o mecanismo de ação dos inibidores ressaltou a importância da especificidade do inibidor, do tipo e da sensibilidade dos hospedeiros empregados. Por esse motivo a substância extraída de abútilom foi ensaiada, quanto a sua ação inibidora, sobre diversos vírus inoculados em hospedeiros diferenciais. O tamanho das partículas de vírus foi tomada como o principal fator para a seleção dos mesmos, a serem usados nos experimentos. Entre os vírus alongados selecionou-se o PVX (13 x 515 nm), o BYMV e o LMV (ambos com 15 x 750 nm); o TMV (18 x 300 nm) foi tomado como exemplo de vírus do tipo bastonete; entre os vírus isodiamétricos foram escolhidos o CMV (28 nm) e o STMV (25-30 nm); o TSWV (90 -

- 120 nm) foi selecionado como exemplo de vírus esférico provido de membrana.

Para cada vírus empregou-se, pelo menos, duas plantas hospedeiras diferenciais, quanto ao tipo de sintomas nelas induzidos, ou seja, sintomas sistêmicos ou locais. Os resultados (Tabela 18) demonstraram que, em função dos hospedeiros e dos vírus usados, o inibidor mostrou-se altamente específico, agindo somente sobre os vírus do tipo alongado ou bastonete, quando inoculados em plantas que desenvolveram sintomas locais. Nas plantas em que os sintomas foram sistêmicos não se notou qualquer diferença na severidade dos sintomas, ou no tempo necessário para que estes se manifestassem, quando se compararam os resultados a partir das inoculações realizadas com os vírus tratados pelo inibidor com aqueles obtidos para os respectivos controles.

No caso dos vírus isodiamétricos, recobertos ou não por membrana, o inibidor não alterou a infectividade dos mesmos, tanto quando eles foram inoculados em hospedeiros que desenvolveram sintomas sistêmicos, como nos que mostraram sintomas locais. Estes resultados vem corroborar com a idéia de que o inibidor extraído de folhas de abútilom, age sobre o vírus em si, e sugere que o tamanho da partícula é importante para que esta ação inibidora se manifeste. Este fato, talvez, pudesse ser explicado considerando - se os tipos de ligações que estariam envolvidas no processo de complexação entre as moléculas do inibidor e as partículas de vírus, através do tipo e da distribuição de cargas elétricas no inibidor e ao longo das partículas de vírus, o que asseguraria, além da formação do complexo, a agregação das próprias partículas recobertas pelo inibidor, como se observa ao microscópio eletrônico. Parece, pois, haver especificidade da ação do inibidor e que esta estaria rela

cionada ao tipo e à forma do vírus empregado e não ao hospedeiro, uma vez que uma mesma planta reage diferentemente segundo o vírus empregado. O exemplo mais típico que se pode tomar para demonstrar que o hospedeiro não tem qualquer influência sobre a redução da infectividade dos vírus empregados, em presença do IN, é o caso de plantas de glutinosa. Para o TMV (sintomas locais) foi verificada inibição, enquanto que para o PVX (sintomas sistêmicos) não se observou qualquer indício de inibição. Também não foi verificado indícios de inibição quando os vírus empregados foram o TSWV (sintomas locais passando a sistêmicos) e o CMV (sistêmico). O feijão "Scotia" também se prestou muito bem ao tipo de experimento, em questão, mostrando que o IN somente agia quando se inoculava, nesta variedade, um vírus do tipo bastonete, como o TMV, que manifestasse sintomas locais. Os vírus isodimétricos STMV e TSWV, ambos indutores de sintomas locais nesta variedade de feijão, não sofreram qualquer redução da infectividade quando sob a ação do inibidor. Por outro lado, o BYMV, embora sendo um vírus alongado, que quando inoculado em gonfrena (sintomas locais) se mostrou inibido, quando inoculado em feijão "Scotia" (sintomas sistêmicos) não teve sua infectividade alterada pelo tratamento com o inibidor quando comparada ao controle.

Empregando-se feijão "manteiga" como hospedeiro, o TMV não mostrou sintomas, quer locais, quer sistêmicos; o BYMV (sintomas sistêmicos) não sofreu a ação do IN, o mesmo ocorrendo com os vírus STMV e TSWV, ambos indutores de sintomas locais nessa variedade de feijão. Tanto o TMV, como o PVX e o BYMV, inoculados em gonfrena (ambos indutores de sintomas locais) quando tratados pelo IN mostraram redução da infectividade, ao passo que o STMV (sintomas locais) não demonstrou sofrer ação do IN. Estes resultados vem demonstrar que a espécie de planta empregada como hospedeira não tem qualquer influên

cia sobre a redução da infectividade dos vírus ensaiados , quando sob ação do IN. Este tipo de especificidade, em relação à forma e ao tamanho das partículas de vírus empregados, foi observada e sugerida por LOEBENSTEIN (1962), ao demonstrar que a proteína extraída de TMV inibia, além do próprio TMV, o PVX, quando inoculado quer em glutinosa quer em gonfrena, mas, que não tinha qualquer efeito sobre o CMV inoculado em Chenopodium amaranticolor. MAYHEW & FORD (1971), ao contrário, conseguiram inibição, além do TMV , de um vírus isodiamétrico (TRSV) mas não do SBMV, também isodiamétrico, quando estudaram o efeito do polissacárido obtido a partir de Physarum polycephalum. O mesmo ocorreu com a glicoproteína extraída de Phytolacca esculenta, por KASSANIS & KLECZKOWSKI (1948), que se mostrou ativa tanto sobre o TMV e o PVX, como sobre o CMV, TBSV e TNN, todos os três isodiamétricos.

Uma vez mais fica demonstrado que somente a análise conjunta de uma série de dados pode sugerir o tipo de mecanismo de ação exercido por um inibidor sobre os vírus, e que no caso do IN extraído de abútilom, a soma das evidências sugerem que a sua ação se faça diretamente sobre o vírus, ou agindo nas primeiras fases da infecção e impedindo sua replicação. Não há evidências que demonstrem uma ação direta sobre o hospedeiro levando à alterações metabólicas ou mudança de suscetibilidade do mesmo em relação ao vírus.

6. CONCLUSÕES

Os estudos realizados no presente trabalho permitiram chegar às seguintes conclusões:

1. O extrato aquoso obtido a partir de folhas de plantas de Abútilom striatum possui uma substância inibidora de vírus fitopatogênicos.
2. O inibidor não é dialisável, resiste ao tratamento desproteinizador, fica retido pelo carvão ativo, não se altera em pH alcalino, é termoestável, resiste ao envelhecimento "in vitro" e a dessecação.
3. Não perde a atividade inibidora quando submetida a tratamentos enzimáticos por diastase ou pectinase.
4. Apresenta espectro de absorção ao ultravioleta com duas bandas características, embora discretas, em 260-276nm e 310-320nm.
5. Dá resultados positivos quando submetido aos testes de Antrona e Molisch, e resultados negativos para os testes de Bial, Biureto e Ninhidrina.
6. Forma um complexo instável com as partículas de TMV, que pode ser rompido pela ultracentrifugação, sem que haja alteração da integridade e das características dos componentes da mistura.
7. Parece recobrir as partículas de TMV, promover o aglomeramento, fragmentação e alterações morfológicas das mesmas.

8. Nas reações de dupla-difusão em agar não houve diferença em relação ao título do antissoro para o TMV tratado com o IN e o vírus purificado (Controle).
9. Age sobre o vírus, "in vitro", instantaneamente, não importando o tempo de contato entre ambos.
10. Não age sobre o TMV quando aplicado antes ou depois deste, na mesma face ou em faces opostas da mesma folha de glutinosa.
11. A ação inibidora (% de inibição) é diretamente proporcional ao logaritmo da concentração do inibidor em relação a uma dada concentração de TMV, e inversamente proporcional quando se mantém constante a concentração do inibidor e se faz variar a do vírus
12. A ação do inibidor se dá sobre a partícula de vírus em si, e não sobre o hospedeiro, parecendo ser específica para os vírus bastonetes e alongados, não tendo qualquer efeito sobre a infecção sistêmica, mesmo quando causada por vírus do tipo alongado ou bastonete.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA

7. RESUMO

Uma substância extraída de folhas de Abutilon striatum Dicks. inibe a infecção causada pelo vírus do mosaico do fumo (TMV), quando inoculado em folhas de glutinosa (Nicotiana glutinosa L.). A substância termoestável, não dialisável e de alto peso molecular (5000-10000) é de natureza polissacarídica, podendo ser retida pelo carvão ativo, não se alterando em pH alcalino ou quando submetida a tratamento para desproteínização. Não é degradada pelos tratamentos com diastase ou pectinase. Possui duas bandas características de absorção ao ultravioleta, nas regiões compreendidas entre 260-276nm e 310-320nm.

A presença do inibidor não altera a capacidade de reação do TMV com seu antissoro específico, em testes de dupla-difusão em agar. O inibidor forma complexo instável com o TMV, podendo ser separado deste por ultracentrifugação. As eletromicrografias sugerem que o inibidor recubra as partículas de vírus, além de promover o agregamento, fragmentação e deformações das mesmas. Mantendo-se constante a concentração do TMV a porcentagem de inibição da infectividade deste é função logarítmica da concentração do inibidor. A redução da infectividade do vírus, quando empregado em diferentes concentrações, é inversamente proporcional às concentrações do mesmo, sob ação de uma determinada concentração do inibidor.

O inibidor reduz a infectividade do TMV inoculado em N. glutinosa, Datura stramonium, Gomphrena globosa e Phaseolus vulgaris var. "manteiga", mas não afeta a infectividade deste quando inoculado em Nicotiana tabacum var. "White Burley". Reduz, também, a infectividade do vírus X da batata (PVX) em G. globosa, do vírus do mosaico amarelo do feijoeiro (BYMV) inocula

do em G.globosa e em N. tabacum var. "White Burley", e do vírus do mosaico da alface (LMV) inoculado em G.globosa. Não mostrou qualquer efeito inibidor sobre o PVX, BYMV e o LMV quando inoculados, respectivamente, em N.glutinosa, P. vulgaris var. "Scotia" ou "manteiga" e Chenopodium quinoa. O inibidor mostrou-se inativo sobre a infectividade dos vírus: mosaico do pepino (CMV), necrose branca do fumo (STMV), e do vira-cabeça do tomateiro (TSWV), quando inoculados quer em hospedeiros que desenvolveram sintomas locais quer nos que mostraram sintomas sistêmicos.

O inibidor não age sobre o TMV, quando aplicado antes ou após à inoculação com o vírus, em intervalos maiores que 30 min. Não se mostrou ativo, tampouco, quando aplicado na face oposta à qual o TMV foi inoculado. Sua ação se faz diretamente sobre as partículas de vírus, e "in vitro" a reação é instantânea, não importando o tempo de contato entre ambos.

8. SUMMARY

An inhibitory substance present in leaves of Abutilon striatum reduced the infectivity of tobacco mosaic virus (TMV) when assayed on leaves of Nicotiana glutinosa.

The inhibitory substance presented the following characteristics: it was not dialyzable, it was stable in high temperature and high pH (11). It was retained by active charcoal. The substance was unaffected by treatments to inactivate proteins, and seemed to be a polysaccharide of high molecular weight (5000-10000).

It was unaffected by enzymatic preparations of diastase and pectinase. The ultraviolet spectra showed two characteristic bands: I (260-276nm) and II (310-320nm).

In serological agar double-diffusion tests, the presence of the inhibitor did not interfere with the capacity of reaction between the TMV and its specific antiserum.

The TMV-inhibitor bounds could be disrupted by ultracentrifuging the mixture without loss of activity of any of the components.

Studies on the fine-structure of the complex virus-inhibitor suggested that the virus particles were recovered by the inhibitor which promoted their aggregation, fragmentation and distortion.

At constant TMV-concentration, the percentage of reduction of infectivity was a logarithmic function of inhibitor

concentration. Under the action of a constant inhibitor concentration the reduction of TMV infectivity was inversely proportional to the virus concentration.

The infectivity of TMV was inhibited when inoculated on N. glutinosa, Datura stramonium, Gonphrena globosa, and Phaseolus vulgaris var. "manteiga", but infectivity was not affected when the virus was inoculated on N. tabacum var. "White Burley". The inhibitor also reduced the infectivity of potato X (PVX) on G.globosa, bean yellow mosaic virus (BYMV) on G.globosa and N. tabacum var. "White Burley" and of lettuce mosaic virus (LMV) on G.globosa. The inhibitor did not affect the infectivity of PVX, BYMV, and LMV on N.glutinosa, P.vulgaris var. "Scotia" or "manteiga", and Chenopodium quinoa, respectively.

The inhibitor was ineffective on the infectivity of cucumber mosaic virus (CMV), a Brazilian strain of streak mosaic virus (STMV) and the tomato spotted wilt virus (TSWV) when inoculated on hosts in which local symptoms were developed as well as on hosts in which the symptoms were systemic.

Foliar application of the inhibitor before or after the virus inoculation or application on the opposite side of leaves inoculated with TMV did not react on the TMV.

It acted directly on the virus particles, and "in vitro" reaction was instantaneous, no matter how long the contact between the two.

9. LITERATURA CITADA

- ALLARD, H.A. - 1918 - The mosaic disease of Phytolacca de-
candra. Phytopathology, 8: 51-54.
- BALL, ELLEN M. - 1961 - Serological tests for the identifi-
cation of plant viruses. Committes on Plant Virology.
Am. Phytopath. Soc., pp. 16.
- BAWDEN, F.C. - 1954 - Inhibitors and plant viruses. In:
Advances in Virus Research, 2: 31-57, Ed. K.M. Smith
and M.A. Laufer. Academic Press Inc., New York.
- BAWDEN, F.C. and A. KLECZKOWSKI - 1945 - Protein precipi-
tation and virus inactivation by extracts of strawberry
plants. J. Pomol. Hort. Sci., 21: 2-7.
- BELL, D.J. - 1955 - Mono-and oligossaccharides and mono-
saccharide derivatives. In: Moderne Methoden der
Pflanzenanalyse, Vol. II: 1-54, Ed. K. Paech & M. V.
Tracey, Springer-Verlag, Berlin.
- BENDA, G.T.A. - 1956 - The effect of New Zealand spinach
juice on the infection of cowpeas by tobacco ringspot
virus. Virology, 2: 438-454.
- BLASZCZAK, W., A.F. ROSS and R.H. LARSON - 1959 - The
inhibitory activity of plant juices on the infectivity
of potato virus X. Phytopathology, 49: 784-791.
- CADMAN, C.H. - 1959 - Some properties of an inhibitor of
virus infection from leaves of raspberry. J. Gen.
Microbiol., 20: 113-128.

- COSTA, A.S. - 1955 - Studies on abutilon mosaic in Brazil. *Phytopath. Z.*, 24: 97-112.
- COSTA, A.S. - 1957 - Feijoeiro manteiga, planta-teste para os virus de vira-cabeça e da necrose branca do fumo. *Bragantia*, 16: 45-66.
- CROWLEY, N.C. - 1955 - The effect of seed extracts on the infectivity of plant viruses and its bearing on seed transmission. *Australian J. Biol. Sci.*, 8: 56-67.
- DOOLITTLE, S.P. and M.N. WALKER - 1925 - Further studies on the overwintering and dissemination of cucurbit mosaic. *J. agr. Res.*, 31: 1-58.
- DUGGAR, B.M. and JOANNE K. ARMSTRONG - 1925 - The effect of treating the virus of tobacco mosaic with the juices of various plants. *Ann. Mo. Bot. Gard.*, 12: 359-366.
- EBRAHIM-NESBAT, F. und F. NIENHAUS - 1972 - Beeinflussung von Tabakmosaikvirus- und Gurgenmosaikvirusinfektion durch hemmende Prinzipien in Pflanzenextrakten. *Phytopath. Z.*, 73: 235-250.
- FELDMAN, J. - 1963 - Effet inhibiteur des extraits de semences de piment (Capsicum annuum L.) sur le pouvoir infectieux de quelques virus des plantes. *Ann. Epiphyties*, 14: 377-385.
- FLORES, ELZA; WALKYRIA B.C. MORAES and M. MENEHINI - 1967 - An inhibitory activity of leaf extracts of Abutilon striatum Dicks on the infectivity of abutilon mosaic virus and tobacco mosaic virus. *Arq. Inst. Biol.*, 34: 83-89.

- FRANCKI, R.I.B. - 1964 - Inhibition of cucumber mosaic virus infectivity by leaf extracts. *Virology*, 24: 193-199
- FULTON, R.W. - 1943 - The sensitivity of plant viruses to certain inactivators. *Phytopathology*, 33: 674-682.
- GENDRON, Y. - 1950 - Action des produits du métabolisme d'un champignon sur la multiplication du virus de la mosaïque du tabac et du virus X de la pomme de terre chez le tabac. *Acad. Sciences*, 230: 1890-1891.
- GENDRON, Y. and B. KASSANIS - 1954 - The importance of the host species in determining the action of virus inhibitors. *Ann. Appl. Biol.*, 41: 183-188.
- GRANT, T.J. - 1934 - The host range and behavior of the ordinary tobacco-mosaic virus. *Phytopathology*, 24: 311-335.
- GREENLEAF, W.H. - 1953 - Effects of tobacco-etch virus on peppers (Capsicum sp). *Phytopathology*, 43: 564-570.
- GROHMANN, ADELAIDE A. e MARIA RAPHAELA MUSUMECI - 1970 - Ação inibidora da replicação do TMV (virus do mosaico do fumo) em N.glutinosa por substâncias lançadas por fungos em meio líquido de cultura. *O Biológico*, 35: 164-165.
- GROHMANN, ADELAIDE A. and MARIA RAPHAELA MUSUMECI - 1972 - An inhibitor of tobacco mosaic virus produced by Aspergillus flavus. *Arq. Inst. Biol.*, 39: 69-73.
- GUPTA, B.M. and W.C. PRICE - 1950 - Production of plant virus inhibitors by fungi. *Phytopathology*, 40: 642-652.

- GUPTA, B.M. and W.C. PRICE - 1952 - Mechanism of inhibition of plant virus infection by fungal growth products. *Phytopathology*, 42: 45-51.
- GUPTA, V.K. and S.P. RAYCHAUDHURI - 1972 - Mechanism of inhibition of potato virus Y by extracts from leaves of some woody plants. *Phytopath. Z.*, 73: 256-262.
- HODGSON, W.A. and J. MUNRO - 1966 - An inhibitor of potato virus X in potato plants infected with Phytophthora infestans. *Phytopathology*, 56: 560-561.
- HODGSON, W.A.; J. MUNRO; R.P. SINGH and F.A. WOOD - 1969 - Isolation from Phytophthora infestans of a polysaccharide that inhibits potato virus X. *Phytopathology*, 59: 1334-1335.
- HORNE, R.W.; G.E. RUSSELL and A.R. TRIM - 1959 - High resolution electron microscopy of beet yellows virus filaments. *J. Mol. Biol.*, 1: 234-236.
- JERMOLJEV, EVŽEN and LIANA ALBRECHTOVÁ - 1965 - Research of substances inactivating the virus X in sap from potato leaves. *Biol. Plant.*, 7: 65-73.
- JERMOLJEV, EVŽEN and LIANA ALBRECHTOVÁ - 1966 - Investigation of the virus X inhibitor from potato leaf sap. *Biol. Plant.*, 8: 434-443.
- JOHNSON, J. and ISMÉ A. HOGGAN - 1937 - The inactivation of the ordinary tobacco-mosaic virus by microorganisms. *Phytopathology*, 27: 1014-1027.
- JOHNSON, J. - 1938 - Plant virus inhibitors produced by microorganisms. *Science*, 88: 552-553.

- JOHNSON, J. - 1941 - Chemical inactivation and the reactivation of a plant virus. *Phytopathology*, 31: 679-701.
- KASSANIS, B. and A. KLECZKOWSKI - 1948 - The isolation and some properties of a virus-inhibiting protein from Phytolacca esculenta. *J. Gen. Microbiol.*, 2: 143-153.
- KUNTZ, J.E. and J.C. WALKER - 1947 - Virus inhibition by extracts of spinach. *Phytopathology*, 37: 561-579.
- LOEBENSTEIN, G. - 1962 - Inducing partial protection in the host plant with native virus protein. *Virology*, 17: 574-581.
- LOEBENSTEIN, G.A.D. and A.F. ROSS - 1963 - An extractable agent, induced in uninfected tissues by localized virus infections, that interferes with infection by tobacco virus. *Virology*, 20: 507-517.
- MANN, E.W. - 1969 - Inhibition of tobacco mosaic virus by a bacterial extract. *Phytopathology*, 59: 658-662.
- MAYHEW, D.E. and R.E. FORD - 1971 - An inhibitor of tobacco mosaic virus produced by Phyisarum polycephalum. *Phytopathology*, 61: 636-640.
- McKEEN, C.D. - 1954 - Inhibition of virus infections of certain plants by extracts from Capsicum frutescens L. *Science*, 120: 229.
- McKEEN, C.D. - 1958 - The inhibitory activity of extract of Capsicum frutescens on plant virus infections. *Can. J. Botany*, 34: 891-903.

- MULVANIA, M. - 1926 - Studies on the nature of the virus of tobacco mosaic. *Phytopathology*, 16: 853-871.
- NITZANY, F.E. and S. COHEN - 1960 - A case of interference between alfafa mosaic virus and cucumber mosaic virus. *Virology*, 11: 771-773.
- OLIVEIRA, A.R. de - 1967 - Serologia aplicada ao estudo do vírus do anel do pimentão. Piracicaba, SP. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 40 p. - tese de doutoramento.
- OUCHTERLONY, D. - 1949 - Antigen-antibody reaction in gels. *Akad. Miner. Geol.*, 26-b, 14.
- OUCHTERLONY, D. - 1958 - Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. In: S. Karger, *Progress in allergy*, New York, 5: 1-78.
- PHARMACIA FINECHEMICALS, INC. - 1966 - Sephadex-gel filtration in theory and practice. Uppsala, Sw.
- RAGETLI, H.W.J. and M. WEINTRAUB - 1962a - Purification and characteristics of a virus inhibitor from Dianthus caryophyllus L.I. Purification and activity. *Virology*, 18: 232-240.
- RAGETLI, H.W.J. and M. WEINTRAUB - 1962b - Purification and characteristics of a virus inhibitor from Dianthus caryophyllus L.II. Characterization and mode of action. *Virology*, 18: 241-248.
- SAMUEL, G. and J.G. BALD - 1933 - On the use of the primary lesions in quantitative work with two plant viruses. *Ann. appl. Biol.*, 20: 70-99.

- SCHNEIDER, I.R. - 1953 - Solution of tobacco mosaic virus in the aqueous phase of a chloroform-water emulsion and application of the phenomenon in virus assay. *Science*, 117: 30-31.
- SELA, ILAN and SHALOM W. APPLEBAUM - 1962 - Occurrence of antiviral factor in virus-infected plants. *Virology*, 17: 543-548.
- SELA, ILAN; I. HARPAZ and Y. BIRK - 1964 - Separation of a highly active antiviral factor from virus-infected plants. *Virology*, 22: 446-451.
- SELA, ILAN; I. HARPAZ and Y. BIRK - 1966 - Identification of the active component of an antiviral factor isolated from virus-infected plants. *Virology*, 28: 71-78.
- SILL, W.H.Jr. - 1951 - Some characteristics of a virus inhibitor in cucumber. *Phytopathology*, 41: 32.
- SILL, W.H.Jr. and J.C. WALKER - 1952 - A virus inhibitor in cucumber in relation to mosaic resistance. *Phytopathology*, 42: 349-352.
- SLAGLE, C.W.; SYLVIA WOLCYRZ and W.C. PRICE - 1952 - Inhibition of plant virus infection by growth products of Neurospora. *Phytopathology*, 42: 240-244.
- STEERE, R.L. - 1959 - The purification of plant viruses. *In: Advances in virus research*, 6: 1-73.
- TAKAHASHI, W.N. - 1942 - A virus inactivator from yeast. *Science*, 95: 586-587.

- TAKAHASHI, W.N. - 1946 - Properties of a virus inactivator from yeast. *Science*, 95: 377.
- TASTALDI, H. - 1955 - Prática de química biológica. 1a. parte. Bioquímica analítica qualitativa, 5a. ed. Universidade de São Paulo, 117p.
- THOMSON, A.D. and BARBARA A. PEDDIE - 1965 - Studies on a virus inhibitor from Chenopodium leaves. *N. Zealand J. agric. Res.*, 8: 825-831.
- THRESH, J.M. - 1956 - Some effects of tannic acid and of leaf extracts which contain tannins on the infectivity of tobacco mosaic and tobacco necrosis viruses. *Ann. appl. Biol.*, 44: 608-618.
- van der WANT, J.P.H. - 1951 - Onderzoekingen over anjer-mosaïck. II. With a summary: Investigations on carnation mosaic. II. *Tijdschr. Planteziekten*, 57: 72-74.
- WEINTRAUB, M. and J.D. GILPATRICK - 1952 - An inhibitor in a new host of tobacco ring spot virus. *Can. J. Botany*, 30: 549-557.
- WEINTRAUB, M. and R.S. WILLISON - 1953 - Studies on stone-fruit viruses in cucurbit hosts. III. The effect of cucurbital extracts on infectivity. *Phytopathology*, 43: 328-332.
- WIGGS, D.N. - 1968 - Inhibitory effects of juices of various fungi on tobacco mosaic virus. *Plant Dis. Repr*, 52: 528-529.