

REVISTA

CERES

DIRETORES

Prof. Edson Potsch Magalhães
Prof. Arlindo P. Gonçalves
Prof. Joaquim Matoso
Prof. Jurema Soares Aroeira
Prof. J. M. Pompeu Memória

Julho de 1951 a Agosto de 1952

VOL. IX || N. 49

VIÇOSA — MINAS

Caixa Postal, 4—UREMG—E. F. Leopoldina

O Estudo da Transmissão Espontânea de Doenças de Virus

KARL M. SILBERSCHMIDT (*)

Os conhecimentos atuais sobre a maneira de transmissão *espontânea* de muitas doenças de virus das plantas são ainda bastante vagos e incompletos. É isso muito surpreendente, porque no caso de muitos virus se conhece um método eficiente de transmissão *experimental*. Mas, mesmo de muitos daqueles virus, que no laboratório sabemos transmitir com facilidade, se desconhece o modo da sua transmissão espontânea. Isso até é verdade com relação ao virus do mosáico do fumo que foi o primeiro virus descrito, em terminologia científica, na literatura e constitui certamente um dos virus mais bem estudados, sob vários aspectos. Vamos explicar, por isso, justamente para o caso do mosáico do fumo, que o domínio de uma técnica eficiente de transmissão experimental não é bastante para descobrir a maneira natural da transmissão de um virus. *Adolph Mayer* (10) estudando em 1886 na vizinhança de Amersfoort (Holanda), uma doença de fumo que era conhecida lá já há tempo sob o nome de roest (ferrugem) ou bont (variegação) e que causou grandes prejuízos às culturas, teve a genial idéia de macerar folhas de plantas doentes no almofariz, de encher capilares de vidro com esse macerado de folhas doentes e de enfiar as agulhas nas nervuras de folhas de plantas sadias. 10 até 11 dias depois dessa operação ele verificou que 9 de 10 plantas tratadas desta maneira começaram exibindo, nas folhas novas, sintomas do mosáico.

(*) Do Instituto Biológico, São Paulo.

Desta maneira, A. *Mayer* tinha idealizado um método de transmissão experimental da doença, chamada por ele de "mosáico", do fumo. Este método de inoculação, com suco prensado de folhas de plantas doentes, foi desde então bastante aperfeiçoado e simplificado, especialmente pelas sugestões de F. O. *Holmes* (5), constituindo, porém, até hoje, o processo básico para os inúmeros estudos que se relacionam com o vírus do mosáico do fumo. Mas, no seu trabalho, A. *Mayer* não visava, absolutamente descobrir, como, nas condições naturais do campo, a doença se espalha e nem hoje em dia, quase 70 anos depois da descrição do mosáico do fumo por A. *Mayer*, todos os detalhes dessa propagação natural são conhecidos.

Para que haja disseminação natural de uma doença de vírus não podem faltar — como *Bawden* (1) expõe no seu tratado — os 3 fatores essenciais:

1) focos de infecção; 2) vetores do vírus, 3) mobilidade acentuada desses vetores, que garante o contato, em sucessão rápida, entre vetor virulífero e plantas sadias. Os primeiros estudos sobre a disseminação natural do mosáico do fumo foram dedicados ao segundo destes fatores, aos vetores ou mais especificamente ao homem, já que se sabia, desde o trabalho de A. *Mayer*, que o homem pode agir como vetor. Primeiramente, os resultados de A. *Mayer* foram confirmados, em 1903, por observações de F. W. T. *Hunger* (6), que mostrou que para produzir infecção numa planta sadia de fumo não é necessário tratá-la com suco prensado de pés doentes, mas que o contato da folha de uma planta sadia pela mão de um operador que antes tinhá tocado em planta atacada por mosáico, é suficiente para a transmissão do mosáico. Seguindo esta mesma pista, *Hunger* (7) mais tarde verificou que os próprios operários, ao ministrar os tratos culturais necessários ou benéficos para a cultura de fumo (transplante, desponta, retirada de lagartas) agem como vetores da doença. Frizou ainda o mesmo autor que operários míopes, inclinados a tocar planta por planta, contribuem, em escala especialmente elevada, para a disseminação da doença. Estas observações não deixaram dúvidas a respeito do papel importante do homem na disseminação do mosáico do fumo no campo. Estas observações foram confirmadas e ainda completadas por estudos realizados em 1927 por W. D. *Valleau* and E. M. *Johnson* (17). Mostraram esses autores que até no fumo curado pode conservar-se o poder infeccioso do mosáico e que operários acostumados a mascar fumo ou fumar cigarros podem, pelo contato da mão, espalhar o mosáico nas plantações de fumo. A resultados

idênticos chegaram mais tarde G. H. *Berkeley*, (2), no Canadá e A. M. *Offermann* (11), na Argentina. Ficou patente por êsses estudos que o homem não é apenas vetor daquela fonte de vírus já existente na plantação, mas que introduz nas plantações outros focos provenientes, p. e., de fumo manufaturado. Centralizou-se desta maneira o interesse principalmente na questão dos focos de infecção. Ao atacar êsse problema procurou-se explicar porque em todo mundo quase não há plantação de fumo, por mais pequena que seja, onde não aparecessem pelo menos alguns casos do mosáico. Para elucidar êsse problema muito contribuiram os estudos de J. *Johnson*, (8), efetuados no ano de 1937, que demonstrou que o vírus incorporado ao solo (pela decomposição de raízes e fôlhas de plantas doentes) pode conservar, durante dois anos, a sua atividade e que mudas sadias de fumo, se desenvolvendo em tal solo contaminado, podem contrair a doença. O mesmo problema do foco, mas de um outro ângulo, foi estudado em 1939 por K. *Silberschmidt* e M. *Kramer* (14), que averiguaram que ervas daninhas, especialmente as pertencentes à família das Solanáceas, podem tornar-se hospedeiras do mosáico de fumo e formar focos do vírus dentro das plantações. Por êsses trabalhos e os de vários outros autores tornou-se mais compreensível a questão de "hibernação" do vírus e a ocorrência de infecções em plantações isoladas e bem cuidadas. Mesmo assim, muitos problemas relacionados com a transmissão espontânea do mosáico do fumo no campo não ficaram bem esclarecidos e damos razão aos autores que acham que justamente os problemas centrais ainda continuam sem solução. Isso se refere em primeiro lugar à questão da transmissão do mosáico do fumo por insetos. A grande maioria dos vírus facilmente transmissíveis por suco e de disseminação quase universal são transmitidos também por insetos. Para muitos vírus os insetos constituem vetores bastante eficientes. Era por isso de se esperar que também o mosáico do fumo, em condições naturais, fosse transmitido por insetos vetores e numerosos autores dedicaram-se ao trabalho de descobrir os eventuais vetores dessa doença.

Os agentes de diversas outras doenças de vírus do fumo são transmitidos por ofídios da espécie *Myzodes persicae* (Sulz.)¹⁾ syn. *Myzus persicae* (Sulz.) e assim no ano 1931 I. A. *Hoggan* (4) tentou, em vários ensaios muito bem

1) nomenclatura nova de acordo com K. *Heinze*, Die Überträger pflanzlicher Viruskrankheiten, Mitt. Biol. Zentralanstalt f. Land = u. Forstw. 1591, Heft 71.

delineados, transmitir o mosáico por meio dêsse ofídio, de plantas doentes a plantas sadias de fumo. Nêstes ensaios foram sempre obtidos resultados negativos. 3 outras espécies de afídios, porém, *Myzus pseudosolani*, hoje *Aulacorthum pseudosolani* (Theob.), *Macrosiphum solanifolii* (Aschm) e *Myzus* (hoje *Neomyzus*) *circumflexus* (Buckt), submetidos por *Hoggan* a ensaios semelhantes, mostraram-se capazes de transmitir o vírus do mosáico do fumo, do tomateiro doente para o fumo sadio, mas não do fumo para o fumo. Em ensaios de transmissão, de tomate para fumo, *Aulacorthum pseudosolani* até provou ser um vetor bastante eficiente. Todos êstes resultados são muito interessantes do ponto de vista da transmissão experimental, mas deixam bem claro quão pouco sabemos até hoje em dia sobre a maneira da disseminação natural, mesmo de um vírus tão bem estudado. Não sabemos, por exemplo, se devemos ou não atribuir importância a esta transmissão do mosáico do fumo por afídios de tomateiros para plantas de fumo. Não sabemos, também, porque o vírus do mosáico do fumo, um agente tão infeccioso, não é transmitido pelo afídio *Myzodes Persicae*. Finalmente também não podemos afirmar se talvez outros insetos, menos estudados até agora, agem como vetores naturais do mosáico do fumo. R. *Gigante* (3), baseando-se em ensaios experimentais de transmissão realizados no ano 1938, considera *Macrosiphum gei* (talvez sinônimo de *Macrosiphum solanifolii*) um vetor do mosáico, mesmo entre plantas de fumo. H. J. *Walters* (18), depois de frizar que até agora ainda faltam provas seguras da transmissão do mosáico do fumo por insetos — pelo menos em condições de campo — mostra em estudos efetuados recentemente (1951) que um gafanhoto, *Melanophus differentialis* (Thos.), sob condições experimentais, é capaz de transmitir o mosáico do fumo entre plantas dessa espécie. No fim do trabalho o autor esclarece que a importância da transmissão dêsse vírus por gafanhotos, em condições de campo, não foi ainda estudada.

Essas referências chegam para mostrar que o problema da disseminação natural do mosáico do fumo — problema esse essencial para um combate eficiente — está longe de estar completamente esclarecido.

Referimo-nos inicialmente ao mosáico de fumo por pertencer o agente causador dessa doença ao grupo dos vírus facilmente transmissíveis por suco, grupo esse que menos dificuldades oferece para estudos de transmissão. Mas, também a respeito da disseminação natural de vários outros vírus dêsse grupo há ainda muitos problemas para resolver.

Não se sabia, por exemplo, durante muito tempo, de que maneira é transmitido em condições naturais o vírus X da batatinha, um dos vírus responsáveis pelo fenômeno da "degenerescência" da batatinha. Este vírus da mesma maneira como o do mosáico do fumo pode ser transmitido com facilidade, experimentalmente, por suco ou por contato, de planta doente à sadias. Mas não se podem apontar com segurança insetos como vetores deste vírus e não se pode explicar facilmente como este vírus se disseminou em escala tão larga e universal, que de certas variedades de batatinha a totalidade dos tubérculos mostra-se infecionada com esse vírus.

J. B. Loughnane and P. A. Murphy (9), averiguaram que o contato entre as folhas de plantas sadias e doentes, como existe em plantações onde a distância entre os pés é pequena, pode ser responsabilizado, em parte, pela propagação natural da doença. A ação do vento, provocando um contato brusco e repentino entre as folhas e causando leves lesões da superfície, favorece ainda esta maneira da transmissão natural. Não acreditavam, os mencionados autores, que uma infecção também pudesse resultar do contato entre as partes subterrâneas das batatinhas. Mais tarde, isto é, em 1946, F. M. Roberts (13) provou que também em condições em que o contato entre partes aéreas das plantas é impossibilitado por barreiras e em que insetos são excluídos, se verifica uma disseminação da doença dos pés doentes para os sadios. Deve-se admitir neste caso, então, uma disseminação por contato entre as partes subterrâneas. Esse tipo de disseminação natural de doenças de vírus só foi estudado, com técnica apropriada, nos últimos anos. Assim, por exemplo, segundo uma publicação bem recente (1952) W. D. Thomas Jr. and R. R. Baker (16) plantaram, em repetidas séries, no mesmo vaso, um cravo (*Dianthus barbatus*) sadio e outro atacado pelo mosáico. Para excluir um contato entre as partes aéreas das plantas, estas estavam separadas por chapas de vidro e a terra do vaso estava coberta por uma camada de parafina. Dentro de dois meses todas as plantas sadias de cravo que cresciam em vasos ao lado de plantas doentes, tinham contraído a doença. Essas experiências foram executadas em estufas a prova de insetos. Um exame anatômico das partes subterrâneas revelou a ocorrência de muitas "enxertiais naturais" entre as raízes das plantas sadias e doentes.

Experiências semelhantes já tinham sido executadas em 1941 por E. van Slogteren e M. de Bruyn Ouboter (15) com relação a uma doença de vírus das tulipas responsável pelo colorido ornamental ("breaking") das pétalas. Fileiras

de tulipas sadias (quer dizer com flores de uma só cor) foram plantadas ao lado de tulipas "mosaicadas", tomando-se o cuidado de evitar o contato entre as partes aéreas pela instalação de barreiras. No ar livre houve nestas condições passagem da doença para as plantas antes sadias, mas não em estufas à prova de insetos. Desses ensaios tirou-se então a conclusão, que em condições naturais a doença não se dissemina por contato de raízes, mas sim por insetos.

Esses poucos exemplos deviam ser suficientes para mostrar, que sem dispôr de numerosas observações e de resultados de experiências especialmente delineadas para este fim, nada se pode dizer sobre a maneira da disseminação natural, mesmo daqueles vírus cuja transmissão experimental no laboratório não oferece a menor dificuldade.

Mais demorados se tornam ainda os estudos quando se trata de investigar o modo de disseminação natural dos vírus não transmissíveis por suco. Para caracterizar um dos caminhos que pode ser seguido em tais casos, vou esboçar aqui as etapas que percorremos nos nossos estudos, realizados em colaboração com A. Orlando (12), e publicados em 1946, sobre a transmissão espontânea do vírus da "Clorose Infectiosa" das Malváceas. No início deste século numerosos pesquisadores, principalmente na Alemanha e nos Estados Unidos, tinham-se ocupado com esta doença, originalmente observada em plantas de *Abutilon*, provenientes da América Central. Esses autores verificaram que a "Clorose Infectiosa" podia ser transmitida para plantas sadias, de várias espécies de Malváceas, mas exclusivamente por meio de enxertia. Assim, a doença até passou sendo considerada exemplo típico daquelas enfermidades de vírus que só podem ser propagadas por meio de enxertia. Há uns 15 anos atrás fomos levados a estudar a maneira da transmissão natural desta doença no Brasil, por observar aqui com muito grande frequência, nos representantes da vegetação espontânea nos arredores de S. Paulo, Malváceas apresentando sintomas bem parecidos com aqueles descritos como característicos da "Clorose Infectiosa". Achamos curioso que uma doença, transmissível segundo a opinião dos pesquisadores competentes só por enxertia, fosse tão frequente entre ervas daninhas como vassourinha *Sida acuta* Burm. *carpinifolia* (L.) K. Schum.) e guaxuma (*Sida rhombifolia* L.), que normalmente ninguém pensaria em enxertar. Suspeitamos que, pelo menos aqui no Brasil, a doença fosse transmitida por uma ou várias espécies de insetos. Resolvemos então verificar se esta hipótese de trabalho correspondia à realidade. Primeiramente, fizemos em pequenas áreas bem

delimitadas do nosso campo experimental, cobertas por vegetação espontânea, observações periódicas visando um levantamento de novos casos da doença entre as Malváceas. Verificamos que novos casos apareceram com certa frequência e que a sua distribuição nas áreas escolhidas era irregular, quer dizer uma planta recentemente infeccionada não estava sempre na imediata vizinhança de uma planta já doente. Estas observações falam a favor da nossa suspeita da existência de um inseto vetor da doença, mas sem fornecer uma prova definitiva. Passamos então a organizar ensaios mais específicos. Duas áreas, de superfície igual, e ambas isentas de outra vegetação, foram plantadas com mudas de *Sida rhombifolia*. Na área 1 o plantio foi realizado só com mudas sadias, na área 2 foram plantados pés doentes entre as fileiras de plantas sadias. Observamos que na área 2 a doença se espalhou mais rapidamente do que na área 1. Também este resultado pode ser facilmente explicado admitindo-se a ocorrência de um inseto vetor, para o qual os pés doentes servem de fonte de vírus. Delineamos ainda outra experiência, plantando mudas sadias de *Sida rhombifolia* em vasos de barro contendo terra. Estes vasos foram colocados sobre bases apropriadas, no centro de grandes tinas de madeira cheias de água e postas no campo. Formaram assim os vasos contendo as mudas de *Sida* ilhas acessíveis só a insetos voadores. Já um mês depois da colocação dessas "ilhas" no campo, verificamos em um dos vasos o primeiro caso de "Clorose Infecciosa". Tiramos desse resultado a conclusão que o inseto responsável pela disseminação do vírus da "Clorose Infecciosa", em nossas condições, deveria ser alado, isto é, pertencer à subclasse Pterygota.

Começou então o trabalho difícil e demorado de tentar descobrir qual era a espécie (ou o grupo de espécies de insetos) responsável pela transmissão. Para esta finalidade, insetos cada vez de uma só espécie, tinham que ser coletados no campo, com preferência sobre plantas doentes de *Sida*, e transferidos para plantas sadias desta mesma espécie, cultivadas na estufa e protegidas por mangas de vidro. Para dar uma idéia sobre a paciência necessária para esse tipo de trabalho basta dizer que as 20 primeiras espécies de insetos, que testamos durante um lapso de tempo de 3 anos, provaram nada ter a ver com a transmissão da "Clorose Infecciosa" das Malváceas. Todos os ensaios de transmissão, executados com os insetos dessas 20 espécies, deram constantemente resultados negativos. Finalmente, submetemos ao mesmo teste também moscas brancas, pertencentes a

espécie *Bemisia Tabaci* (Genn) (*Homoptera-Aleurodidae*) e coletadas sobre plantas doentes de *Sida rhombifolia* e os insetos dessa espécie — que constituem parcela muito pequena da população total dos insetos normalmente encontrados sobre plantas de *Sida* — de fato transmitiram a “Clorose Infectiosa” para as nossas plantas, protegidas contra outros insetos por mangas de vidro. Ficou assim esclarecida uma questão que durante meio século tinha preocupado os virologistas. Em condições espontâneas do campo, são insetos que transmitem a doença para plantas de vassourinha e de guaxuma e provavelmente para outras Malváceas. A mosca branca que, baseados nas nossas experiências, pudemos apontar como inseto-vetor, é encontrada de preferência em países quentes e não foi ainda assinalada em países de clima temperado. E’ essa provavelmente a razão porque nos países em que os primeiros estudos sobre a “Clorose Infectiosa” foram executados, não se verificou uma transmissão espontânea dessa doença.

Mas, nem para as nossas condições aqui podemos afirmar, que pelos nossos estudos, o problema da transmissão natural da “Clorose Infectiosa” já estivesse completamente resolvido. Não sabemos ainda se a espécie, averiguada por nós como vetor da doença, é a única responsável pela transmissão ou se há, ao lado dela, outras eventualmente mais eficientes que até agora não chamaram sobre si a atenção dos investigadores. Parece, além disso, que nem todas as variantes do vírus da “Clorose Infectiosa” das Malváceas podem ser transmitidas pela espécie *Bemisia Tabaci*. Assim, p. e., não conseguimos, por enquanto, com este inseto, transmitir a doença a partir de *Abutilon Thompsonii*, espécie essa cultivada em larga escala nos Estados Unidos e na Europa e originalmente proveniente de Jamáica. E’ possível que o vírus causador da doença nessa espécie seja ligeiramente diferente das demais variantes do vírus da “Clorose Infectiosa”, e que seja transmitido por um inseto, abundante apenas no país de origem de *Abutilon Thompsonii*.

O exemplo dos nossos estudos relativos a transmissão espontânea da “Clorose Infectiosa” das Malváceas mostra assim bem a complexidade de trabalhos desta natureza. Informações seguras sobre a disseminação espontânea de doenças de vírus podem ser obtidas só por um conjunto de numerosas observações no campo e de demorados estudos no laboratório. Já que para o experimentador do laboratório é às vezes muito penoso extender o seu raio de ação ao campo e já que falta frequentemente ao naturalista do campo um treino nos métodos de laboratório, há ainda grandes

lacunas nos nossos conhecimentos atuais sobre a maneira da disseminação espontânea das doenças de vírus. É essa a razão porque considero o problema especialmente atraente para os jovens agrônomos, que a par de métodos modernos de laboratório conservaram o seu interesse nos fenômenos que ocorrem nas culturas de plantas econômicas e na vegetação espontânea.

B I B L I O G R A F I A

- 1) *Bawden, F. C.* — Plant viruses and virus diseases, Third Edition Waltham Mass., Chronica Botanica Company, 1950, 335 pg.
- 2) *Berkeley, G. H.* — Tobacco mosaic in Ontario and Quebec. Sci. Agric., 1942, 22: 465-478.
- 3) *Gigante, R.* — Il mosaico del tabacco. Bolettino della R. Stazione di Patologia vegetale di Roma, 1938, 18: 1-39.
- 4) *Hoggan, I. A.* — Further studies on aphid transmission of plant viruses, Phytopath. 1931, 21: 199-211.
- 5) *Holmes, F. O.* — Inoculating methods in tobacco mosaic studies, Bot. Gazette, 1929, 87: 56-63.
- 6) *Hunger, F. W. T.* — Over de verspreiding der Mozaiekziekte op een tabaksveld. Handelingen v. h. 7 de Vlaamsch Natuur en Geneeskundig Congres 1903, 1-4.
- 7) *Hunger, F. W. T.* — Untersuchungen und Betrachtungen über die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze, Zschr. f. Pflanzenkrankheiten, 1905, 15: 1 - 55, (aqui pg. 31).
- 8) *Johnson, J.* — Factors relating to the control of ordinary tobacco mosaic, Journ. of Agric. Research, 1937, 54: 239-273.
- 9) *Loughnane, J. B. and Murphy P. A.* — Dissemination of potato viruses X and F by leaf contact. Sci. Proc. Roy. Dublin Soc. 1938, N. s., 22: 1-15.
- 10) *Mayer, A.* — Über die Mosaikkrankheit des Tabaks. Die Landwirtschaftlichen Versuchs-Stationen, 1886, 32: 451-466. (em inglês, Phytopath. Classies 7 (11) — (24), 1942.

- 11) *Offermann, A. M.* — Determinación del "Nicotiana virus 1" en tabacos manufaturados y productos inseticidas. Rev. Arg. de Agronomía, 1943, 10: 268-274.
- 12) *Orlando A. e K. Silberschmidt* — Estudos sobre a disseminação natural do vírus da "Clorose Infeciosa" das Malváceas (Abutilon virus 1. Baur) e a sua relação com o inseto-vetor "Bemisia Tabaci (Genn.)" Homoptera-Aleyrodidae. Arqu. do Inst. Biol. 1946, 17: 1-36.
- 13) *Roberts, F. M.* — Underground spread of potato virus X. Nature 1946, 158: 663.
- 14) *Silberschmidt K. e M. Kramer* — A disseminação do mosaico do fumo no campo. Arqu. do Instituto Biológico, 1939, 10: 61-72.
- 15) Van *Slogteren E. en M. P. de Bruyn Ouboter* — Onderzoeken over virus-ziekten in bloembolgewassen II. Tulpen I. Mededeelingen van de Landbouwhoogeschool te Wageningen 1941, Deel 45, Verhandeling 4: 54 pg.
- 16) *Thomas W. D. Jr. and R. R. Baker* — Root transmission of carnation mosaic virus. Phytopath. 1952, 42: 21.
- 17) *Valleau W. D. and E. M. Johnson* — Commercial tobacco and cured leaf as a source of mosaic disease in tobacco. Pyztopath. 1927, 17: 513-522.
- 18) *Walters H. J.* — Grasshopper transmission of three plant viruses. Science 1951, 113: 36-37.