



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL

**CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO DO VÍRUS DO MOSAICO
AMARELO DO SALSÃO; (*Apium graveolens* L. var. dulce)**

MARIVAL LOPES DE OLIVEIRA

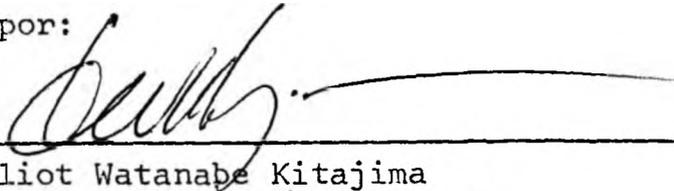
Tese apresentada ao Departamento de Biologia
Vegetal do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade de Brasília como requisito parcial
à obtenção de Grau de Mestre em Ciências
na área de Fitopatologia

BRASÍLIA
1979

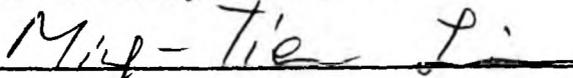
APRESENTAÇÃO

Trabalho realizado junto aos Departamentos de Biologia Vegetal e Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação dos professores Elliot Watanabe Kitajima (Lab. de Microscopia Eletrônica), Ming-Tien Lin e Cláudio Lúcio Costa (Laboratório de Fitopatologia), com apoio institucional da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC).

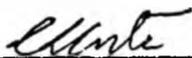
Aprovada por:



Prof.: Elliot Watanabe Kitajima



Prof.: Ming-Tien Lin



Prof.: Cláudio Lúcio Costa

A meus pais pelo sacrifício, irmãos pelo apoio e amigos pelo incentivo, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor E. W. Kitajima pela orientação direta e diária durante a realização deste trabalho, aos professores M. T. Lin e C. L. Costa, pelas contribuições valiosas e prestimosas, fornecendo sugestões inclusive na correção do manuscrito, sempre com atenção e boa vontade.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC).

Ao Dr. R. G. Grogan e K. Kimble da Universidade da Califórnia, Davis, Califórnia, USA, pelo fornecimento do antissoro do WCeMV e pelas sementes das diferentes cultivares de são e salsa.

Aos Funcionários:

Fábio Rocha Fonseca	Estação Biológica
Veleziel Monteiro de Souza	Estação Biológica
João Gonçalves de Carvalho	Estação Biológica
Nestor Bezerra de Lima	Lab. de Fotodocumentação
Zilma Costa Ponciano Ribeiro	Microscopia Eletrônica

A todas pessoas, amigos e instituições que contribuíram na realização deste trabalho.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Quantidade e valor da produção de salsão para o Estado de São Paulo.....	2
Tabela 2: Quantidade e procedência do salsão comercializado na CEASA-DF, 1978.....	3
Tabela 3: Algumas propriedades de vírus já relatados em salsão (<u>Apium graveolens</u> L. var. <u>dulce</u>)....	5
Tabela 4: Efeitos da molaridade e do pH do tampão fosfato na infectividade do VMAS.....	24
Tabela 5: Efeito do armazenamento de folhas de coentro em congelador e câmara fria, sobre a infectividade do VMAS.....	25
Tabela 6: Transmissão do VMAS por <u>Myzus persicae</u> variando o período de aquisição na fonte de inóculo e o número de afídios por plantas.....	27
Tabela 7: Espécies e cultivares de plantas testadas como possíveis hospedeiras do VMAS.....	29
Tabela 8: Efeitos do VMAS sobre cultivares de salsão, em condições de campo.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Sintomas locais e sistêmicos induzidos pelo <u>ví</u> rus do mosaico amarelo do salsão.....	31
Fig. 2: Sintomas foliares sistêmicos e redução de <u>cre</u> cimento em plantas da família Umbelliferae....	33
Fig. 3: Diagrama de distribuição de mensurações de <u>par</u> tículas do vírus do mosaico amarelo do salsão.	34
Fig. 4: Micrografia eletrônica de secções ultrafinas de tecidos de plantas infectadas pelo vírus do mosaico amarelo do salsão.....	36
Fig. 5: Micrografia eletrônica de partículas do <u>ví</u> rus do mosaico amarelo do salsão.....	40
Fig. 6: Espectro de absorção ao ultravioleta de <u>uma</u> preparação purificada do vírus do mosaico ama- relo do salsão.....	42
Fig. 7: Imunodifusão em agar gel com SDS, usando <u>anti</u> soro preparado contra o vírus do mosaico <u>amare</u> lo do salsão.....	43

ÍNDICE GERAL

APRESENTAÇÃO.....	i
DEDICATÓRIA.....	ii
AGRADECIMENTOS.....	iii
ÍNDICE DE TABELAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE GERAL.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
2.1. Fonte de inóculo, isolamento e manutenção do ví- rus.....	8
2.2. Transmissão.....	8
2.2.1. Transmissão mecânica.....	8
2.2.2. Transmissão por afídios.....	9
2.2.3. Transmissão por união de tecidos.....	10
2.3. Propriedades físicas <u>in vitro</u>	11
2.4. Círculo de hospedeiras.....	12
2.5. Estudos através de microscopia eletrônica.....	12
2.5.1. Preparações "leaf dip".....	12
2.5.2. Exame de preparações purificadas.....	13
2.5.3. Exame de secções ultrafinas.....	13
2.6. Exame de material através de microscopia ótica.....	14
2.7. Purificação do vírus.....	14
2.8. Purificação de inclusões.....	17
2.9. Propriedades fisicoquímicas.....	18
2.9.1. Espectrofotometria de luz ultra-violeta... ..	18
2.9.2. Coeficiente de sedimentação.....	18
2.10. Serologia.....	19
2.10.1. Preparo do antissoro.....	19
2.10.2. Testes serológicos.....	19
2.11. Comparação entre cultivares de salsaõ quanto ã susceptibilidade ao VMAS, em condições de cam- po.....	21

2.12. Ocorrência do VMAS em campo no Distrito Federal.....	22
3. RESULTADOS.....	23
3.1. Transmissão do VMAS.....	23
3.1.1. Transmissão mecânica e infectividade.....	23
3.1.2. Transmissão do VMAS por afídeos.....	26
3.1.3. Transmissão por união de tecidos.....	26
3.2. Propriedades físicas <u>in vitro</u>	28
3.3. Círculo de hospedeiras e sintomas.....	28
3.3.1. Círculo de hospedeiras.....	28
3.3.2. Sintomas.....	30
3.4. Microscopia eletrônica.....	32
3.5. Microscopia ótica.....	35
3.6. Purificação do vírus.....	35
3.7. Purificação de inclusões.....	38
3.8. Propriedades fisicoquímicas.....	39
3.8.1. Espectrofotometria de luz ultra-violeta....	39
3.8.2. Coeficiente de sedimentação.....	39
3.9. Serologia.....	41
3.10. Comparação entre cultivares de salsaõ quanto à susceptibilidade ao VMAS, em condições de campo	44
3.11. Ocorrência do VMAS em campo no Distrito Federal	44
4. DISCUSSÃO.....	47
5. RESUMO.....	55
6. SUMMARY.....	57
7. LITERATURA CITADA.....	59

I - INTRODUÇÃO

O salsão ou aipo (*Apium graveolens* L. var *dulce*) é uma hortaliça herbácea, bastante importante nos EUA e Europa. No Brasil, entretanto, sua cultura não se acha muito difundida, embora, o interesse pela mesma, esteja aumentando em decorrência do seu uso pelas indústrias em sopas desidratadas. A produção, referente ao ano de 1978, segundo dados da CEAGESP, atingiu aproximadamente 2.900 toneladas, num valor de cerca de Cr\$ 20.000.000,00, concentrando-se quase toda no cinturão verde de São Paulo (Tabela 1).

O consumo de salsão *in natura* como salada, é ainda limitado, principalmente pelo seu preço, restringindo-se basicamente aos grandes centros urbanos. O Distrito Federal não foge à regra, sendo que a maior parte do salsão consumido é abastecido pela produção local, e quando ocorre escassez, o mercado é suprido pelo produto proveniente de São Paulo (Tabela 2).

Várias doenças de etiologia viral, foram relatadas nesta cultura. A primeira delas foi descrita por Poole (1922), sendo demonstrado posteriormente ser causada por uma estirpe do vírus do mosaico do pepino. Foster & Webber (1924), relataram outra, a qual Wellman (1934), designou de "southern celery mosaic", mais tarde comprovada ser causada também por uma estirpe do vírus do mosaico do pepino. Uma doença com sintomatologia semelhante àquela provocada pelo vírus anterior, foi descrita e denominada por Severin & Freitag (1935), de "western celery mosaic" (WCeMV). Os mesmos autores em 1938, apresentaram evidências de que esses vírus diferiam, entre

Tabela 1. Quantidade e valor da produção de salsão para o Estado de São Paulo.

Ano	Unidade de peso líquido	Preço médio mensal ponderado Cr\$/Unidade	Quantidade		Produção Total em kg	Valor da Produção Total (Cr\$)
			Média Mensal	Total		
1974	Maço (6 kg)	15,87	27.191	336.289	2.017.734	5.336.906,40
1975	"	13,45	37.417	449.005	2.694.030	6.039.117,20
1976	"	30,93	24.188	290.254	1.741.524	8.977.556,20
1977	"	26,57	37.249	446.996	2.681.976	11.876.683,00
1978	"	40,73	39.350	472.208	2.833.248	19.233.031,00

Fonte: CEAGESP (Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo). Boletins anuais de 1974, 1975, 1976, 1977 e 1978.

Tabela 2. Quantidade e procedência do salsão comercializado na CEASA - DF, 1978.

Procedência	Quantidade (kg)
Núcleo Bandeirante	335
Riacho Fundo	3.966
Vargem Bonita	250
Alagado	17.067
Monjolo	686
Ponte Alta	450
Vargem da Benção	310
Distrito Federal (Total)	23.058
Estado de São Paulo	1.850
T O T A L	24.908*

Fonte: CEASA - DF (Central de Abastecimento — Distrito Federal). Mapa anual, 1978.

* Quantidade equivalente a Cr\$ 358.420,00.

si, em termos de círculo de hospedeiras. O "western celery mosaic virus" infectava basicamente plantas da família Umbelliferae, entre elas, algumas de importância econômica, como a cenoura (*Daucus carota* L.), salsa (*Petroselinum sativum* Hoff.), coentro (*Coriandrum sativum* L.), além do salsão (*Apium graveolens* L. var. *dulce*), ao passo que o "southern celery mosaic virus", possuía um círculo de hospedeiras bastante amplo.

A partir de então, vários outros vírus têm sido relatados em salsão, conforme pode-se observar pela Tabela 3.

Dentre os diversos vírus que infectam o salsão, talvez o de maior importância seja o "western celery mosaic virus" ou "Celery mosaic virus" (CeMV) (Shepard & Grogan, 1971), a julgar pelas perdas apreciáveis que induz na produção (Severin & Freitag, 1938; Kemp & Frowd, 1975; Bôs *et al.*, 1978). Parece ter sua distribuição geográfica bastante ampla, pois vírus com propriedades semelhantes ao CeMV, têm sido descritos em vários estados dos EUA (Severin & Freitag, 1935; 1938; Purcifull & Shepard, 1967), e em outros países como Inglaterra (Walkey *et al.*, 1970; Walkey & Cooper, 1971; Pemberton & Frost, 1974), Alemanha (Brandes & Luisoni, 1966) Nova Zelândia (Fry & Procter, 1968), Argentina (Gracia & Feldman, 1977), Canadá (Kemp & Frowd, 1975), França (Marchoux *et al.*, 1969), além de outros países.

O WCeMV (CeMV) pertence ao grupo potyvirus, induzindo inclusões lamelares, embora, relação serológica no reconhecimento de membros deste grupo, não tenha sido demonstrada. É inativado à temperatura ambiente entre 4 e 6 dias e o armazenamento a 18°C até 18 meses, não inativou-o (Severin & Freitag, 1938). O ponto final de diluição fica entre 10^{-3} e 10^{-4} , e o ponto termal de inativação entre 55-60°C quando aquecido por 10 minutos (Severin & Freitag, 1938; Shepard & Grogan, 1971; Smith, 1972). É transmitido por inoculação mecânica e de maneira não circulativa por várias espécies de afídios, entre elas, *Aphis ferrugina-striata*, *A. graveolens*, *A. apii*, *A. middletonii*, *A. gossypii*, *Myzus persicae*, *M.*

Tabela 3. Algumas propriedades de vírus já relatados em salsão (*Apium graveolens* L. var. *dulce*)

Vírus	Morfologia	Propriedades Físicas "in vitro" (a)			Transmissão (b)			Grupo*	Referência
		p.t.i.	p.f.d.	l.i.v.	mec.	vet.	sem.		
Sugar beet curly top	Ø 20 nm	75-80°C	10 ⁻³ - 10 ⁻⁴	14 dias	-	C ^(c)	-	Gemini	(4)
Spotted wilt	Ø 70-90 nm	40-46°C	10 ⁻² - 10 ⁻¹	2-4 hs.	+	Th	+	Tospo	(4)
Celery crinkle-leaf (estirpe do WCeMV)	Alongado, flexível	55-60°C	10 ⁻²	3-4 hs.	+	Ap	-	Poty	(4) e (7)
Poison-hemlock ringspot					+	Ap	-	Poty	(4) e (7)
Celery yellow spot		55° C	5 x 10 ⁻¹	6-8 hs.	+	Ap	-		(4) e (9)
Celery calico									(4) e (5)
Celery pseudo-calico		70° C	10 ⁻³	5 dias	+		-		(5)
Alfafa mosaic	Bacil. 36, 48,58x18 nm	60-65°C	10 ⁻³ - 10 ⁻⁴	3-5 dias	+	Ap	+	Almo	(6) e (9)
Tomato black-ring (Celery yellow-vein)	Ø 30 nm	58-62°C	10 ⁻² - 10 ⁻³	7 dias	+	Ne	+	Nepo	(8)
Celery Yellow net		45° C	10 ⁻² - 10 ⁻³	48 hs	+		-		(9)
Celery ringspot		65° C	5 x 10 ⁻²	24 hs	+		-		(7) e (9)
Tomato aspermy	Ø 38 nm	50-55°C	10 ⁻³ - 10 ⁻⁴	24-48 hs	+	Ap	+	Cucumo	(9)
Celery latent	860 x 15 nm	52-54°C	10 ⁻⁴ - 10 ⁻⁵	10-11 dias	+	Ap	+	Poty	(10) e (11)
Southern celery mosaic (est.do cucumber mos)	Ø 30 nm	65-70°C	10 ⁻⁴ - 10 ⁻⁵	3 - 6 dias	+	Ap	-	Cucumo	(1) e (2)
Western celery mosaic (= Celery mosaic)	760-784 nm	55-60°C	10 ⁻³ - 10 ⁻⁴	6 dias	+	Ap	-	Poty	(3) e (4)

(1) Foster & Webber, 1924; (2) Wellman, 1934; (3) Severin & Freitag, 1935; (4) Severin & Freitag, 1938; (5) Freitag & Severin, 1939; (6) Snyder & Rich, 1942; (7) Freitag & Severin, 1945; (8) e (9) Hollings, 1960 e 1964; (10) Luisoni, 1966; (11) Bős *et.al.*, 1978.

(a) p.t.i. = ponto termal de inativação; p.f.d. = ponto final de diluição; l.i.v. - longevidade *in vitro*.

(b) mec = mecânica; vet = vetor; sem. = semente.

(c) C = cigarrinha; Ap = afídio; Th = trips; Ne = Nematóide

* FENNER, F. Classification and nomenclature of viruses. International Committee on Taxonomy of viruses, 1976.

circunflexus, *M. convolvuli*; *Cavariella caprae* e *Rhopalosiphum melliferum* (Severin & Freitag, 1938). Estudos através de microscopia eletrônica, mostraram que o vírus era constituído de partículas filamentosas flexíveis com comprimento normal entre 760-784 nm (Purcifull & Shepard, 1967; Shepard & Grogan, 1967a) e centro ôco (Shepard & Grogan, 1967a). Em 1967, Shepard & Grogan, purificaram-no parcialmente, através de um método envolvendo extração em 0,5 M de tampão borato, pH 8,7, clarificação do suco com clorofórmio e concentração por centrifugação diferencial seguida por centrifugação em gradiente de densidade.

No Brasil, o único vírus relatado em salsa, é aquele que provoca o mosaico amarelo, e designado de vírus do mosaico amarelo do salsa (VMAS), tendo sido encontrado no Estado de São Paulo (Kitajima & Costa, 1968a), onde foram realizados estudos através de microscopia eletrônica mostrando que suas partículas são alongadas e flexíveis com comprimento normal de 760 x 15 nm. Partículas com esta morfologia foram visualizadas em exsudatos de salsa, coentro, uma espécie de salsa silvestre (*Apium* sp), além de *Chenopodium quinoa* Willd. Ao examinarem-se secções da epiderme inferior de folhas das espécies acima, mostrando sintomas típicos de infecção, pode-se observar a presença de inclusões intranucleares fibrosas, alongadas e refringentes, usualmente formando figuras anelares e acompanhando a periferia do núcleo. Ao microscópio eletrônico, confirmou-se a localização intranuclear de tais inclusões (Kitajima & Costa, 1968b). Através de estudos citoquímicos (Cruz *et. al.*, 1972), ficou demonstrado que tais partículas intranucleares eram constituídas de proteínas, mas não amido, lipídios ou ácidos nucléicos. Trabalhos sobre patologia, foram adicionalmente realizados por A.S. Costa na Secção de Virologia do Instituto Agronômico de Campinas (Costa, comunicação pessoal). Segundo Kitajima e Costa (1968), este vírus seria morfologicamente similar a um vírus que induz mosaico em salsa na Alemanha e ao "western celery mosaic vírus", acrescentando que se os mesmos não fossem idênticos, provavelmente fariam parte de um mesmo complexo.

Como as informações referentes a este vírus, a té o presente, restringem-se aos aspectos mencionados anteriormente, pretende-se com este trabalho, fornecer dados adicionais que possam melhor caracterizar o VMAS, no que se refere aos aspectos de transmissão e infectividade, círculo de hospedeiras, propriedades físicas *in vitro*, estudos através de microscopia ótica e eletrônica, purificação, produção de antissoro e testes serológicos, e de posse desses dados fazer um estudo comparativo com aqueles citados para o WCeMV, visando determinar uma possível identidade ou relacionamento entre ambos vírus.

Relata-se também a ocorrência natural do VMAS em culturas de salsa e salsão no Distrito Federal.

II - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Fonte de inóculo, isolamento e manutenção do vírus

O isolado do VMAS utilizado neste ensaio, foi obtido de uma amostra de salsão (*Apium graveolens* L. var. *dulce* 'Dourado') proveniente do Estado de São Paulo, coletado na CEASA - DF, apresentando sintomas típicos de mosaico amarelo, com deformação foliar. Ensaio preliminares de transmissão e microscopia eletrônica, mostraram que tinha propriedades idênticas às descritas para o VMAS (Costa, dados não publicados; Kitajima & Costa, 1968a).

Procedeu-se a purificação biológica do isolado através de duas inoculações sucessivas em *Chenopodium quinoa* Willd., tomando sempre lesão única, reinfectando plantas de coentro (*Coriandrum sativum* L.) e salsão, as quais serviram como fonte de manutenção do vírus, através de periódicas transferências, por inoculações mecânicas, para plantas jovens sadias.

2.2. Transmissão

2.2.1. Transmissão mecânica

Este tipo de transmissão foi utilizado nos testes de rotina, através da maceração em almofariz, do tecido foliar infectado, em presença de tampão fosfato 0,02 M, pH 7,5, adicionando como antioxidante 0,1% de sulfito de sódio (Na_2SO_3),

na proporção de 1 g de tecido para 10 ml de tampão. Como abrasivo utilizou-se carborundum (500 mesh) polvilhado sobre a superfície foliar e com o dedo indicador procedia-se a fricção do inóculo, após o que, as folhas eram lavadas em água corrente.

Diferentes níveis de concentração de 0,001 a 0,2 M e pH do tampão de 6,5 a 8,0, foram testados visando de terminar seus efeitos sobre a infectividade do vírus.

As plantas utilizadas neste e em experimentos ' posteriores, foram produzidas em sementeiras com solos esterilizados e adubados e em seguida, repicadas para vasos de alumínio de 15 x 15 cm, também devidamente adubados.

Os experimentos foram conduzidos na Estação Biológica da Universidade de Brasília, em casa-de-vegetação, sem ' no entanto, apresentar condições de temperatura e umidade controladas.

A temperatura média ambiente variou entre 18 a 41°C no período, registrada em termôgrafo marca Tempscribe (Bocarach Instrument Company, . Pittsburgh, Pa. U.S.A.

2.2.2. Transmissão por afídios

Duas espécies de afídios, *Myzus persicae* Sulz. e *Aphis fabae solanella* Theob., foram utilizadas em testes para se verificar a capacidade de transmitirem o VMAS.

As colônias de *M. persicae* e de *A. fabae* foram coletadas respectivamente em Cruciferae e maria **pretinha** (*Solanum nigrum* L.) sendo mantidas sobre plantas de rabanete (*Raphanus sativus* L.), no primeiro caso, e maria pretinha, no caso da segunda espécie, conservando-as em gaiolas com armação de ferro de 80 x 80 x 50 cm, revestidas com tela plástica, para serem utilizadas nos testes de transmissão.

Os testes foram realizados em casas teladas com cobertura de telhas plásticas, sem controle de temperatura e umidade. Os afídios não virulíferos foram transferidos para plantas de salsaõ infectadas com o VMAS, alimentando-se nestas por 1, 3, 10, 60 minutos e 24 e 48 horas (período de aquisição), após os quais, foram transferidos em número de 1, 3 e 9 afídios para cada uma de quatro plantas de coentro, em cada tratamento, alimentando-se durante 60 minutos, nos 4 primeiros e 24 e 48 horas nos dois últimos tratamentos, após o que, foram eliminados através de pulverizações com Mevinphos (24% de fosfato de 2-carboxi-1-metil-vinil-dimetil) a 0,25%.

Testes posteriores foram realizados transferindo afídios não virulíferos inicialmente para placas de petri com papel de filtro úmido, onde permaneceram por um período de 60 minutos (período de jejum), após o qual, foram transferidos para plantas de salsaõ infectadas com o VMAS. Nestas, os pulgões permaneceram durante 30 minutos (período de aquisição), tendo sido a seguir transferidos individualmente, com auxílio de pincel fino, em número de 10, para cada uma de 10 plantas de coentro. Seguiu-se um período de alimentação de 30 minutos, sendo em seguida os afídeos eliminados através de pulverizações com Mevinphos na dosagem recomendada anteriormente, e as plantas mantidas em casa-de-vegetação para posteriores observações. Como controle, foram deixados iguais números de plantas, em ambos testes, com os afídios sendo transferidos diretamente, sem acesso à fonte de inóculo.

2.2.3. Transmissão por união de tecidos.

Plantas de salsaõ e coentro obtidas em sementeiras e transplantadas para vasos de alumínio, foram infectadas experimentalmente, num estágio de desenvolvimento de 4-6 folhas, por inoculação mecânica, visando serem utilizadas em testes de transmissão por união de tecidos. Para isso, utilizou-se o método de "garfagem", no qual plantas sadias das duas espé-

cies acima, em idêntico estágio de desenvolvimento, foram usadas como porta-enxertos, seccionando o pecíolo ou a haste a serem enxertados, no sentido transversal e longitudinal, e introduzindo o pecíolo ou haste da planta infectada, previamente cortado em bisel, no porta enxerto. Utilizou-se uma fita plástica de 1 cm de largura para isolar a área enxertada. O conjunto foi então coberto com saco plástico por 5 a 6 dias.

Além da enxertia por garfagem, utilizou-se o método de "encostia por mamadeira", através do contato dos tecidos infectado e sadio, previamente seccionados tangencialmente, e isolados com fita plástica de 1 cm de largura, após o contato dos mesmos. Outra tentativa foi realizada cortando longitudinalmente o pecíolo da planta sadia e introduzindo uma seção do tecido infectado, submetendo a condições de isolamento, como descrito para os casos anteriores.

Durante um período de 25 a 30 dias, com as plantas mantidas em casa-de-vegetação, foram feitas observações frequentes.

2.3. Propriedades físicas "in vitro"

Na determinação das propriedades físicas do VMAS em suco de plantas, utilizaram-se como fonte de inóculo, folhas de coentro, infectadas de acordo com o método de inoculação mecânica descrito anteriormente.

Para determinar a longevidade *in vitro* (l.i.v.) e ponto termal de inativação (p.t.i.), utilizou-se a proporção de 1 g de tecido para 4 ml de tampão. Desta forma, para o p.t.i., eram distribuídos 3 ml de suco em tubos de ensaio de 10 x 1 cm, mergulhando-os em banho-maria em temperaturas variando entre 45 e 70°C, a intervalos de 5°C, por um período de 10 minutos, após o qual, os tubos eram mergulhados em gelo fundente, procedendo-se a inoculação mecânica logo a seguir.

Para se avaliar a longevidade *in vitro*, distribuíram-se da mesma forma, 3 ml de suco em frascos de vidro de

4 ml, vedados com tampa de borracha e fita adesiva, conservando-os a duas diferentes temperaturas, 4-5°C e ambiente (25-26°C), por períodos de tempo de 1 a 23 dias, no primeiro caso, e de 1 a 10 dias para a temperatura ambiente, fazendo inoculações diárias. Para a determinação do ponto final de diluição (p.f.d.) foram feitas diluições de 1×10^{-1} a 1×10^{-7} em tubos de ensaio.

A avaliação da infectividade foi efetuada através da inoculação mecânica dos sucos em *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn.

2.4. Círculo de hospedeiras

Na determinação do círculo de hospedeiras do VMAS, foram feitas inoculações mecânicas em várias plantas, utilizando-se como fonte de inóculo, plantas de coentro infectadas pelo VMAS, mantendo como controle plantas não inoculadas. Além disso, foram feitos testes de recuperações em *C. amaranticolor* e coentro, 15 dias após a inoculação das referidas plantas.

2.5. Estudos através de microscopia eletrônica.

2.5.1. Preparações "leaf dip"

A detecção de eventuais partículas virais foi tentada em preparações "leaf dip", conjugadas à construção negativa (Kitajima, 1965), tendo sido examinados, além do material de salsão original, plantas de salsa (*Petroselinum sativum* Hoffm.), salsão, *C. quinoa* e *C. amaranticolor*, com sintomas típicos de infecção, após serem inoculadas mecanicamente, por enxertia ou por afídios.

A determinação do comprimento normal das partículas de VMAS foi feita em partículas encontradas em coentro,

usando-se como padrões, o vírus S da batata (Wetter, 1971) ou o vírus latente da couve (Kitajima *et. al.* 1970) ambos com comprimento normal de 650 nm. As preparações eram fotografadas a 10.000 x em sequência, e as mensurações feitas nos negativos ampliados 10 x.

2.5.2. Exame de preparações purificadas

O controle do grau de pureza das preparações purificadas foi também feito ao microscópio eletrônico, pelo método da contrastação negativa (Brenner & Horne, 1959), usando silicotungstato de sódio como contrastante (Wrigley, comunicação pessoal). Para tal, uma gotícula das suspensão era transferida para uma telinha de cobre, 200 mesh, coberta com Formvar/Carbono. Após cerca de 1 minuto o excesso do líquido era removido, esperando-se que a preparação secasse. A telinha era lavada a seguir com água destilada, adicionando-se uma gota do contrastante. Após 30 segundos removia-se o excesso do líquido, deixando secar a preparação e examinando-a ao microscópio eletrônico (JEOL JEM 100 C).

2.5.3. Exame de secções ultrafinas

A análise das alterações celulares induzidas pelo VMAS foi feita através de exame de secções ultrafinas. Fragmentos foliares de plantas afetadas foram fixados com glutaraldeído 3% em tampão fosfato 0,05 M pH 7,2 por 1 a 2 horas, lavados com tampão fosfato 0,15 M, e prefixados com OsO_4 1% em tampão fosfato 0,15 M, durante 1 hora. A inclusão foi feita em Epon ou meio de Spurr, e as secções obtidas em ultramicrotomo Porter Blum MT-1 ou LKB Ultratome III, dotado de navalha de diamante Du Pont. As secções foram metalizadas com acetato de uranila e citrato de chumbo, antes de serem examinadas ao microscópio eletrônico.

2.6. Exame de material através de microscopia ótica

Tentativas de detecção ao microscópio de luz de algumas alterações celulares, foram também feitas, utilizando-se epiderme de coentro, salsa e salsa segundo o método de Christie (1967).

Secções da epiderme foram removidas da face inferior da folha e colocadas em contato com uma solução constituída de água, "calcomine orange" 5%, "luxol brilliant green" 1% na proporção de 1:1:8, respectivamente, permanecendo nesta solução por 15 minutos, em seguida lavadas ligeiramente em etanol, montadas em água na lâmina e examinadas ao microscópio de luz.

2.7. Purificação do vírus

Plantas de coentro propagadas em casa-de-vegetação, foram utilizadas na multiplicação sistêmica do VMAS, através de inoculações mecânicas num estágio de 6-8 folhas. O material para a purificação foi coletado de 10-14 dias após a inoculação. Todos os trabalhos possíveis durante as várias etapas de purificação, realizaram-se em câmara refrigerada (10-18°C), tendo-se o cuidado de resfriarem-se os materiais utilizados (vidrarias, reagentes, etc) antes do seu uso. As centrífugas Beckman modelo L5-50 e Sorvall RC-5, foram utilizadas nas altas e baixas centrifugações, respectivamente.

Várias tentativas de purificação foram efetuadas através dos métodos de Tomlinson & Ward (1978), Shepard & Grogan (1967a) e de um método desenvolvido neste trabalho, com variações em algumas etapas de conformidade com o método empregado.

Assim, na extração, foram usados tampões: fosfato 0,5 M, pH 7,6; solução de 0,165 M de Na_2HPO_4 e 0,018 M

de Na-citrato, pH 8,6; borato 0,5 M pH 8,7. Como antioxidante 2-mercaptoetanol (2-ME) a 0,1% ou 0,5%, como desagregantes, uréia a 0,5 M e sódio etileno diamino tetracetato (Na-EDTA) a 0,001 M e Triton X-100 a 1% (Fulton, 1974).

Na clarificação do suco utilizaram-se fosfato de cálcio (Gel de fosfato) (Veerisetty & Brakke, 1978), n-butanol 8% (v/v) ou clorofórmio na proporção de dois volumes por volume de suco.

Na concentração, foram usados os métodos de ultracentrifugação ou precipitação com polietileno glicol (PEG, p.m. 6.000) a 6% (w/v) e 0,1% de NaCl, com agitação por duas horas.

Os tampões citrato 0,05 M, pH 6,5; borato 0,02 M, pH 7,6; solução de 1/10 de volume de 0,165 M de Na_2HPO_4 e 0,018 M de Nacitrato com ou sem 1% de Triton X-100; 0,005 M de Tris-HCl, pH 7,5, foram usados na ressuspensão do vírus.

Nas purificações de rotina, utilizou-se o seguinte método básico:

Após o tecido ser homogeneizado em liquidificador com solução de 0,165 M de Na_2HPO_4 e 0,018 M de Na-citrato contendo 0,5% de 2-ME (Tampão I) na proporção de 2 ml por grama de tecido, o homogenado foi filtrado em gaze e clarificado com n-butanol 8% (v/v) com agitação por 1 hora, ou com fosfato de cálcio (Gel de Fosfato), formado pela adição lenta e simultânea de um décimo (1/10) de volume de 0,2 M de Na_2HPO_4 , e um centésimo (1/100) de 1 M de CaCl_2 , com agitação constante durante 1 hora (10-18°C), centrifugando-se a 4.000 rpm por 10 minutos. O Precipitado foi ressuspendido em tampão fosfato 0,1 M contendo 0,5 de 2-ME, conservando-o em câmara fria (10-18°C), por uma noite, com leve agitação destinando-se à purificação de inclusões. Centrifugou-se o sobrenadante a 30.000 rpm em rotor tipo 30 por 90 minutos, ressuspendendo-se o precipitado em tampão II (diluição de 1/10 do Tampão I contendo 1% de Triton X-100), agitando uma noite e centrifugando-o a 4.000 rpm (Rotor GSA) por 10 minutos. Descartou-se o precipitado, centrifugando o sobrenadante a

30.000 rpm em rotor 30 por 90 minutos, ressuspendendo a seguir o precipitado em tampão III (diluição de 1/10 do tampão I) agitando 30 minutos e centrifugando a 3.000 rpm (rotor SS-34) por 10 minutos, submetendo o sobrenadante resultante à centrifugação em gradiente de densidade de sacarose' (Brakke, 1960), preparado, distribuindo-se 7, 7, 7, e 4 ml de solução de sacarose em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0, nas concentrações respectivas de 10, 20, 30 e 40%, em tubos do rotor SW 25.1, mantendo-os em repouso por uma noite em câmara fria.

Distribuíram-se 2 ml da preparação parcialmente purificada em cada tubo e centrifugou-se a 25.000 rpm em rotor SW25.1 durante 90 minutos. Utilizando-se um feixe de luz emitido por uma lupa em sala escura, foi feita a leitura, e a medida das bandas efetuadas com régua milimetrada, recolhendo-as com aparelho hipodérmico adaptado com mangueira plástica, de diâmetro reduzido. O material recolhido foi diluído em igual volume de tampão III e concentrado a 50.000 rpm, em rotor tipo 65, por 90 minutos. O precipitado resultante foi ressuspendido em tampão III e centrifugado a 2.000 rpm em rotor SS-34 por 5 minutos, guardando-o em geladeira (4°C).

Tentou-se também a recuperação do vírus do precipitado formado após a clarificação e com Gel de Fosfato após centrifugação a 7.000 rpm, através da ressuspendição em tampão 0,1 M de fosfato com 0,5% de 2-ME e 0,5 M de uréia, agitando por 2 horas em câmara fria e centrifugando a 4.000 rpm em rotor GSA durante 10 minutos. Recuperou-se o sobrenadante, procedendo-se de maneira idêntica à descrita acima.

A avaliação do grau de pureza da preparação foi efetuada ao microscópio eletrônico e a infectividade verificada através de inoculações mecânicas em Chenopodium amaranticolor, com contagem do número médio de lesões locais por folha.

2.8. Purificação de inclusões

A purificação de inclusões foi efetuada baseando em procedimento descrito por Hiebert & McDonald (1973), com algumas modificações. A ressuspensão do precipitado da primeira baixa centrifugação do método de purificação do vírus, que permaneceu agitando por uma noite em câmara fria, foi tratada com 5% de Triton X-100 com agitação por duas horas, após o que, foi centrifugado a 7.000 rpm em rotor GSA durante 20 minutos. O precipitado resultante foi ressuspenso em tampão fosfato 0,02 M com 0,1% de 2-ME, agitando-se durante 2 horas (10-18°C), centrifugando a 7.000 rpm em rotor GSA durante 15 minutos. Resuspendeu-se o precipitado em 50 ml do tampão usado na etapa anterior, agitando por 50 minutos (10-18°C). Centrifugou-se a 900 rpm em rotor GSA durante 5 minutos, recuperando o sobrenadante e centrifugando no mesmo rotor a 7.000 rpm durante 20 minutos, descartando o sobrenadante e ressuspendendo o precipitado em 20 ml de tampão fosfato 0,02 M com 0,1% de 2-ME, e agitando por uma noite (10-18°C). Após centrifugado a 1.300 rpm em rotor SS-34 por 5 minutos, o sobrenadante resultante foi centrifugado a 7.000 rpm (rotor SS-34), durante 20 minutos, ressuspendendo o precipitado em 4,5 ml de tampão fosfato 0,02 M com 0,1% de 2-ME, submetendo-o em seguida à centrifugação em gradiente de densidade de sacarose a 23.000 rpm, por 1 hora em rotor SW 25.1. O gradiente foi preparado utilizando 10 ml de cada das soluções de sacarose a 40 e 80% em água destilada. As inclusões que localizavam-se na interface foram coletadas com aparelho hipodérmico adaptado para esta finalidade. O material coletado foi diluído em idêntico volume de água destilada, centrifugando em rotor SS-34 a 8.000 rpm durante uma hora. Descartou-se o sobrenadante, ressuspendendo o precipitado em água destilada e examinando-o ao microscópio eletrônico.

2. 9. Propriedades fisicoquímicas

2.9.1. Espectrofotometria de luz ultra-violeta.

A concentração do vírus em preparações purificadas, foi aferida em espectrofotômetro de luz ultra-violeta , Spectronic 200 UV (Shimadzu Seisakusho, LTD., Kyoto, Japan), medindo a absorvância a 260 nm e assumindo um coeficiente de extinção para esse vírus de 3/mg/ml/cm, e o conteúdo de ácido necléico foi avaliado utilizando a relação $A_{280/260}$, segundo procedimento descrito por Layne (1957).

2.9.2. Coeficiente de sedimentação

O coeficiente de sedimentação do VMAS foi determinado, de conformidade com procedimento descrito por Brakke (1958), depositando-se 1 ml do VMAS purificado (0,391 mg) e como padrão, igual quantidade de TMV (1 ml), separadamente, em tubos de rotor SW 25.1, cujo gradiente foi preparado, distribuindo-se 3, 7, 7, 7 e 4 ml de solução de sacarose em tampão fosfato 0,01 M, pH 7 , nas concentrações respectivas de 0, 10, 20, 30 e 40%, centrifugando-se a 24.000 rpm em rotor SW 25.1, durante 2 horas, na centrífuga Beckman modelo L-50. A leitura dos resultados foi efetuada com o uso de uma lupa em sala escura, e as distâncias inferior e superior das bandas ao menisco, para ambos vírus, foram tomadas com o auxílio de régua milimétrica, usando a média dos valores encontrados, na estimação do coeficiente de sedimentação do VMAS.

2.10. Serologia

2.10.1. Preparo do antissoro

Visando a produção de antissoro contra o VMAS, foram feitas injeções do vírus purificado, em coelho de cor preta, do sexo feminino, pesando aproximadamente 3 kg.

Foram efetuadas 3 injeções a intervalos de 5 dias, injetando-se 0,586; 0,51 e 0,56 mg, respectivamente de vírus purificado. A primeira injeção foi efetuada de forma intravenosa, seguida por outras duas intramusculares, com o antígeno emulsificado em igual volume de adjuvante incompleto Freund (Difco Lab. Detroit, Mich., U.S.A.).

Efetuaram-se 4 sangrias, a primeira, 20 dias após a injeção inicial, e as outras 30, 40 e 50 dias, através de punções no coração, recolhendo em cada vez, 15-20 ml de sangue, em tubos de centrífuga (30 ml). O sangue foi mantido à temperatura ambiente (26°C) por 1 hora, e o coágulo descolado da parede do tubo, com bastão de vidro, e conservado à 10-18°C durante 24 horas. Centrifugou-se a 5.000 rpm em rotor SS-34, por 10 minutos, recolhendo a fase líquida, em frascos de vidro com tampa plástica, acrescentando-se 2 gotas de Na-azida a 2% como preservativo, e conservando-o em congelador (- 7°C).

2.10.2. Testes serológicos

Nesse trabalho, utilizou-se o método de dupla difusão em agar gel durante os testes serológicos.

O agar gel originalmente relatado por Gooding & Bing (1970) constituído de 0,8% de agar nobre (Difco Labs.), 0,5% de sódio dodecyl sulfato (SDS) (Sigma Chemical

Co., St. Louis, Mo., U.S.A.), e 1% de azida de sódio (Sigma Chemical Co.), foi preparado de acordo com o método de Purcifull & Batchelor (1977), adicionando 2 g de agar nobre em 150 ml de água destilada, autoclavando a 120°C por 5 minutos. Após a autoclavagem, adicionaram-se 2,5 g de azida de sódio dissolvida em 25 ml de água destilada, completando o volume para 250 ml pela adição de 1,25 g de SDS dissolvidas em 75 ml de água destilada quente. O agar gel, foi distribuído em placas de vidro (16 ml/placa) previamente tratadas com 0,1% de Formvar em clorofórmio, e após a solidificação do mesmo, as placas foram colocadas em sacos plásticos e mantidas em câmara fria, para usos posteriores.

As placas com agar gel foram perfuradas em orifícios de 5 mm de diâmetro, consistindo de um central, circundado por outros seis de igual diâmetro e distanciados de 4 mm, segundo esquematização pré-estabelecida.

Utilizando-se como antígenos, suco de coentro e de diferentes cultivares de salsão, tanto sadios quanto infectados e vírus purificado, sem tratar ou tratados nas concentrações finais de 0,5; 1,0 ou 1,5% de SDS, foram efetuados testes para se verificar as condições ótimas das reações serológicas, testando-se como controle, soro normal. Por outro lado, extratos de plantas de coentro e salsão infectadas com o VMAS foram usados em testes com o antissoro produzido contra o WCeMV, fornecido pelo Dr. R. Grogan e Sr. K. Kimble da Universidade da California, Davis, California, U.S.A. Da mesma forma que materiais de salsão e salsa coletados em condições de campo no Distrito Federal, com suspeita de estarem infectados com o VMAS, foram testados tanto contra o antissoro produzido para este vírus, quanto para o do WCeMV.

Na determinação do título do antissoro contra o VMAS e contra a proteína normal da hospedeira, foram feitas diluições até 1:16 do antissoro em albumina de ovo a 5% (Calbiochem, San Diego, California, U.S.A.), dissolvida em solução salina (0,85% de NaCl). Os antígenos utilizados, foram preparados através da maceração de 1 g dos tecidos infectado ou sadio, em 1 ml de solução de SDS a 3%, filtrando-os em gaze. Quando se usou vírus purificado, adicionou-se igual volume de solução de SDS a 3%.

Os antígenos foram distribuídos no orifício central e as diluições do antissoro nos periféricos.

As placas foram mantidas em câmara úmida à temperatura ambiente, e as leituras efetuadas a partir de 2 horas, com auxílio de uma fonte de luz refletida na parte inferior das mesmas.

2.11. Comparação entre cultivares de salsão quanto à susceptibilidade ao VMAS, em condições de campo.

Plantas de cultivares 'Florida 2-14', 'Florida 683 strain K' e 'Tall Utah 52-70 strain R e H', foram produzidas em sementeiras e transplantadas para vasos de alumínio em casa-de-vegetação, inoculando-as mecanicamente num estágio de desenvolvimento de 4-6 folhas, utilizando-se como fonte de inóculo plantas de coentro, comprovadamente infectadas. As plantas foram mantidas sob estas condições por um período de 30 dias, após o qual foram transplantadas para o campo, no espaçamento de 0,50 x 0,50 m, em canteiros de 2,0 x 2,0 m, com 4 linhas por canteiro, submetendo-as a idênticos tratamentos, como sejam: utilização do mesmo tipo de solo, uniformidade na irrigação e adubação, e adubações semanais complementares, por cobertura, com o adubo "Ouro Verde", na dosagem recomendada de 6 g por litro de água. Um número igual (6 plantas) de plantas de cada cultivar foi deixado como controle.

A avaliação dos resultados foi efetuada 130 dias após o transplante para o campo, através da pesagem das plantas sadias e das infectadas, cortadas 2 cm do coleto, severidade dos sintomas e ensaio de infectividade em *C. quinoa* Willd., pela contagem do número médio de lesões locais por folha.

2.12. Ocorrência do VMAS em campo no Distrito Federal

Efetuaram-se diversas amostragens em núcleos rurais do Distrito Federal, visando verificar a incidência do VMAS em condições de campo. Para isso, coletaram-se diversas amostras de Umbelliferae, com suspeita de estarem infectadas com o vírus. A detecção foi feita através de testes de dupla difusão em agar gel, bem como, por meio de ensaios de infectividade em coentro e em *C. amaranticolor* e por meio de microscopia eletrônica.

3. RESULTADOS

3.1. Transmissão do VMAS

3.1.1. Transmissão mecânica e infectividade.

Além do isolado inicial do vírus, utilizado neste ensaio, outros isolamentos foram testados, em diferentes oportunidades, de salsão obtidos em diferentes fontes, usualmente procedentes de São Paulo. Em algumas ocasiões, contudo, o VMAS foi recuperado de salsa e salsão cultivados no Distrito Federal e, em todos os casos, os resultados foram bastante semelhantes.

O VMAS foi facilmente transmitido, mesmo quando se variou o pH do tampão fosfato desde 6,5 a 8,0, e a molaridade de 0,001 a 0,2 M. No entanto, maior infectividade foi registrada nas molaridades de 0,001 a 0,02 M em pHs de 7,0 a 7,5. Aparentemente, o melhor tratamento foi aquele em que se usou 0,001 M, pH 7,5 (Tabela 4).

O armazenamento de folhas de coentro em câmara fria (10-18°C) e congelador (-7°C), ainda conservou a infectividade do VMAS por 12 dias, embora reduzindo-a sensivelmente. O material mantido em câmara fria, permaneceu mais infectivo até o 8º dia em comparação com aquele guardado em congelador, em que com apenas 4 dias, a infectividade foi reduzida bruscamente (Tabela 5).

Quanto à distribuição do vírus na planta infectada, a maior concentração foi detectada no limbo foliar, se-

Tabela 4. Efeitos da molaridade e do pH do tampão fosfato na infectividade do VMAS.

pH	Molaridade						Média
	0,001	0,002	0,01	0,02	0,1	0,2	
6,5	64,0 ^(a)	113,0	39,0	133,0	49,0	41,0	73,2
7,0	174,0	142,0	171,0	197,0	99,0	44,0	137,8
7,5	437,0	221,0	332,0	201,0	137,0	28,0	226,0
8,0	146,0	220,0	154,0	65,0	61,0	25,0	111,8
Média	205,3	174,0	174,0	149,0	86,5	34,5	

(a) - Número médio de lesões locais por folha (média de cinco folhas) de *C. amaranticolor* Coste & Reyn.

Tabela 5. Efeito do armazenamento de folhas de coentro em congelador e câmara fria, sobre a infectividade do VMAS.

Tratamento	Período de Armazenamento (Dias)		
	4	8	12
Congelador (- 7° C)	23 ^(a)	77	10
Câmara Fria (10-18° C)	170	319	13

(a) - Número médio de lesões locais por folha de *C. amaranticolor*.
Coste & Rayn.

guido pelo pecíolo, hipocótilo e raiz, quando se testou como fonte de inóculo, tecidos respectivos da mesma planta de salsão e coentro.

3.1.2. Transmissão do VMAS por afídios

Quando se variou o tempo de aquisição na fonte de inóculo, e o número de afídios por planta-teste, foi comprovado que o VMAS é transmitido de maneira não circulativa por *Myzus persicae* Sulz., uma vez que, com apenas um período de acesso de 1 minuto, na fonte de inóculo, foi o afídio capaz de transmitir este vírus (Tabela 6).

Em testes posteriores quando foi dado um jejum prévio de 60 minutos e um período de alimentação de 30 minutos, tanto na fonte de inóculo, quanto na planta-teste, transferindo-se 10 afídios para cada uma de 10 plantas de coentro, observou-se que somente *M. persicae* transmitiu o VMAS, já que *Aphis fabae solanella* Theob. foi incapaz de fazê-lo. A eficiência de transmissão do VMAS pelo *Myzus persicae* foi de 60% (6 plantas infectadas em um total de 10 testadas).

3.1.3. Transmissão por união de tecidos

Os testes de transmissão por união de tecidos, mostraram que o VMAS foi capaz de passar de plantas infectadas de coentro, mas não de salsão, para plantas comprovadamente sadias da primeira espécie, quando utilizaram-se os métodos de enxertia por "garfagem" e "mamadeira".

Tabela 6. Transmissão do VMAS por *Myzus persicae* variando o período de aquisição na fonte de inóculo e o número de afídios por plantas.

Número de Afídios por planta-teste	Acesso de Aquisição					
	1 min	2 min	10 min	1 h	24 hs	48 hs
1	0/4 ^(a)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
3	2/4	3/4	0/4	0/4	0/4	1/4
9	2/4	3/4	0/4	0/4	0/4	0/4

(a) - Número de plantas de coentro infectadas por número de plantas inoculadas.

3.2. Propriedades físicas "in vitro"

O ponto termal de inativação do VMAS em suco de plantas infectadas ficou entre 45 e 50°C, ao mesmo tempo em que permaneceu infectivo à diluição de 10^{-3} , mas não a 10^{-4} , e a infectividade foi mantida por 5 mas não 6 dias, quando o suco foi armazenado à temperatura ambiente (24-26°C) e por 18, mas não 19 dias, quando armazenado à temperatura de 4-5°C.

3.3. Círculo de hospedeiras e sintomas

3.3.1. Círculo de hospedeiras

Das 17 famílias de plantas inoculadas mecanicamente, apenas duas, Umbelliferae e Chenopodiaceae, foram infectadas com o VMAS.

A Tabela 7 mostra que somente 3 de 7 espécies de plantas pertencentes à família Umbelliferae testadas, incluindo 5 cultivares de salsão e 2 de salsa, foram infectadas, sistemicamente, ao passo que, de 56 espécies, com suas respectivas variedades e cultivares, de plantas Umbelliferae, apenas *C. amaranticolor* e *C. quinoa* foram susceptíveis ao VMAS.

Tabela 7. Espécies e cultivares de plantas testadas como possíveis hospedeiras do VMAS.

Espécies e Cultivares	Resultados	Espécies e Cultivares	Resultados
AMARANTHACEAE		LEGUMINOSAE	
<i>Amaranthus sp</i>	-	<i>Vigna unguiculata</i> Walp. 'Seridô'	-
<i>Gomphrena globosa</i> L.	-	<i>Pisum sativum</i> L. 'Torta gigante', 'Tor.fl.roxa'	-
APOCYNACEAE		<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	-
<i>Dianthus caryophyllus</i>	-	<i>Crotalaria juncea</i> L.	-
CHENOPODIACEAE		<i>Cassia occidentalis</i> L.	-
<i>Beta vulgaris</i> L.	-	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i> (L.) DC.	-
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	1.1.c,	MALVACEAE	
<i>C. amaranticolor</i> Coste & Reyn	1.1.c, n.	<i>Malva parviflora</i> L.	-
<i>C. murale</i> L.	-	<i>Sida rhombifolia</i> L.	-
<i>Spinacea oleracea</i> L.	-	<i>Sida nicandra</i>	-
COMPOSITAE		<i>Ribiscus esculentus</i> L.	-
<i>Lactuca sativa</i> L. 'Manteiga'	-	NYCTAGINACEAE	
'E. Tower', 'Babá', 'Brasil 48'	-	<i>Mirabilis jalapa</i> L.	-
<i>Zinnia elegans</i> Jacq.	-	PLUMBAGINACEAE	
<i>Bidens pilosa</i> L.	-	<i>Helichrysum bractsatum</i>	-
<i>Emilia sonchifolia</i>	-	PORTULACACEA	
<i>Chicorium intybus</i>	-	<i>Portulaca oleracea</i> L.	-
<i>Chicorium endivia</i>	-	SOLANACEAE	
<i>Helianthus annuus</i> L.	-	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. 'St ^a Cruz'	-
<i>Calendula officinalis</i>	-	'Bony best'	-
<i>Callistephus chinensis</i>	-	<i>Nicandra physaloides</i> Gaertn.	-
<i>Dahlia variabilis</i> Dasf.	-	<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	-
<i>Centaurea cyanus</i> L.	-	<i>N. debney</i> Domin	-
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	-	<i>N. sylvestris</i> Spegazzini & Gomes	-
CRUCIFERAE		<i>N. tabbacum</i> L. 'TNN', 'Turkish'	-
<i>Raphanus sativus</i> L.	-	<i>Physalis floridana</i> Rydb.	-
<i>Brassica rapa</i> L.	-	<i>Solanum nigrum</i> L.	-
<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> L.	-	<i>Datura stramonium</i> L.	-
'Hukussou', 'Gongarsol'	-	<i>Capsicum annuum</i> L. 'AG-10', 'Doce	-
<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.	-	monstruoso', 'Mogi das Cruzes',	-
<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> L.	-	'Rei dos Rubis'	-
<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> L.	-	UMBELLIFERAE	
<i>B. chinensis</i> L. 'Kekyu hakussal'	-	<i>Apium graveolens</i> var. <i>dulce</i> L.	sist., mosaico
<i>B. juncea</i> Coss.	-	'Processor 34', 'Tall Utah 52-70	" "
<i>Eruca sativa</i> Mill.	-	strain R e H', 'Florida 683 strain K'	" "
<i>Lepidium sativum</i> L.	-	'Florida 2-14'	" "
CUCURBITACEAE		<i>Aracacia xanthorrhiza</i>	-
<i>Cucurbita pepo</i> L.	-	<i>Conium maculatum</i>	-
<i>Cucumis sativus</i> L. 'Chicago pickling'	-	<i>Coriandrum sativum</i> L.	sist., mosaico
<i>C. melo</i> L.	-	<i>Daucus carota</i> L.	-
EUPHORBIACEAE		<i>Petroselinum sativum</i> Hoff.	sist., mosaico
<i>Euphorbia prunifolia</i> Jacq.	-	'Moss Curled', 'Plain'	" "
GRAMINAE		<i>Foeniculum vulgare</i>	-
<i>Zea mays</i> L.	-		

3.3.2. Sintomas

Família Chenopodiaceae

Chenopodium amaranticolor Coste & Reyn - excelente indicadora produzindo lesões locais cloróticas a partir do 4º dia da inoculação, tendendo a necróticas posteriormente (Fig. 1-B).

C. quinoa Willd. - pela mesma forma reage à infecção do vírus com lesões locais cloróticas (Fig. 1-A) 5 a 6 dias após a inoculação.

Família Umbelliferae

Coriandrum sativum L. (Coentro) - Revelou-se uma das melhores hospedeiras para a multiplicação sistêmica do VMAS, exibindo sintomas típicos de clareamento de nervuras a partir do quarto dia da inoculação (Fig. 1-C), posteriormente distorção e redução na área foliar, encurtamento dos entrenós (Fig. 2-A), com conseqüente redução do crescimento da planta (Fig. 2-A, 2-B). Nas folhas inoculadas aparecem manchas cloróticas (Fig. 2-B), as quais coalescem provocando uma clorose generalizada destas folhas, da planta toda, e morte a partir do décimo quinto dia da inoculação. Quando a planta destina-se à purificação, deve ser inoculada num estágio de maior crescimento, já que do contrário, morre em poucos dias, não produzindo material suficiente.

Petroselinum sativum Hoff. (Salsa) - Ambas cultivares testadas, 'Moss Curled' e 'Plain', apresentaram clareamento de nervuras, distorção, afilamento e redução do limbo foliar, com áreas cloróticas tendendo a acompanhar as nervuras, mosqueado a mosaico (Fig. 1-D, 2-C). Como conseqüência, provoca redução no crescimento da planta.

Fig. 1 - Sintomas locais e sistêmicos induzidos pelo vírus do mosaico amarelo do salsão: A) lesões locais cloróticas, em *Chenopodium quinoa*; B) lesões locais cloróticas com centro necrótico, em *C. amaranticolor*; C) sintomas sistêmicos iniciais de clareamento de nervuras em *Coriandrum sativum*; D) áreas cloróticas, geralmente, ao longo das nervuras, mosqueado a mosaico e deformação foliar em *Petroselinum sativum*; E) áreas cloróticas sistêmicas ao longo das nervuras, enrugamento dos folíolos, mosqueado a mosaico e deformação foliar em *Apium graveolens* L. var. *dulce*.



Apium graveolens L. var *dulce* (Salsão) - Os primeiros sintomas são manifestados 4-5 dias após a inoculação, através de clareamento de nervuras, e enrugamento dos folíolos jovens. Posteriormente, os sintomas evoluem para um mosqueado proeminente ou leve mosaico (Fig. 1-E, 2-D). No estágio mais avançado da doença, os folíolos tornam-se estreitos, torcidos e enrolados para cima, com redução na área foliar e no crescimento da planta.

Todas as cinco cultivares testadas sob condições de casa-de-vegetação e campo, foram infectadas, com variações na severidade dos sintomas de cultivar para cultivar. Destas, a cultivar 'Florida 683 K' portou-se com maior tolerância ao vírus, exibindo sintomas bastante leves ou mesmo, apresentando-se sem sintomas. Paralelamente, a concentração do vírus era baixa, a julgar pelo reduzido número de lesões que aparecia nas *C. quinoa* Willd. inoculadas, usando-se esta cultivar, infectada pelo VMAS, como inóculo.

3.4. Microscopia eletrônica

Partículas alongadas e flexíveis (Fig. 5-A) foram consistentemente visualizadas através de método "leaf dip", em tecidos infectados, experimentalmente, de coentro, salsão, salsa, *C. quinoa* e *C. amaranticolor*, bem como nas amostras de salsão e salsa, naturalmente infectadas pelo VMAS, em condições de campo.

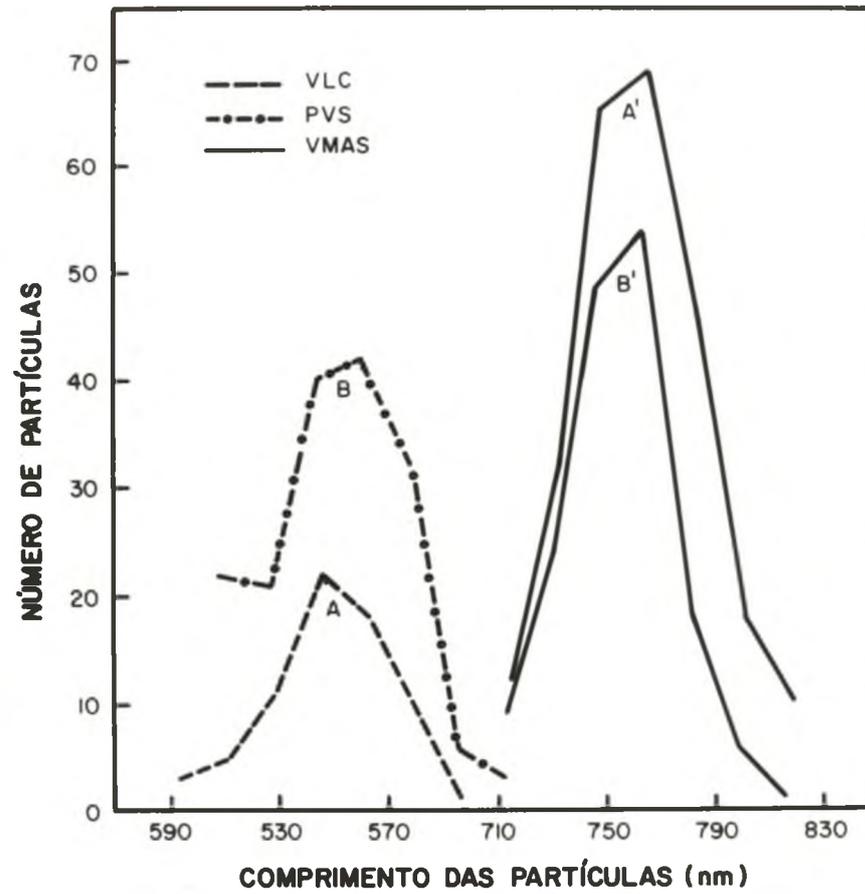
Tomando-se os vírus S da batata (PVS) e latente da couve (VLC) como padrão, e medindo-se cerca de 230 partículas, em cada caso, o comprimento normal do VMAS, baseando-se na curva de distribuição, foi de 758 e 764 nm, respectivamente (Fig. 3).

Tecido foliar de coentro e salsão infectados mecanicamente e de salsa e salsão coletados em campo no Distrito Federal, quando examinados, através de secções ultrafinas ao microscópio eletrônico, mostraram a presença de inclusões lamelares, típicas da infecção com potyvirus

Fig. 2 - Sintomas foliares sistêmicos, e redução de crescimento em plantas da família Umbelliferae: A) distorção, enrolamento de folíolos, encurtamento de entrenós e redução na área foliar e no crescimento de *Coriandrum sativum*; B) manchas cloróticas em folhas inoculadas e clorose sistêmica de folhas jovens, redução no crescimento de planta inoculada, comparada com planta sadia de *Coriandrum sativum*; C) manchas cloróticas e áreas cloróticas ao longo das nervuras em *Petroselinum sativum*, infectado com o VMAS em condições de campo; D) manchas cloróticas e mosaico em *Apium graveolens* var. *dulce*, infectado em condições de campo no Distrito Federal.



Fig. 3 - Diagrama de distribuição de mensurações de partículas do vírus do mosaico amarelo do salsão(————), do vírus latente da couve (----) e do vírus S da batata (-o-o-), determinados a partir de preparações "leaf dip". AA' indica a série tomando como padrão o vírus latente da couve (VLC) e BB' o vírus S da batata (PVS).



(Fig. 4-B, 4-C, 4-D) e de inclusões intranucleares fibrosas características do VMAS (Fig. 4-A, 4-B, 4-C).

3.5. Microscopia ótica

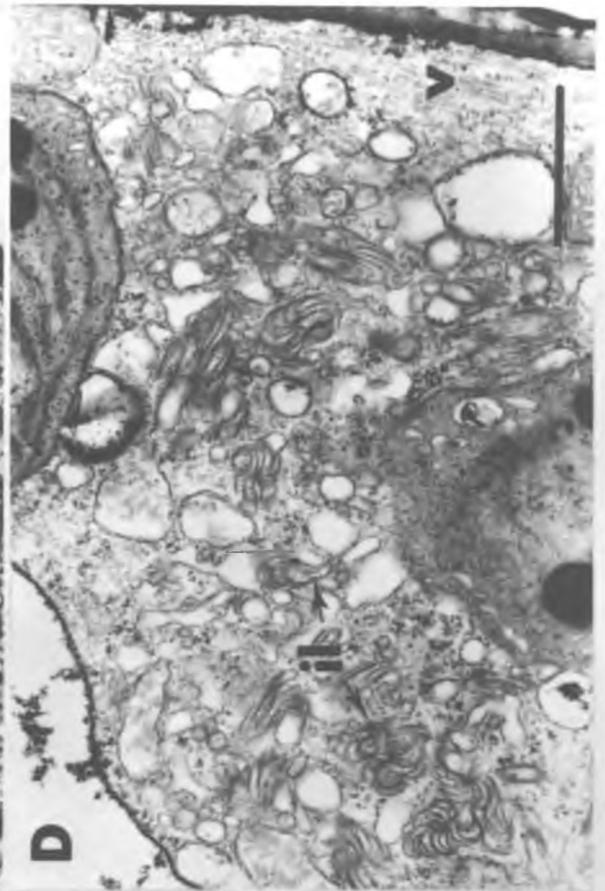
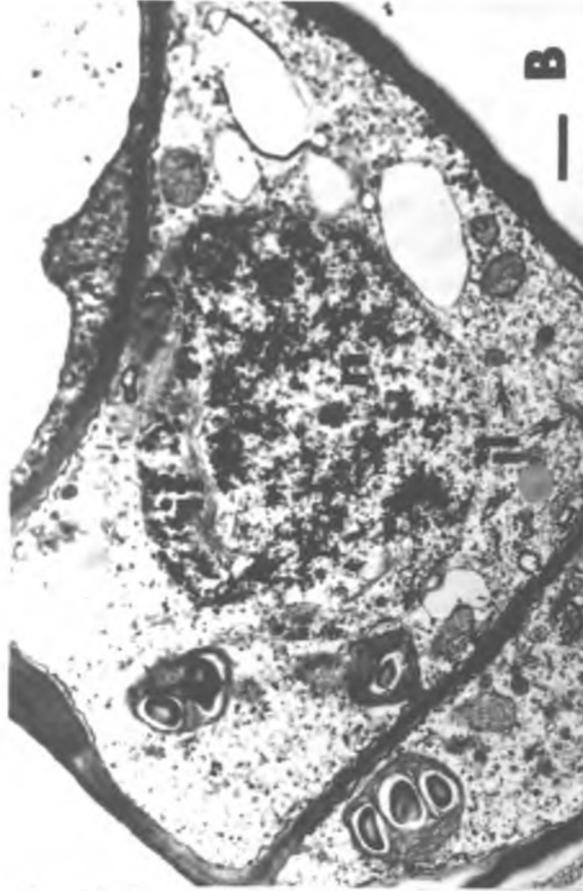
Ao se examinar material infectado de coentro e salsa ao microscópio ótico, constatou-se a presença de inclusões fibrosas no interior do núcleo, tomando um aspecto enovelado e acompanhando a periferia do mesmo (Fig. 4-C). Pelo método de coloração empregado, não foi possível visualizar inclusões lamelares no citoplasma de células de tecidos infectados das duas hospedeiras mencionadas.

3.6. Purificação do vírus

Na multiplicação sistêmica do VMAS para a purificação, utilizaram-se plantas de coentro, as quais apresentavam elevada concentração de vírus. Embora o suco de salsa tenha sido clarificado com maior facilidade, a concentração do vírus no extrato foi mais baixa nesta hospedeira, confirmando resultados dos testes de recuperação.

Quando se testou por inoculação mecânica, diferentes partes de uma mesma planta, a maior concentração do vírus, foi detectada no limbo foliar, seguido pelo pecíolo, hipocótilo e raiz, entretanto, não se devem usar raízes, nem tecidos lenhosos, pela presença de taninos, gomas, ácidos ou enzimas oxidativas, que segundo Brakke (1967), são os materiais de plantas, mais comuns, que interferem com vírus. Por outro lado, a prática de se guardar material infectado em congelador (-7°C), para ser usado na purificação, não é recomendável para o vírus em estudo, pois provoca a inativação do mesmo, com perda de infectividade, durante

Fig. 4 - Micrografia eletrônica de secções ultrafinas de tecidos de plantas infectadas pelo vírus do mosaico amarelo do salsão: A) salsão; B) salsa; C-D) coentro. Observa-se inclusões lamelares (il), mitocôndrias (m), cloroplasto (p), partículas de vírus (v) no citoplasma, e inclusões fibrosas (if) no núcleo (n). A inserção em A, mostra inclusões fibrosas em corte transversal ao microscópio eletrônico. Em C, a inserção ilustra inclusões fibrosas acompanhando a periferia do núcleo, vistas ao microscópio ótico, em epiderme de coentro colorida com a mistura de água, "calcomine orange" a 5% e "luxol brilliant green" a 1%, na proporção de 1:1:8. Quando não indicado, cada barra da micrografia corresponde a 1 um.



os processos de congelamento e descongelamento do material.

Durante a purificação, foram obtidos melhorias substanciais e progressivas nas várias tentativas empregando o método desenvolvido nesse trabalho. Inicialmente, as preparações apresentavam-se com concentrações reduzidas e contaminadas com material da hospedeira. À medida que eram feitas modificações em algumas etapas, resultados positivos eram conseguidos, melhorando a concentração e o grau de pureza das mesmas, chegando-se finalmente, a obter preparações com elevado grau de pureza.

A solução tampão de 0,165 M de Na_2HPO_4 e 0,018 M de Na-citrato com 0,5% de 2-ME, pH 8,6, foi mais eficiente na extração do vírus e pela adição de 2-ME a 0,1%, 0,001 M de Na-EDTA ou 0,5 M de uréia no tampão, não observaram-se modificações ou efeitos positivos adicionais na extração.

Quando se usou clorofórmio na clarificação do suco, bem como em clarificação adicional ao método de gel de fosfato, baixa concentração de partículas foi observada em preparações examinadas ao microscópio eletrônico, possivelmente em decorrência da tendência de agregação das mesmas, acentuada pela influência do clorofórmio, provocando a precipitação juntamente com o material da hospedeira. Entretanto, em termos de clarificação do suco, este foi um dos métodos mais efetivos, com obtenção de preparações bem clarificadas. Desde que se encontre uma fórmula para reduzir ou prevenir a agregação, este, juntamente com o de n-butanol seria um método recomendável. O método de clarificação com n-butanol, com centrifugação a 4.000 rpm logo em seguida, foi o melhor método, através do qual, se conseguiu eliminar contaminação com material da hospedeira, bem como, obter-se preparações com concentrações mais elevadas em todas as tentativas, uma vez que preparações usando gel de fosfato, ainda apresentavam-se contaminadas e com concentrações pouco mais baixas.

O processo de concentração do vírus por ultracentrifugação, foi mais eficiente que por precipitação

com PEG, proporcionando preparações mais concentradas.

O vírus foi recuperado do precipitado de primeira baixa centrifugação de 7.000 rpm, após a clarificação, fato que sugere uma forte tendência de agregação e precipitação do VMAS, Sendo assim, em tentativas posteriores, reduziu-se a rotação para apenas 4.000, com bons resultados.

Em tentativas utilizando-se o método de purificação desenvolvido nesse trabalho, obtiveram-se preparações com excelentes concentrações de vírus e livres de contaminações com materiais da hospedeira, com a banda sendo formada no gradiente de densidade de sacarose a 1,9 a 2,4 cm abaixo do menisco. A Fig. 5-B ilustra uma preparação purificada por este método, embora as últimas purificações tenham sido bastante superiores a esta. Pelo método, 13,15 mg de vírus purificado foram recuperadas de 1 kg de folhas de coentro. Através do método de Shepard & Grogan (1967a), recuperou-se vírus em baixas concentrações, enquanto que a tentativa utilizando-se o método de Tomlinson & Ward (1978), foi totalmente insatisfatória, não se observando partículas ao microscópio eletrônico.

Ensaio de infectividade através de inoculação mecânica em *C. amaranticolor*, nas concentrações de 39 e 3,9 $\mu\text{g/ml}$ de uma preparação purificada por este método, verificou ser altamente infectiva, com um número médio de lesões locais por folha (média de 5 folhas) de 364 e 23, respectivamente.

3.7. Purificação de inclusões

Pelo método de purificação de inclusões, foram obtidas inclusões lamelares características dos potyvirus, embora em baixas concentrações, entretanto, observou-se um fato curioso, quando utilizou-se a ressuspensão do precipitado formado após centrifugação a 7.000 rpm por

20 minutos, depois da clarificação do suco com gel de fosfato. Juntamente com inclusões lamelares, grande quantidade de partículas virais apareciam em agregados, conforme micrografia eletrônica (Fig. 5-C), fato não observado em centrifugações a 4.000 rpm por 10 minutos.

3.8. Propriedades fisicoquímicas

3.8.1. Espectrofotometria de luz ultravioleta

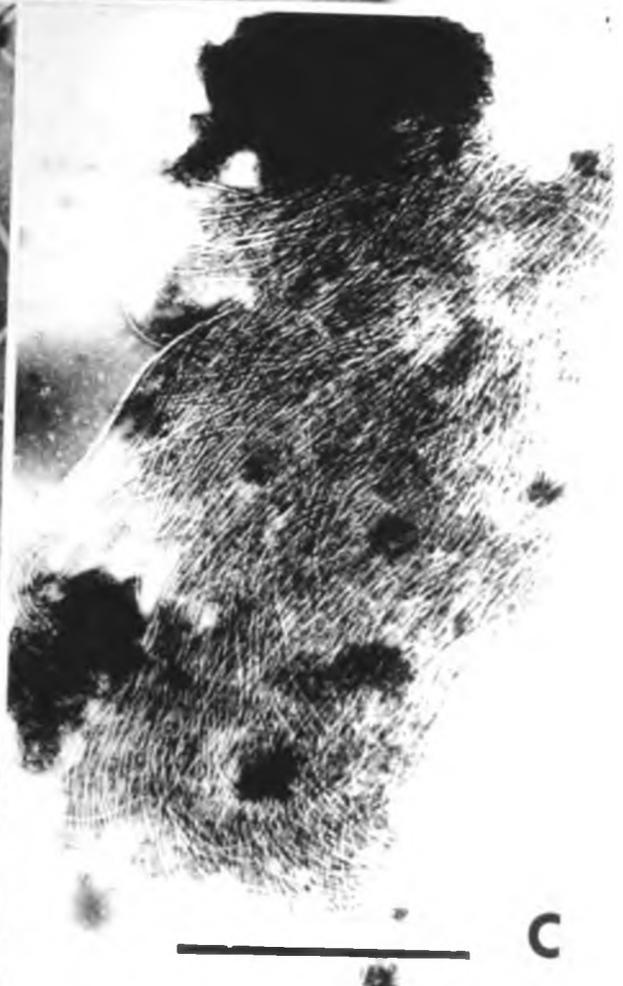
O espectro de absorção ao ultra-violeta de uma preparação purificada, foi típico de nucleoproteína, com picos máximo e mínimo a 265 e 245 nm, respectivamente (Fig. 6).

A relação de absorção, $A_{280/260}$ foi 0,842, indicando um conteúdo de ácido nucleico em torno de 5,5-6,0% (Layne, 1957).

3.8.2. Coefficiente de sedimentação

Em gradiente de sacarose, após a centrifugação, o vírus formou uma única banda a 2,3-2,6 cm abaixo do menisco (média de 2,45 cm). Tomando-se como padrão o TMV com coeficiente de sedimentação de 187 S (Brakke, 1958), obteve-se um valor estimado 132,7 S para o VMAS.

Fig. 5 - Micrografia eletrônica de partículas do vírus do mosaico amarelo do salsão: A) preparação "leaf dip" de coentro infectado pelo vírus do mosaico amarelo salsão; B) preparação purificada do vírus do mosaico amarelo do salsão, contrastada com silicotungstato de sódio; C) agregado de partículas do vírus do mosaico amarelo do salsão, obtido pelo método de purificação de inclusões. Cada barra na micrografia, quando não indicado, corresponde a 1 um.



3.9. Serologia

Na determinação do título do antissoro pelo teste de dupla difusão em agar gel com SDS a 0,5%, em todas coletas efetuadas, a partir do 20º dia da primeira injeção, ocorreram reações específicas, entretanto, aquelas efetuadas a 40 e 50 dias, apresentaram títulos mais elevados, formando linhas de precipitação mais fortes e nítidas até a diluição de 1/4, quando testadas contra sucos infectados de coentro, salsão ou vírus purificado, o mesmo não ocorrendo com suco sadio em qualquer das diluições do antissoro efetuadas, quando os antígenos foram tratados com 1,5% de SDS. Da mesma forma, soro normal testado contra suco sadio e infectado de coentro e salsão, não mostrou qualquer linha de precipitação.

Utilizando-se como antígenos suco de folhas sadias e infectadas de coentro e salsão ou vírus purificado, tratados ou não nas concentrações finais de 0,5 ; 1,0 ou 1,5% de SDS, observou-se em todos os casos, a formação de linhas de precipitação, tanto com suco de plantas infectadas quanto com vírus purificado, e nenhuma reação específica com suco sadio (Fig. 7). O tratamento com 1,5% de SDS, foi o que apresentou resultados mais consistentes, mostrando reações de precipitação mais nítidas. Contudo, quando se usou, principalmente, suco de salsão sadio ou infectado, observou-se a formação de uma linha não específica entre os orifícios periféricos contendo principalmente sucos de salsão e salsa, bem como, próximo à parede voltada para o orifício central. Este fato, entretanto, não prejudica a leitura dos resultados, já que é formada uma linha bastante nítida entre o suco infectado e o antissoro, não verificando-se o mesmo com suco sadio. Para evitar este problema, as leituras devem ser efetuadas a partir de duas horas após, período no qual já são observados resultados satisfatórios, não recomendando, por outro lado, efetuarem-nas depois de 8 horas.

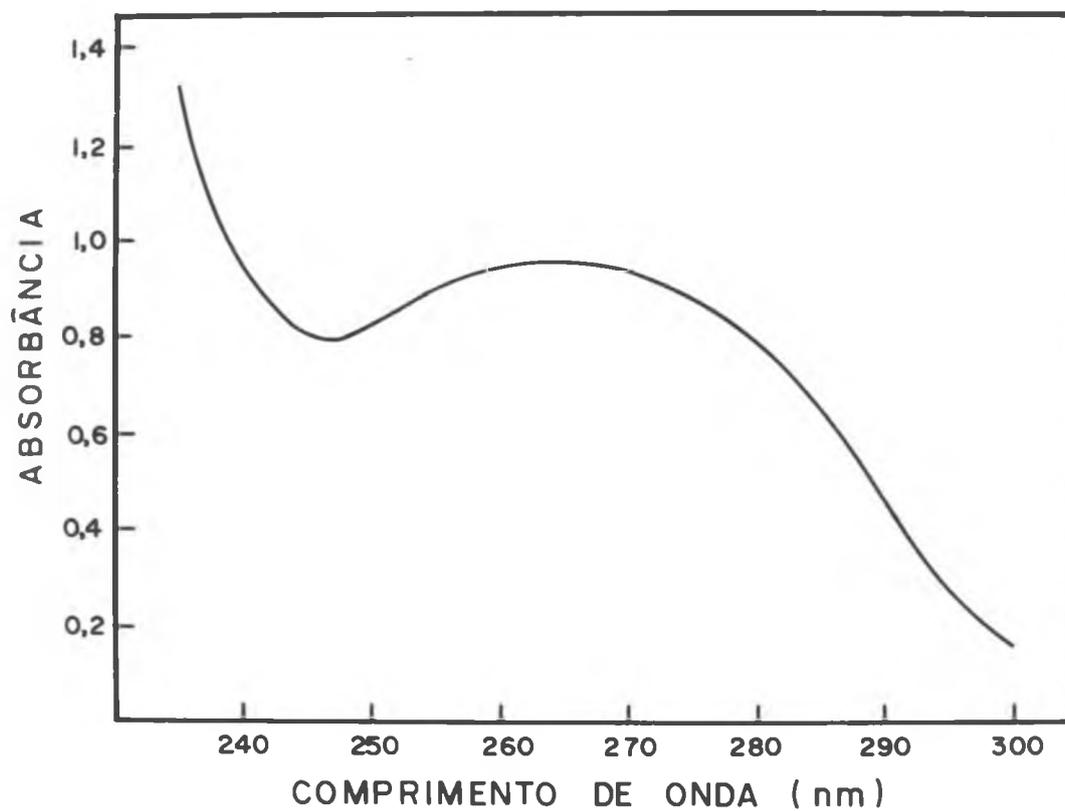


Fig. 6 - Espectro de absorção ao ultra-violeta de uma preparação purificada do vírus do mosaico amarelo do salsão.

Fig. 7 - Imunodifusão em agar gel contendo SDS, usando antissoro preparado contra o vírus do mosaico amarelo do salsão (orifício central) e sucos de: a) *Apium graveolens* L. var. *dulce*, infectado; b) *Apium graveolens* L. var. *dulce*, sadio; c) *Coriandrum sativum* L., sadio.



Utilizando-se como antígenos, suco de plantas infectadas com o VMAS e sadias de coentro e salsaõ ou VMAS purificado, tratados com SDS na concentração final de 1,5%, para testar o antissoro para o WCeMV, observou-se a formação de linhas de precipitação específicas fraca com o suco de plantas infectadas e vírus purificado, bem como reação não específica com suco sadio de salsaõ e coentro.

3.10. Comparação entre cultivares de salsaõ quanto à susceptibilidade ao VMAS, em condições de campo

A tabela 8 mostra uma variação na susceptibilidade das quatro cultivares de salsaõ infectadas através de inoculação mecânica com o VMAS e testadas em condições de campo. A cultivar 'Florida 2-14' seguida pela 'Tall Utah 52-70 strain R' apresentaram-se com sintomas mais severos e com maior redução de peso, já a cultivar 'Florida 683 strain K' portou-se com maior tolerância ao mesmo, exibindo sintomas bastante leves, ou mesmo sem sintomas, contudo, ainda apresentando redução no peso de suas plantas. Paralelamente, a concentração do vírus foi mais baixa nesta cultivar e mais elevada em 'Florida 2-14', a julgar pelo número médio de lesões locais por folha de *C. quinoa*, inoculadas, usando-as como inóculo.

3.11. Ocorrência do VMAS em campo no Distrito Federal.

Através de microscopia eletrônica e de testes de dupla difusão em agar gel, em amostragens efetuadas nos núcleos rurais do Distrito Federal, o VMAS foi detectado em 3 de 5 amostras de salsaõ e nas 5 amostras de salsa, com sus

Tabela 8. Efeitos do VMAS sobre cultivares de salsão, em condições de campo.

Cultivares	Peso Médio (g)/Planta		Altura Média (cm)/Planta		Número Médio de les./fl.	Severidade de Sintomas	Redução no Peso (%)
	Infectada	Sadia	Infectada	Sadia			
'Florida 2-14'	222,1	554,2	28,7	39,4	321,4 (a)	++++(b)	59,9
'Tall Utah 52-70 str.H'	359,4	532,7	33,0	38,0	250,4	++	32,5
'Tall Utah 52-70 str.R'	362,0	651,8	34,0	48,0	252,7	+++	44,5
'Florida 683 strain K'	382,7	607,7	28,5	39,0	64,0	+	37,0

(a) - Número médio de lesões locais por folha de *C. quinoa* Willd.

(b) - + a ++++ = escala de severidade de sintomas, do menos para o mais severo.

peita de estarem infectadas com o vírus, revelando assim, a incidência do VMAS em condições de campo em Brasília. O antissoro mostrou-se altamente eficiente da detecção do vírus, resultados confirmados através de ensaios de infectividade, por inoculações mecânicas, em *C. amaranticolor* e coentro.

Para fins de diagnóstico e para maior segurança, recomenda-se diluí-lo, a apenas 1/2, apesar do título ser de 1/4, podendo o mesmo ser utilizado com tal finalidade, em levantamentos de campo.

4. DISCUSSÃO

Um potyvirus foi consistentemente recuperado, de plantas de salsão apresentando sintomas de mosaico amarelo, provenientes de São Paulo, bem como de salsão e salsa cultivados no Distrito Federal.

Os dados sobre citopatologia, morfologia e alguns aspectos de transmissão, círculo de hospedeiras e sintomatologia, estão em acordo com aqueles descritos por Kitajima & Costa (1978), confirmando ser o isolado utilizado neste trabalho, o mesmo VMAS relatado por aqueles autores em São Paulo.

O VMAS é facilmente transmitido por inoculação mecânica, quando se usa como fonte de inóculo plantas de salsão, salsa, coentro e *Chenopodium quinoa*, e com alguma dificuldade de plantas de *C. amaranticolor*, provavelmente, devido à presença de inibidores (Bós, 1967; Hollings, 1974; Gibbs & Harrison, 1976). *Myzus persicae* é um vetor bastante eficiente deste vírus, transmitindo-o de forma não circulativa, mesmo com acesso de aquisição de apenas 1 minuto na fonte de inóculo. Este afídio possui um círculo de hospedeiras muito amplo, abrangendo cerca de 500 espécies (Leonard, *et. al.*, 1970), não estando incluídas nestas, salsão, salsa e coentro, muito embora, Severin & Freitag (1938) o tenham encontrado alimentando em salsão em condições naturais nos EUA. Esta espécie, pelo seu diversificado círculo de hospedeiras, constitui-se talvez no mais provável disseminador do VMAS, mas em experimentos e levantamentos de campo, no Distrito Federal, só foi observada alimentando-se em salsa, e em infestação natural em telado, em coentro. Por outro lado, *Aphis fabae*, vetor comprovado do CeMV (Smith, 1972), foi incapaz de transmiti-lo, provavelmente, porque aqueles usados neste trabalho, pertençam à subespécie

solanella (Costa et. al., 1976). Estes dados, contudo, não excluem outras espécies de pulgões como possíveis vetoras, uma vez que foram encontradas alimentando-se em salsa, pelo menos duas outras espécies não identificadas, as quais não foram testadas. Não se pode verificar a transmissão do VMAS por sementes, já que o salsão é uma hortaliça de clima temperado, apresentando sob nossas condições climáticas, resistência à floração (Campos & Camargo, 1963; Filgueira, 1972), enquanto o coentro, infectado num estágio jovem, morre antes de florescer, e se mais desenvolvido, floresce sem produzir sementes. O VMAS pode ser transmitido por enxertia de plantas infectadas de coentro para sadias da mesma espécie, o mesmo não ocorrendo quando se enxertou coentro infectado sobre salsão, possivelmente pela não união de tecidos desta hospedeira, por tratarem-se de espécies distintas.

O VMAS possui muitas semelhanças e algumas diferenças com o WCeMV (CeMV), além de pertencerem ao grupo potyvirus. Possivelmente, seriam membros de um mesmo complexo. Seu círculo de hospedeiras é bastante restrito, tal como acontece com o CeMV (Severin & Freitag, 1938), infectando exclusivamente plantas das famílias Umbelliferae e Chenopodiaceae. Este fato, não suprime a importância potencial que possa ter o mesmo, uma vez que, salsa, salsão e coentro são plantas cultivadas comercialmente e com certa importância econômica. A cenoura, por outro lado, embora a variedade testada não tenha sido susceptível ao VMAS, outras poderão ser, vindo o vírus a causar danos substanciais na produção, já que esta hortaliça está incluída entre as mais comercializadas no Brasil.

Clareamento de nervuras, manifestado poucos dias após a inoculação em coentro, salsão e salsa, com o aparecimento de manchas cloróticas em folhas inoculadas, são os sintomas mais característicos induzidos pelo VMAS, e são similares àqueles descrito para o CeMV.

O vírus possui partículas alongadas e flexíveis, com comprimento normal de 760 x 15 nm (Kitajima & Costa, 1968a, 1978). Nesse trabalho, através da medição

de 230 partículas, usando-se como padrões, o vírus S da batata ou o vírus latente da couve, obteve-se os valores de 764 e 758 nm, respectivamente. Esta pequena discrepância com relação ao valor inicialmente relatado, é perfeitamente esperada de uma determinação para outra, em função de possíveis influências da hospedeira, da precisão de calibração na magnificação do microscópio eletrônico, erros nas medidas das partículas, além do método de preparação de espécimens (Milne & Grogan, 1969). Da mesma forma, está em acordo com aquela faixa de 760 a 786 nm relatada em diferentes países para o CeMV (Purcifull & Shepard, 1967; Shepard & Grogan, 1971; Smith, 1972; Pemberton & Frost, 1974; Kemp & Frowd, 1975; Gracia & Feldman, 1977).

No estudo dos vírus pertencentes ao grupo potyvirus, tem-se observado a formação de inclusões citoplasmáticas em células de plantas infectadas. Estas alterações têm sido estudadas ao microscópio ótico (Christie, 1967; Christie & Edwardson, 1977) e em suco de plantas infectadas e secções ultrafinas, através de microscopia eletrônica (Kitajima, 1968; Edwardson *et.al.*, 1968; Christie & Edwardson, 1977). Estes estudos são bastante importantes do ponto de vista prático, uma vez que, fornecem dados que permitem uma rápida diagnose de moléstias causadas por vírus pertencente a este grupo (Edwardson, 1974).

Inclusões lamelares citoplasmáticas, foram consistentemente visualizadas ao microscópio eletrônico em preparações de inclusões purificadas e secções ultrafinas de tecidos infectados de salsa, coentro e salsão, iguais às relatadas para o CeMV. Entretanto, pelo exame ao microscópio ótico de células epidermais de tecidos de salsa, coentro e salsão, só foram visualizadas inclusões nucleares acompanhando geralmente a periferia do núcleo, já que inclusões citoplasmáticas cilíndricas ou paracristalinas como as observadas para o CeMV (Christie & Edwardson, 1977), não foram encontradas no citoplasma de células infectadas pelo VMAS. Ao microscópio eletrônico, confirmou-se a localização intranuclear de tais inclusões, revelando serem formadas

de agregados de partículas tubulares filamentosas, flexíveis e refringentes, dispostas lado-a-lado, com cerca de 25 nm de largura, e possuindo uma zona central menos densa de ca. 10 nm em diâmetro, como descritas anteriormente, (Kitajima & Costa, 1978). Contudo, estas inclusões diferem daquelas encontradas para o CeMV (Christie & Edwardson, 1977), que são amorfas dispostas no centro do núcleo, não havendo menção de serem formadas por partículas com tal morfologia.

Segundo Kitajima & Costa (1968b), inclusões intranucleares cristalinas ou amorfas como estas do CeMV, têm sido descritas em tecidos infectados com outros vírus, todavia, não há relato anterior de inclusões intranucleares de aspecto fibroso, como as associadas ao VMAS. A facilidade com que estas inclusões são detectadas mesmo ao microscópio ótico comum, tornam-nas um elemento útil, além dos sintomas macroscópicos, para uma precisa e rápida diagnose das moléstias causadas por este vírus.

O VMAS permanece infectivo no suco de plantas, quando mantido *in vitro* por 5, mas não 6 dias à temperatura ambiente, e por 18 mas não 19 dias a 4-5°C, enquanto o CeMV é infectivo até o 6º dia à temperatura ambiente. O ponto termal de inativação entre 45-50°C para o VMAS é inferior a 55-60°C para o CeMV (WCeMV), e ambos perdem a infectividade quando diluídos entre 10^{-3} - 10^{-4} .

Embora o método utilizado por Shepard & Gronan (1967a), para purificar o WCeMV (CeMV), com ligeiras modificações, não tenha sido eficiente na purificação do VMAS, em testes de dupla difusão em agar gel foi observada 'relação serológica entre ambos vírus, ao se usar antissoro 'contra o WCeMV para testar preparações purificadas e extrato de plantas infectadas com o VMAS.

Além do CeMV (WCeMV), aspectos morfológicos e patológicos sugerem que outros vírus relacionem-se com o VMAS, como é o caso do "celery mosaic virus" descrito na Alemanha por Brandes & Luisoni (1966) e um vírus isolado de salsa na França por Cadilhac *et. al.*, (1972), que produz inclusões intranucleares de aspecto tubular em células infecta

das de salsa. Este último, provoca redução no crescimento e sintomas de amarelecimento, e é considerado estreitamente relacionado ao strain D 70 do "umbelliferae virus" (Marchoux *et. al.*, 1971). Embora estes vírus tenham algumas semelhanças com o VMAS, além de pertencerem ao grupo potyvirus e, possivelmente, serem membros de um mesmo complexo, serão necessários estudos adicionais comparativos principalmente serológicos para constatarem-se possível identidade ou relacionamento com o VMAS.

Nesse trabalho, o coentro mostrou-se excelente hospedeira para a multiplicação sistêmica do vírus, apresentando elevada concentração. Embora o suco de salsa tenha sido mais facilmente clarificado, a concentração do vírus no extrato foi mais baixa nesta hospedeira.

Membros do grupo potyvirus são normalmente difíceis de serem purificados, devido à tendência de agregação das partículas, provocando perdas parciais ou totais por insolubilidade (Delgado - Sanchez & Grogan, 1966; Damirdagh & Grogan, 1970; Langenberg, 1973), e baixa concentração do vírus nos tecidos das hospedeiras (Delgado-Sanchez & Grogan, 1966; Shepherd & Pound, 1960) e as contaminações com nucleoproteínas das mesmas (Van Regenmortel, 1964; Langenberg, 1973), contribuirão para o insucesso de purificações dos membros deste grupo.

Destes aspectos, talvez o que mais influenciou negativamente na purificação do VMAS, tenha sido perdas por agregação, já que pelo método de purificação de inclusões, onde usam-se com predomínio, baixas centrifugações, grande quantidade de partículas em agregados densos, foi visualizada ao microscópio eletrônico.

Em 1967a, Shepard & Grogan, purificaram o "western celery mosaic virus", clarificando o suco com clorofórmio, concentrando e purificando adicionalmente por três ciclos de centrifugações diferenciais e uma centrifugação em gradiente de densidade de sacarose. Entretanto, quando se usou este método, com algumas adaptações, para purificar o vírus em estudo, conseguiu-se recuperar apenas baixas concen

trações. Por outro lado, o método usado por Tomlinson & Ward (1978), para purificar o vírus do mosaico do nabo, que pertence ao mesmo grupo, foi inadequado para purificar o VMAS, sendo todas as tentativas infrutíferas na recuperação do vírus.

Dos métodos tentados, aquele desenvolvido nesse trabalho, e já descrito, foi indiscutivelmente o que apresentou resultados mais positivos, permitindo determinar algumas das propriedades físicoquímicas do vírus, bem como, produzir antissoro específico e eficiente na diagnose' do VMAS. O sucesso desse método, se deveu à utilização de um processo adequado de clarificação, eliminando contaminações com materiais da hospedeira, associado à utilização de rotações baixas de 4.000 rpm ou inferiores a esta, nas diversas etapas, o que permitiu reduzir o problema da agregação e precipitação das partículas do vírus.

O antissoro produzido contra o VMAS, não reagiu com a proteína normal da hospedeira, através do teste de dupla difusão em agar gel. Tal técnica é frequentemente empregada na detecção de diversos vírus, no entanto, apresenta problemas para vírus alongados, os quais difundem lentamente em agar. Este problema é contornado pela adição da detergente, SDS ao meio e ao antígeno (Purcifull & Batchelor, 1977), bem como de sódio dibutilnaftalenosulfonato (Leonil SA), ou pela degradação alcalina com etanolamina. Os dois últimos processos foram utilizados por Shepard & Grogan (1967b) na detecção do WCeMV. A técnica de dupla-difusão em agar gel com SDS, foi utilizada neste trabalho, com resultados satisfatórios na detecção do VMAS, embora tenham ocorrido reações não específicas, principalmente, quando se usou suco infectado de salsa. O tratamento do antígeno com este detergente a 1,5%, além do seu uso a 0,5% no agar gel, proporcionou melhores resultados, provavelmente por fragmentar mais uniformemente as partículas.

O antissoro demonstrou ser eficiente na detecção do vírus tanto em plantas de salsa, salsa e coentro infectadas mecanicamente, quanto nas duas primeiras

hospedeiras infectadas em condições de campo no Distrito Federal. Dessa maneira, através desse método, o antissoro poderá ser utilizado com valor diagnóstico em trabalhos de levantamento de campo e testes de rotina, na detecção rápida do VMAS.

Com base nos resultados das reações das quatro cultivares de salsa inoculadas mecanicamente com o vírus, e testadas em condições de campo, conclui-se que todas elas em maior ou menor grau, tiveram seu desenvolvimento afetado pelo VMAS. As cultivares 'Florida 2-14' e 'Tall Utah 52-70 strain R', tiveram perdas mais severas na produção da ordem de 60 e 44,5%, respectivamente, pelo menos nas condições em que foi executado o experimento. Por outro lado, as cultivares 'Florida 683 strain K' e 'Tall Utah 52-70 strain H', mostraram maior tolerância à infecção pelo VMAS, com perda em peso de 37 e 32,5%, respectivamente.

Embora neste teste preliminar, tenham sido utilizadas poucas plantas, ficou evidenciada a importância do VMAS, na cultura do salsa. Assim, tornaria conveniente, efetuarem-se testes empregando um maior número de plantas, com o acréscimo de outras cultivares, visando detectar-se fontes de resistência com vistas a programas de melhoramento.

Em levantamentos de campo no Distrito Federal, o vírus foi detectado em culturas de salsa e salsa, com elevada incidência nesta última espécie. As plantas apresentavam-se com redução acentuada na área foliar e no crescimento, principalmente, naquelas rebrotadas, fato que pode ser atribuído à transmissão de planta a planta, através de instrumentos utilizados na coleta das folhas. A salsa serviria então, como fonte de inóculo na disseminação em campo do VMAS pelo *Myzus persicae*, e por outras possíveis espécies de pulgões vetoras. No entanto, a incidência do vírus ainda não é tão elevada em salsa no Distrito Federal, provavelmente, em decorrência da não preferência alimentar do vetor por esta espécie, em detrimento de outras, pelo cultivo não generalizado desta hortaliça no Distrito Federal,

ou ainda pela característica de ser cultura de ciclo curto.

Por outro lado, o vírus não foi detectado em cultura de coentro, em condições de campo, podendo isto estar relacionado com a preferência alimentar do vetor e ainda o fato de que o VMAS quando infecta o coentro, o faz com grande severidade, causando a morte das plantas em poucos dias.

Como estratégias para o controle do VMAS, poderiam ser recomendadas como possíveis medidas, evitar a prática do plantio escalonado, intercalando outras hortaliças em períodos alternados, evitando sempre plantar salsa próximo a plantações já estabelecidas desta hortaliça, bem como de salsa e vice-versa. Como o círculo de hospedeiras deste vírus é bastante restrito, esta seria uma medida recomendável, já que não se tem informação sobre a existência de hospedeiras do mesmo, na vegetação espontânea. No caso particular da salsa, cuidados especiais deveriam ser empregados durante a colheita, deixando as plantas com sintomas para serem colhidas no final, após o que, procederia a eliminação das mesmas. É possível que haja variações sazonais na incidência do VMAS em salsa, em função da população de afídios vetores, e assim haveria necessidade de levantamentos mais frequentes. O uso de cobertura repelente, como a casca de arroz (Costa, 1972) na sementeira, e nos estágios iniciais da cultura, nas épocas de maior incidência, poderia contribuir também para o controle do VMAS.

Outra medida seria o emprego de cultivares que fossem tolerantes ou resistentes ao vírus, e neste sentido, seria altamente recomendável a procura de fontes de resistência e sua incorporação em cultivares de boa aceitação comercial.

5. RESUMO

O vírus do mosaico amarelo do salsaõ (VMAS) é membro do grupo potyvirus, sendo facilmente transmitido por inoculação mecânica, pelo pulgão *Myzus persicae* Sulz., de maneira não circulativa, e por enxertia. Seu círculo de hospedeiras foi bastante restrito, infectando plantas das famílias Umbelliferae e Chenopodiaceae. Os sintomas mais característicos induzidos pelo VMAS foram clareamento de nervuras em plantas de salsaõ, coentro e salsa, poucos dias após a inoculação e manchas cloróticas em folhas inoculadas. O VMAS foi intivado em temperatura ambiente (24-26°C) e 4-5°C, a 5 e 19 dias, respectivamente, perdendo a infectividade quando diluído a 10^{-4} , mas não a 10^{-3} e quando submetido a temperaturas de 50°C, mas não 45°C por 10 minutos. Ao microscópio eletrônico, através de preparações "leaf dip", foram visualizadas partículas alongadas flexíveis, com comprimento normal de 764 nm, tomando como padrão o PVS. O exame de secções ultrafinas, mostrou a presença de inclusões lamelares citoplasmáticas e inclusões intranucleares de aspecto fibroso. Estas são facilmente detectáveis em células epidermais, examinadas ao microscópio de luz.

O VMAS pôde ser purificado, clarificando o suco com n-butanol a 8%, concentrando e purificando adicionalmente por 2 ciclos de centrifugações diferenciais e uma centrifugação em gradiente de densidade de sacarose. O antissoro produzido contra o VMAS apresentou um título mais elevado quando coletado 40 e 50 dias após a primeira injeção do antígeno. Testes de dupla difusão em agar gel com SDS a 0,5%, submetendo o antígeno ao tratamento com SDS a 1,5% foi eficiente na detecção do vírus em suco de plantas e preparações purificadas até a diluição de 1/4 do antissoro, recomendando-se para efeito diagnóstico, diluí-lo a apenas 1/2.

O VMAS possui algumas semelhanças em suas propriedades biológicas, físicas e citopatológicas com o "western celery mosaic virus" descrito por Severin e Freitag (1938), nos Estados Unidos, além de relacionarem-se serologicamente e pertencerem ao grupo potyvirus, no entanto, diferem em alguns aspectos. Ambos induzem inclusões intranucleares, mas as do VMAS tem aspecto fibroso, enquanto as do CeMV seriam amorfas. O VMAS parece ser mais lábil que o CeMV, pois tem p.t.i. pouco mais baixo e suporta bem menos o armazenamento *in vitro*.

De 4 cultivares de salsão inoculadas mecanicamente e submetidas a condições de campo, todas tiveram seu desenvolvimento afetado pelo VMAS. As cultivares 'Florida 683 strain K' e 'Tall Utah 52-70 strain H', no entanto, apresentaram uma certa tolerância ao mesmo, a julgar pela menor perda em peso e quantidade de vírus recuperável.

Levantamentos efetuados em plantações de Umbelliferae, indicam a ocorrência do VMAS em culturas de salsão e salsa no Distrito Federal.

6. SUMMARY

Celery yellow mosaic virus (CYMV), a member of potyvirus group, could be easily transmitted by mechanical inoculation, grafting and the aphid, *Myzus persicae* Sulz. in a non circulative manner. It had a restricted host range, infecting only Umbelliferae and Chenopodiaceae plants. Symptoms commonly induced by CYMV in celery, coriander and parsley were chlorotic spots on the inoculated leaves and vein-clearing in young leaves. The infectivity of CYMV was lost: after 6 and 19 days in crude sap at room temperature (24-26°C) and at 4-5°C, respectively; after diluting to 10^{-4} , but not to 10^{-3} ; and after treating for 10 minutes at 50°C, but not at 45°C. Flexuous, elongated particles with a normal length of Ca. 760 nm were observed in leaf dips prepared from the CYMV-infected plants. Cytoplasmic lamellar inclusions and fibrous intranuclear inclusions were found in the CYMV-infected cells in ultra-thin sections. The intranuclear inclusions could be easily detected in epidermal strips with light microscope.

This virus was successfully purified by clarification of the crude sap with 8% n-butanol, two cycles of differential centrifugation and one rate zonal density gradient centrifugation. An antiserum produced against the purified CYMV was specific and could be used to detect the virus in crude sap or purified preparation by double diffusion test in agar gel containing 0.5% of sodium dodecyl sulfate.

The virus resembled western celery mosaic virus reported in North America in infectivity, transmission, morphology, physical properties *in vitro*, serological and cytopathological properties. However, some differences were found, mainly on the appearance of intranuclear inclusions and longevity *in vitro*.

Under field conditions, the growth of 4 celery cultivars, mechanically inoculated with CYMV, was greatly affected in comparison to the non inoculated plants. Among these 4 cultivars, 'Florida 683 strain K' and 'Tall Utah 52-70 strain H' showed certain degree of tolerance.

A survey made in the green belt of the Federal District showed that CYMV was commonly found in parsley and occasionally, in celery.

7. LITERATURA CITADA

- BÓS, L. Methods of studying plants as virus hosts. In: Maramorosh, K. & Koprowski. Methods in virology. 2nd ed. New York and London. Academic Press. 1967. p. 129-162.
- BÓS, L., DIAZ-RUIZ, J.R. & MAAT, D.Z. Further characterization of celery latent virus. Neth. J. Pl. Path. 84: 61-79. 1978.
- BRAKKE, M.K. Estimation of sedimentation constants of viruses by density-gradient centrifugation. Virology 6:96-114 1958.
- BRAKKE, M.K. Density-gradient centrifugation and its application to plant viruses. Advan. Virus Res. 7:193-224. 1960.
- BRAKKE, M.K. Miscellaneous problems in virus purification. In: Maramorosch & Koprowski. Methods in virology vol. II. New York. Academic Press. 1st Printing.
- BRANDES, J. & LUISONI, E. Untersuchungen über einige Eigenschaften von zwei gestreckten Selleriviren. Phytopath. Z. 57: 288-298. 1966.
- BRENNER; S. & HORNE, R.W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. Biophys Acta. 34: 103-110. 1959.
- CADILHAC, B., MARCHOUX, G. & COULOMB, P. Étude préliminaire d' une interaction plante-virus chez une ombellifère: Le persil (*Petroselinum sativum* Hoffm.). Observations ultrastructurales. Ann. Phytopathol. 4: 345-352. 1972.
- CAMPOS, H.R. & CAMARGO, L. S. Instruções para a cultura do aipo. Boletim n° 13. Instituto Agrônômico de Campinas. p. 9. 1963.

- CHRISTIE, R.G. Rapid staining procedures for differentiating plant virus inclusions in epidermal strips. *Virology* 31: 268-271. 1967.
- CHRISTIE, R.G. & EDWARDSON, J.R. Light and electron microscopy of plant virus inclusions, Florida Agricultural Experiment Stations Monograph Series nº 9. 150 pages. 1977.
- COSTA, C.L. Emprego de superfícies reflectivas repelentes aos afídios vetores, no controle das moléstias de virus das plantas. Tese de doutoramento. E.S.A. "Luiz de Queiroz" U.S.P. Piracicaba, S.P. 1972.
- COSTA, C.L., EASTOP, V.F. & COSTA, A.S. A list of the aphid species (Homoptera: Aphidoidea), collected in São Paulo, Brazil. *Rev. Per. Entom.* 15: 131-134. 1976.
- CRUZ, N. D., MEINA, D., KITAJIMA, E.W., COSTA, A.S. & LANDIM C.C. Citoquímica de inclusões intranucleares associadas ao vírus do mosaico amarelo do salsaõ. *Bragantia* 31:217-226. 1972.
- DAMIRDAGH, I.S. & SHEPHERD, R. J. Purification of the tobacco etch and other viruses of the potato Y group. *Phytopathology* 60: 132-142. 1970.
- DELGADO-SANCHEZ, S. & GROGAN, R. G. Purification and properties of potato virus Y. *Phytopathology* 56:1. 397-1.404. 1966.
- EDWARDSON, J.R. Some properties of the potato virus Y-group Florida Agric. Exp. Sta. Monog. Series nº 4:1-398. 1974.
- EDWARDSON, J.R., PURCIFULL, D.E. & CHRISTIE, R.G. Structure of cytoplasmic inclusions in plants infected with rodshaped viruses. *Virology* 34: 250-263. 1968.
- FENNER, F. Classification and nomenclature of viruses. Second Report of the International Comittee on Taxonomy of Viruses Basel. S. Karger AG. 1976.
- FILGUEIRA, F.A.R. Manual de olericultura: cultura e comercialização das hortaliças. São Paulo. Editora Agronômica Ceres 1972.

- FOSTER, A.C. & WEBBER, G.F. Celery diseases in Florida
Florida Agr. Exp. Sta. Bulletin 173: 21-78. 1924.
- FREITAG, J.H. & SEVERIN, H.H.P. Additional celery viruses.
Phytopathology 29: 824. 1939.
- FREITAG, J.H. & SEVERIN, H.H. P. Insect transmission host
range, and properties of the crinkle-leaf strain of
western celery mosaic virus. Hilgardia 16: 361-370. 1945.
- FRY, P.R. & PROCTER, C.H. A serious virus disease of celery.
N.Zealand Comm. Grow. 24: 23-24. 1968.
- FULTON, R.W. Recent advances in virus purification. In:
3rd Intern. Symposium on virus diseases of ornamental
plants, College Park. U.S.A. Acta Horticultural. 1974. p.
93-104.
- GIBBS, A. & HARRISON, B. Plant virology. The principles. New
York. Holsted Press 1 Book. 1976.
- GOODING, G.V. Jr. & BING, W.W. Serological identification
of potato Y virus and tobacco etch virus using immunodiff
usion plants containing sodium dodecyl sulfate.
Phytopathology 60: 1293. 1970.
- GRACIA, O. & FELDMAN, J.M. Isolation and identification of
two celery viruses in Argentina. Plant Dis. Rptr. 61:
905-908. 1977.
- HIEBERT, E. & McDONALD, J.G. Characterization of some proteins
associated with viruses in the potato Y group. Virology
56: 349-361. 1973.
- HOLLINGS, M. Celery virus. Ann. Rept. Glashouse Crops Res.
Inst. 73-74. 1950.
- HOLLINGS, M. Some properties of five viruses of celery. (*Apium
graveolens* L.) in Britain. J. Hort. Sci. 39:130-141. 1964.

- HOLLINGS, M. Recent advances in virus detection and identification by bioassay and serological tests. In: Third Intern. Symposium on virus diseases of ornamental plants. College Park, U.S.A. Acta Horticulturae. 1974. p. 23-24.
- KEMP, W.G. & FROWD, J.A. The isolation and identification of celery mosaic virus in Ontario. Plant Dis. Rptr. 59:50-53. 1975.
- KITAJIMA, E.W. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. J. Electron Microscopy (Japan) 14: 119-121. 1965.
- KITAJIMA, E.W. Inclusões intracelulares induzidas pelos vírus de plantas. Rev. Soc. Bras. de Fitopatologia. 2: 81-99. 1968.
- KITAJIMA, E.W. & COSTA, A.S. Morfologia do vírus do mosaico amarelo do salsão. Bragantia 27: VII-VIII. 1968a.
- KITAJIMA, E.W. & COSTA, A.S. Inclusões fibrosas intranucleares em plantas infectadas pelo vírus do mosaico amarelo do salsão. Bragantia 27: IX-XI. 1968b.
- KITAJIMA, E.W. & COSTA, A.S. The fine structure of the intranuclear, fibrous inclusions associated with the infection by celery yellow mosaic virus. Fitopatologia Brasileira 3: 287-293. 1978.
- KITAJIMA, E.W., CAMARGO, I.J.B. & COSTA, A.S., Morfologia e aspectos intracelulares do vírus latente da couve. Bragantia 29(17): 181-190. 1970.
- LANGENBERG, W.G. Serology, physical properties, and purification of unaggregated infections maize dwarf mosaic virus. Phytopathology 63: 149-154. 1973.
- LAYNE, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Pages 447-454 in S.P. Colowick and N.D. Kaplan, eds. Methods in enzymology, Vol. III. Academic Press, New York. 1154. p. 1957.

- LEONARD, M.D., WALKER, H.G. & ENARI, L. Host plants of *Myzus persicae* at the Los Angeles State and County Arboretum, Arcadia, California. Proc. Ent. Soc. Wash., Vol. 72, nº 3. 1970.
- LUISONI, E. Un nuovo virus del sedano (*Apium graveolens* L.) Atti. Accad. Sci. Torino. 100: 541-544. 1966.
- MARCHOUX, G., LECLANT, F. & GIANNOTTI, J. Virus and mycoplasma disease of carrots plants in Southastern France. Proc. 7 th. Conf. Czechoslovak Plant Virologist. 1971.
- MARCHOUX, G., NAVATEL, J.C., ROUGIER, J. & DUTELL, M. Identification dans le sud-este de la France du virus de la mosaic du céleri (Brandes) comparable au western celery mosaic virus (Severin). Ann. Phytopathol. 1: 227-235. 1969.
- MILNE, K. S. & GROGAN, R.G. Characterization of watermelon mosaic virus strains by serology and other properties Phytopathology 59: 809-818. 1969.
- PEMBERTON, A.W. & FROST, R.R. Celery mosaic virus in England Plan. Path. 23: 20-24. 1974.
- POOLE, R.F. Celery mosaic. Phytopathology 12: 151-154. 1922.
- PURCIFULL, D.E. & SHEPARD, J.F. Western celery mosaic virus in Florida celery. Plant Dis. Rptr. 51: 502-505. 1967.
- PURCIFULL, D.E. & BATCHELOR, D.L. Immunodiffusion tests with sodium dodecyl sulfate (SDS) treated plant viruses as plant viral inclusions. Agr. Exp. Station Bulletin nº 788 University of Florida, Gainesville, 39 p. 1977.
- SEVERIN, H.H.P. & FREITAG, J.H. California celery mosaic diseases. Phytopathology 25: 891..1935.
- SEVERIN, H.H.P. & FREITAG, J.H. Western celery mosaic. Hilgardia 11: 493-558. 1938.
- SHEPARD, J.F. & GROGAN, R.G. Partial purification an serology of western celery mosaic virus. Phytopathology 57: 1.104-1.110. 1967a.

- SHEPARD, J.F. & GROGAN, R.G. Seroliagnosis of western celery mosaic virus by double-diffusion tests in agar. *Phytopathology* 57: 1.136-1.137. 1967b.
- SHEPARD, J.F. & GROGAN, R.G., Celery mosaic virus. C.M.I./A.A. B. Descriptions of Plant viruses. n° 50. 1971.
- SHEPHERD, R.J. & POUND, C.S. Purification of turnip mosaic virus. *Phytopathology* 50: 797-803. 1960.
- SMITH, K.M. A textbook of plant virus diseases. 3rd Ed. London. Longman Group Limited. 1972.
- SNYDER, W.C. & RICH, S. Mosaic of celery caused by the virus of alfafa mosaic. *Phytopathology* 32: 537-539. 1942.
- TOMLINSON, J.A. & WARD, C.M. The reactions of swede(*Brassica napus*) to infections by turnip mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* 89: 61-69. 1978.
- VAN REGENMORTEL, M. H._V. Separation of an antigenic plant protein from preparations of plant viruses. *Phytopathology* 54: 282-289. 1964.
- VEERISSETTY, V. & BRAKKE, M.K. Purification of some legume carlaviruses. *Phytopathology* 68: 59-64. 1978.
- WALKEY, D. G.A. & COOPER, V.C., Effect of western celery mosaic on celery crops in Britain and occurrence of the virus in Umbelliferous weeds. *Plant. Dis. Rptr.* 55: 268-271. 1971.
- WALKEY, D.G.A., TOMLINSON, J.A. & FROWD, J.A. Occurrence of western celery mosaic virus in Umbelliferous crops in Britain. *Plant. Dis. Rptr.* 54: 370-371. 1970.
- WELLMAN, F.L. Identification of celery virus 1, the cause of southern celery mosaic. *Phytopathology* 24: 695-725. 1934.
- WETTER, C. Potato virus S. C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses. n° 60. 1971.