

PURIFICAÇÃO E SOROLOGIA DE RAÇAS DE "COWPEA SEVERE MOSAIC
VIRUS" ISOLADAS DE LEGUMINOSAS QUE VEGETAM NO
NORDESTE BRASILEIRO

MARIA DE FÁTIMA RODRIGUES VASCONCELOS

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, COM ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
EM FITOTECNIA, COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - 1982

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Agronomia, com área de concentração em Fitotecnia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Maria de Fátima Rodrigues Vasconcelos

DISSERTAÇÃO APROVADA EM

Prof. José Albérico de Araújo Lima
Orientador da Dissertação

Prof. Francisco Valter Vieira

Prof. José Júlio da Ponte

Aos meus pais AVELINO e FRANCISCA,
Ao meu esposo SÉRVULO HEBER,
Aos meus filhos DIEGO ANDRÉ,
CARLO SÉRVULO e
LUIZ HENRIQUE

D E D I C O

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pela oportunidade concedida para realização do curso e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através do PICD, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Juvenal Lamartine Neto, pelo apoio dado durante o curso e a este trabalho.

Ao professor Dinarte Aeda da Silva, Chefe do Departamento Agropecuário do Centro de Tecnologia da UFRN, pela compreensão demonstrada.

Ao professor José Albérico de Araújo Lima, pela orientação, dedicação e compreensão.

Ao professor Clairton Martins do Carmo, pelo incentivo dado.

Aos professores Pedro Fernandes Pereira e Elaine Rezende Pereira, pelo incentivo e apoio.

Aos professores José Júlio da Ponte e Francisco Valter Vieira, pelas sugestões apresentadas na redação e feição gráfica do trabalho.

Ao Departamento de Bioquímica, especialmente ao professor Renato Azevedo Moreira, pela ajuda no uso de equipamentos.

Ao Departamento de Zootecnia, pela colaboração durante a realização deste trabalho.

Ao meu esposo Sêrvulo Heber, pelo incentivo, compreensão, paciência e amor demonstrados durante o curso e este trabalho.

Aos meus pais Avelino e Francisca, pelo carinho e apoio dados.

A Silene Barbosa da Silva Santos, Secretária do Departamento Agropecuário do Centro de Tecnologia da UFRN.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE TABELAS</u>	vii
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	viii
<u>RESUMO</u>	x
<u>ABSTRACT</u>	xi
1 - <u>INTRODUÇÃO</u>	1
2 - <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	8
2.1 - <u>Fontes de Vírus</u>	8
2.2 - <u>Isolamento dos Vírus</u>	8
2.3 - <u>Transmissão Mecânica</u>	13
2.4 - <u>Círculo de Hospedeiras</u>	13
2.5 - <u>Purificação</u>	14
2.6 - <u>Sorologia</u>	16
3 - <u>RESULTADOS</u>	19
4 - <u>DISCUSSÃO</u>	35
5 - <u>CONCLUSÕES</u>	41
6 - <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	43

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Reações sintomatológicas apresentadas por diferentes espécies vegetais inoculadas com raças de "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV), isoladas de <i>Canavalia brasiliensis</i> , <i>Canavalia ensiformis</i> , <i>Phaseolus lathyroides</i> e <i>Vigna unguiculata</i>	33
2	Plantas diferenciadoras para raças de "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV), isoladas de <i>Canavalia brasiliensis</i> , <i>Canavalia ensiformis</i> , <i>Phaseolus lathyroides</i> e <i>Vigna unguiculata</i>	34

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Plantas de <i>C. brasiliensis</i> (A) e <i>C. ensiformis</i> (B) com sintomas de mosaico, das quais foram isoladas duas raças de "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV): CpSMV-Cb e CpSMV-Ce, respectivamente	10
2	Plantas de <i>P. lathyroides</i> (A) e <i>V. unguiculata</i> (B) com sintomas de mosaico, das quais foram isoladas duas raças de "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV): CpSMV-P1 e CpSMV-Vu, respectivamente	12
3	Curva de absorção ao ultra-violeta obtida com a solução purificada de uma raça de "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV), isolada de <i>C. brasiliensis</i> e designada de CpSMV-Cb	20
4	Curva de absorção ao ultra-violeta obtida com a solução purificada de uma raça de "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV), isolada de <i>C. ensiformis</i> e designada de CpSMV-Ce	21
5	Curva de absorção ao ultra-violeta obtida com a solução purificada de uma raça de "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV), isolada de <i>P. lathyroides</i> e designada de CpSMV-P1	22
6	Curva de absorção ao ultra-violeta obtida com a solução purificada de uma raça de "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV), isolada de <i>V. unguiculata</i> e designada de CpSMV-Vu	23

Figura

Página

- 7 Testes sorológicos de dupla difusão em meio de agar, contendo: 0,85% de agar noble, 0,85% de NaCl e 0,01% de NaN_3 , para demonstrar o relacionamento sorológico entre raças de "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV), isoladas de *C. brasiliensis*, *C. ensiformis*, *P. lathyroides* e *V. unguiculata*, designadas de: CpSMV-Cb, CpSMV-Ce, CpSMV-Pl e CpSMV-Vu, respectivamente 27
- 8 Plantas de *Glicine max* "IAC-2" inoculadas mecanicamente com raças de "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV), isoladas de *C. brasiliensis* (A) e *C. ensiformis* (B), apresentando sintomas típicos de mosaico severo (A) e mosaico leve (B) 29
- 9 Plantas de *Glicine max* "IAC-2" inoculadas mecanicamente com raças de "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV), isoladas de *P. lathyroides* (A) e *V. unguiculata* (B), apresentando sintomas típicos de mosaico 31

RESUMO

Quatro vírus isolados de plantas de *Canavalia brasiliensis*, *C. ensiformis*, *Phaseolus lathyroides* e *Vigna unguiculata* reagiram contra anti-soro específico para "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV), previamente isolado no Ceará. Isolados de lesão única dos vírus obtidos de *C. brasiliensis*, *C. ensiformis* e *V. unguiculata* foram obtidos de lesões necróticas localizadas, induzidas em *P. vulgaris*, enquanto que o vírus obtido de *P. lathyroides* foi reisolado a partir de lesões induzidas em *Chenopodium amaranticolor*. Referidos vírus foram multiplicados em suas respectivas hospedeiras originais, a partir das quais foram purificados através do método de purificação com *n*-butanol e precipitação de vírus com polietilenoglicol. Após examinadas ao espectrofotômetro, as preparações purificadas foram usadas na imunização de coelhos pela técnica de inoculação na pata trazeira, para produção de anti-soros específicos para os vírus. Estudo de propriedades sorológicas e biológicas indicaram que os mesmos são relacionados, porém distintos, podendo ser considerados raças ou estirpes de CpSMV, assim designadas: CpSMV-Cb, isolada de *C. brasiliensis*; CpSMV-Ce, isolada de *C. ensiformis*; CpSMV-P1, isolada de *P. lathyroides* e CpSMV-Vu, isolada de *V. unguiculata*. Testes de reciprocidade em dupla difusão em agar, indicaram diferenças sorológicas, através da formação de esporão, entre as raças: CpSMV-Cb x CpSMV-P1, CpSMV-Cb x CpSMV-Vu, CpSMV-Ce x CpSMV-P1, CpSMV-Ce x CpSMV-Vu e CpSMV-P1 x CpSMV-Vu. Por outro lado, CpSMV-Cb e CpSMV-Ce mostraram-se sorologicamente idênticas, embora apresentem diferenças biológicas com relação ao círculo de hospedeiras.

ABSTRACT

Four viruses isolated from plants of *Canavalia brasiliensis*, *C. ensiformis*, *Phaseolus lathyroides* e *Vigna unguiculata* reacted against antiserum specific to cowpea severe mosaic virus (CpSMV) previously isolated in Ceará. Single lesion isolates of the viruses obtained from *C. brasiliensis*, *C. ensiformis* and *V. unguiculata* were obtained from localized necrotic lesions induced in *P. vulgaris*, while the virus originally obtained from *P. lathyroides* was reisolated from lesions induced in *Chenopodium amaranticolor*. Those viruses were multiplied in their respective original hosts, from which they were purified through the method of purification with n-butanol and virus precipitation with polyethylenoglicol. After examination in the spectrophotometer, the purified preparations were used in a rabbit immunization by the foot pad inoculation technique, to produce specific antisera for the viruses. Studies of serological and biological properties, indicated that they are related, but distinct, which may be considered as strains of CpSMV, designated as follow: CpSMV-Cb, isolated from *C. brasiliensis*; CpSMV-Ce, isolated from *C. ensiformis*; CpSMV-P1, isolated from *P. lathyroides* and CpSMV-Vu, isolated from *V. unguiculata*. Reciprocal double diffusion tests in agar gel indicated serological differences by spur formation, between the strains: CpSMV-Cb x CpSMV-P1, CpSMV-Cb x CpSMV-Vu, CpSMV-Ce x CpSMV-P1, CpSMV-Ce x CpSMV-Vu and CpSMV-P1 x CpSMV-Vu. On the other hand, CpSMV-Cb and CpSMV-Ce showed to be serologically identical although they presented biological differences in relation to host range.

1 - INTRODUÇÃO

O feijão-de-corda, também conhecido por caupi e feijão macassar, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (= *Vigna sinensis* (Endl) L.), é uma leguminosa herbácea anual, nativa da África Central, onde formas silvestres são encontradas até hoje. Referida leguminosa vem sendo cultivada pelo homem, como alimento, desde tempos antigos na África, Ásia e Europa. É, provavelmente, o *Phaseolus* mencionado pelos escritores romanos (MORSE, 1924).

A Nigéria e a Níger, na África Central, foram os primeiros países a cultivarem o feijão-de-corda (MARTIN et al., 1975). Atualmente muitos outros países da África, Sul da Ásia, América do Norte (Estados Unidos) e América do Sul (Brasil) também cultivam o feijão-de-corda, quer para a alimentação humana, quer como planta forrageira ou adubo verde.

No Brasil, o feijão-de-corda é cultivado em grande escala nas regiões Norte e Nordeste. Na Região Nordeste, é a cultura de maior importância econômica e social, vez que constitui a principal fonte de proteína na alimentação da população rural.

Cultivado, via de regra, nos solos mais pobres do Nordeste, em consorciação com outras culturas (milho e algodão arbóreo), sofrendo constantes ataques de pragas e doenças, além de irregularidades pluviométricas, o feijão-de-corda apresenta uma baixa produtividade.

As viroses são de grande importância para essa cultura, podendo os vírus constituírem-se em fator limitante para a sua produção, dependendo da variedade cultivada, época da infecção, do vírus e/ou da raça que a está infetando (KUHN et al., 1966; BOCK, 1973; PHATAK, 1974; LIMA & NELSON, 1977 e LIMA, 1978). No Nordeste brasileiro, as viroses são consideradas as principais doenças do feijão-de-corda, destacando

-se aquela ocasionada pelo "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV), identificado por LIMA & NELSON (1977) como o patógeno de ocorrência mais constante no Nordeste brasileiro e que mais afeta a produção desta leguminosa na região. Em estudos realizados para avaliar os efeitos do CpSMV na produtividade de feijão-de-corda no Estado do Ceará, Brasil, GONÇALVES & LIMA (1982) constataram perdas de até 81% no peso total de sementes.

Segundo DE JAGER (1979), o primeiro assinalamento do CpSMV foi, possivelmente, realizado por SMITH (1924), nos Estados Unidos da América, ao relatar um vírus do feijão macassar, *V. unguiculata*, transmitido pelo besouro *Cerotoma trifurcata* Forst. Mais tarde, DALE (1949) descreveu um vírus observado em Trinidad, com o nome de "cowpea mosaic virus" (CPMV) e CHANT (1959) referiu-se à incidência de um outro vírus em feijão-de-corda na Nigéria, o qual denominou de "cowpea yellow mosaic virus" (CYMV).

Testes de imunodifusão dupla em agar mostraram que isolados de CPMV obtidos em Arkansas e em Trinidad eram sorologicamente relacionados, porém, distintos (SHEPHERD, 1963). Estudando outras propriedades de diferentes isolados de vírus, SHEPHERD (1964) confirmou uma estreita semelhança do vírus isolado em Arkansas com o isolado em Trinidad por DALE (1949). Estudos detalhados com três isolados de CPMV obtidos no Suriname, em associação com as informações sobre os vírus anteriormente isolados do feijão-de-corda em Trinidad (DALE; 1949) e Nigéria (CHANT, 1959, 1961, 1962), indicaram tratar-se de três raças de CPMV (AGRAWAL, 1964). A proposição feita por AGRAWAL (1964) foi aceita por vários anos e adotada, inclusive, por VAN KAMMEN (1971), na publicação nº 47 de "Descriptions of Plant Viruses", sob o título "Cowpea Mosaic Virus". PÉREZ & CORTÉS - MONLLOR (1970) identificaram um vírus do feijão-de-corda semelhante àquele descrito por SHEPHERD (1964).

Resultados de estudos desenvolvidos por SWAANS & VAN

KAMMEN (1973) mostraram a distinção entre a raça severa ("severe strain") e a raça amarela ("yellow strain") de "cowpea mosaic virus", cuja denominação foi usada por muito tempo para ambas as raças. Depois de vários estudos comparativos, a separação destas duas raças em dois vírus distintos, membros do mesmo grupo (COMOVIRUS), foi sugerida com base em diferenças no círculo de hospedeiras, sintomatologia, sorologia, inativação térmica e proporções dos seus componentes, então examinados através de centrífuga analítica (VAN KAMMEN & DE JAGER, 1978; DE JAGER, 1979). A denominação "cowpea mosaic virus" (CPMV) foi reservada para os isolados da raça amarela (VAN KAMMEN & DE JAGER, 1978), enquanto que os isolados da raça severa receberam a denominação de "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV), descrito por DE JAGER (1979). Por outro lado, na descrição do grupo Comovirus, BRUENING (1978) mostrou várias diferenças e similaridades entre CPMV e CpSMV. O Brasil foi incluído na distribuição geográfica do CpSMV, com base nas informações contidas no trabalho de LIMA & NELSON (1977). Em um conjunto de informações bibliográficas sobre as denominações "cowpea mosaic virus" e "cowpea severe mosaic virus", PIO-RIBEIRO & PAGUIO (1980) sugerem esta última denominação para todos os isolados do vírus descritos no Brasil, até aquela época.

Tanto o CPMV, quanto o CpSMV podem ser transmitidos naturalmente por coleópteros pertencentes aos gêneros *Ceratoma* e *Diabrotica* (VAN KAMMEN & DE JAGER, 1978; DE JAGER, 1979; FULTON & SCOTT, 1977). Ainda em 1924, SMITH (1924) demonstrou a transmissibilidade de CPMV por *Ceratoma trifurcata* Forst. WALTERS & BARNETT (1964), trabalhando com um vírus sorologicamente idêntico ao CPMV, isolado em Arkansas, demonstrou também que o mesmo era eficientemente transmitido por *C. trifurcata*. SANDERLIN (1973) procedeu a experimentos com injeções de soluções purificadas de "bean pod mottle virus" (BPMV) e CPMV em *C. trifurcata* e observou que a taxa de transmissão por injeção foi maior com a solução purificada do CPMV. FULTON & SCOTT (1977) observaram que os vírus

poliédricos que infetam leguminosas, inclusive os comovirus, estão associados com o regurgitado, hemolinfa e material fecal obtidos de besouros virulíferos, mas os mecanismos envolvidos na transmissão desses vírus pelos besouros permanecem obscuros. FULTON (1979), dando continuidade aos estudos acerca da transmissão e biologia de vírus de leguminosas transmitidos por besouros, observou que, tanto os vírus transmitidos como os não transmitidos por besouros, aparecem na hemolinfa dos mesmos, quando se alimentam de plantas infetadas. SCOTT (1979), ao estudar as propriedades biofísicas e bioquímicas dos diferentes vírus transmitidos por besouros, não encontrou explicação satisfatória para o fato de certos vírus serem transmitidos pelos besouros em referência, e outros não. A espécie de besouro *Ceratoma arcuata* (Oliv.) foi identificada como vetora do CpSMV (COSTA et al. 1978). Os mesmos autores, COSTA et al. (1979), tentaram transmitir um isolado do CpSMV através de *Diabrotica speciosa* (Kirk) e *D. bivitula* (Kirk), mas as tentativas falharam. LIMA & GONÇALVES (1980) constataram que o *Chalcoedermus bimaculatus* (Fiedler), foi capaz de transmitir o CpSMV em testes de casa-de-vegetação. Segundo os mesmos autores, esta parece constituir a primeira referência sobre a transmissão de CpSMV pelo *C. bimaculatus*, vez que referido coleópetero não está incluído nas listas de vetores de comovirus. Mais tarde, COSTA et al. (1981) observaram que *D. speciosa* era capaz de transmitir uma raça de CpSMV isolada de plantas de *Phaseolus vulgaris* L., naturalmente infetadas.

Embora as sementes sejam importantes agentes de disseminação de vírus no tempo e no espaço (BAKER, 1972; PHATAK, 1974; LIMA, 1978), a transmissibilidade de CPMV e CpSMV por sementes é bastante variável e depende do isolado do vírus e da variedade de feijão-de-corda envolvida (VAN KAMMEN & DE JAGER, 1978; LIMA, 1978; DE JAGER, 1979). Segundo DALE (1949), um isolado de CPMV, em Trinidad, foi transmitido por cerca de 8% das sementes de feijão aspargus (*Vigna sesquipe-*

dalis Wight), obtidas de plantas infetadas com o vírus. PÉREZ & CORTÉS-MONLLOR (1970) demonstraram que, aproximadamente 620 plantas de feijão-de-corda, variedade "Blackeye", obtidas de sementes provenientes de plantas artificialmente inoculadas com CPMV, não desenvolveram sintomas de mosaico. Por outro lado, HAQUE & PERSAD (1975) observaram que a taxa de transmissão por sementes do CPMV varia de zero a 5,8%, dependendo da variedade de feijão-de-corda. Os mesmos autores afirmaram que a infecção de CPMV, em sementes de feijão-de-corda, assume especial significância quando seu vetor (*C. ruficornis*) também está presente.

À semelhança dos demais comovirus, o CPMV e o CpSMV possuem genoma bipartite, sendo, no entanto, constituídos de três partículas poliédricas, contendo, a mais pesada, aproximadamente 33% de ácido ribonucleico (RNA), a mediana, aproximadamente 24% de RNA e, a mais leve, 0% de RNA (VAN KAMMEN, 1967; BRUENING & AGRAWAL, 1967; WU & BRUENING, 1971; VAN KAMMEN & DE JAGER, 1978; DE JAGER, 1979). Várias evidências indicaram que a infectividade dos referidos vírus está associada às duas partículas que contêm RNA e que a proporção de partículas vazias é um fator importante na distinção entre CPMV e CpSMV (VAN KAMMEN, 1967; BRUENING & AGRAWAL, 1967; WU & BRUENING, 1971).

Os vírus pertencentes ao grupo Comovirus podem ser facilmente purificados e constituem bons antígenos para imunização de coelhos, produzindo seus anti-soros fortes reações em meio de agar, nas mais variadas condições (TOLIN, 1977). Estudos sorológicos têm demonstrado estreito relacionamento entre diferentes membros deste grupo de vírus vegetais (BRUENING, 1978; FULTON & SCOTT, 1979). Com base em resultados de testes sorológicos de dupla difusão em agar, FULTON & SCOTT (1979) sugeriram o agrupamento dos membros deste grupo em sorogrupos. De outra parte, LIN *et al.* (1980b), estudando diferentes isolados de CpSMV, através de comparações sorológicas verificaram que os mesmos podem ser agrupados em sorogrupos.

tipos I e II, sorologicamente distintos. LIN et al. (1980c) constataram plantas de *Vigna sesquipedalis* Wight., simultaneamente infetadas pelos sorotipos I e II. Os mesmos autores (LIN et al., 1981a), estudando 14 isolados de CpSMV, encontrados no Brasil Central, verificaram que 13 podiam ser designados de sorotipo I e somente um de sorotipo II. No mesmo trabalho, os autores sugerem que outros isolados do vírus, com propriedades sorológicas diferentes dos sorotipos I e II, sejam, no futuro, classificados como sorotipos III, IV e assim por diante. LIN et al. (1981b), trabalhando com dois isolados de CpSMV, oriundos dos Estados Unidos e do Brasil, constataram que ambos se mostravam sorologicamente diferentes dos sorotipos I e II e entre si, denominando-os de sorotipos III e IV, respectivamente. O sorotipo III é diferente dos demais sorotipos por provocar pontos cloróticos em *Nicotiana tabacum* "NN". Já o sorotipo IV é o único que não induz lesão localizada em *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn. Em trabalho recente, LIN et al. (1982) identificaram os determinantes antigênicos e isolaram o anticorpo comum dos quatro sorotipos do CpSMV. CUPERTINO et al. (1981) constataram CpSMV infetando o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), o qual, nos testes sorológicos efetuados, foi identificado como novo sorotipo (IV).

Os círculos de hospedeiras de CPMV e CpSMV são bastante estudados e discutidos. CHANT (1962) estudando o círculo de hospedeiras do CPMV-Trindade observou que este vírus produz lesões localizadas em *Canavalia ensiformis* D.C. e *Dolichos lablab* L. Mediante trabalho com isolados de CPMV e CpSMV, PADMA (1973) constatou que a *Chenopodium murale* L. é uma ótima indicadora para diferenciação de ambos. ALCONERO & SANTIAGO (1973) encontraram plantas de *Phaseolus lathyroides* L., naturalmente infetadas por CpSMV, e as consideraram possíveis reservatórios naturais do vírus para infecções em cultivos de feijão-de-corda. Estudando isolados de CpSMV, LIMA & NELSON (1977) constataram os mesmos infetando *V. unguiculata* e *P. lathyroides*. LIN et al. (1980a) relatam a ocorrência natural do CpSMV em *Centrosema pubescens* Benth e *Calopogonium*

mucunoides Desvaux, podendo estas leguminosas servirem como hospedeiras alternativas deste vírus. O feijão-de-asa (*Psophocarpus tetragonolobus* (L) DC) e o feijão comum (*P. vulgaris*) foram incluídos por KITAJIMA et al. (1979) e CUPERTINO et al. (1981), respectivamente, no círculo de hospedeiras deste vírus.

Canavalia ensiformis D.C., *C. brasiliensis* Mart. e *Phaseolus lathyroides*, leguminosas nativas, resistentes à seca do Nordeste, são utilizadas pelo agricultor nordestino como adubo verde e como pasto nativo para o gado nos períodos críticos de estiagens (BRAGA, 1976). Pela resistência que apresentam à seca, podem funcionar, juntamente com as demais plantas nativas, como potenciais reservatórios naturais para os vírus de plantas cultivadas. Com efeito, os vírus vegetais, com capacidade de replicação somente no interior de células vivas, encontram, durante os períodos secos do Nordeste, com ausência completa de plantas cultivadas, meio de sobrevivência nas plantas nativas que vegetam às margens de rios, açudes, lagoas, etc.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de contribuir, através da purificação, obtenção de anti-soros específicos e estudo das propriedades sorológicas e de círculo de hospedeiras, na caracterização de quatro vírus isolados de plantas de *C. brasiliensis*, *C. ensiformis*, *P. lathyroides*, *V. unguiculata*, naturalmente infetadas.

Resultados parciais da presente atividade de pesquisa foram apresentados em Congresso e publicados na forma de Resumo (VASCONCELOS & LIMA, 1981).

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Fontes de Vírus

Os vírus em estudo foram obtidos de plantas de *C. brasiliensis*, *C. ensiformis* (FIGURA 1), *P. lathyroides* e *V. unguiculata* (FIGURA 2), exibindo diferentes sintomas de mosaico em condições de campo, nos Estados do Ceará e Piauí (*C. brasiliensis*). A partir de material foliar colhido de plantas infetadas, os vírus foram mecanicamente transmitidos para plantas sadias das respectivas espécies vegetais, mantidas em condições de casa-de-vegetação.

2.2 - Isolamento dos Vírus

Plantas de *Phaseolus vulgaris* L. cultivadas em condições de casa-de-vegetação, na proporção de duas plantas/vaso, foram mecanicamente inoculadas, 4 dias após a germinação, com os vírus isolados de *V. unguiculata*, *C. ensiformis* e *C. brasiliensis*. Inóculos preparados a partir de lesões únicas produzidas pelos vírus em *P. vulgaris* foram inoculados nas suas hospedeiras originais, usando-se 4 plantas por vírus. Isto é, 4 plantas de feijão-de-corda foram inoculadas com inóculos do vírus isolado de *V. unguiculata*, obtidos de 4 lesões necróticas produzidas em *P. vulgaris*; 4 plantas de *C. ensiformis* foram inoculadas com inóculos do vírus isolado de *C. ensiformis*, obtidos de 4 lesões necróticas também produzidas em *P. vulgaris* e em 4 plantas de *C. brasiliensis* também se procedeu inoculações com inóculos do vírus isolado de *C. bra*

FIGURA 1 - Plantas de *C. brasiliensis* (A) e *C. ensiformis* (B) com sintomas de mosaico, das quais foram isoladas duas raças de "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV): CpSMV-Cb e CpSMV-Ce, respectivamente.



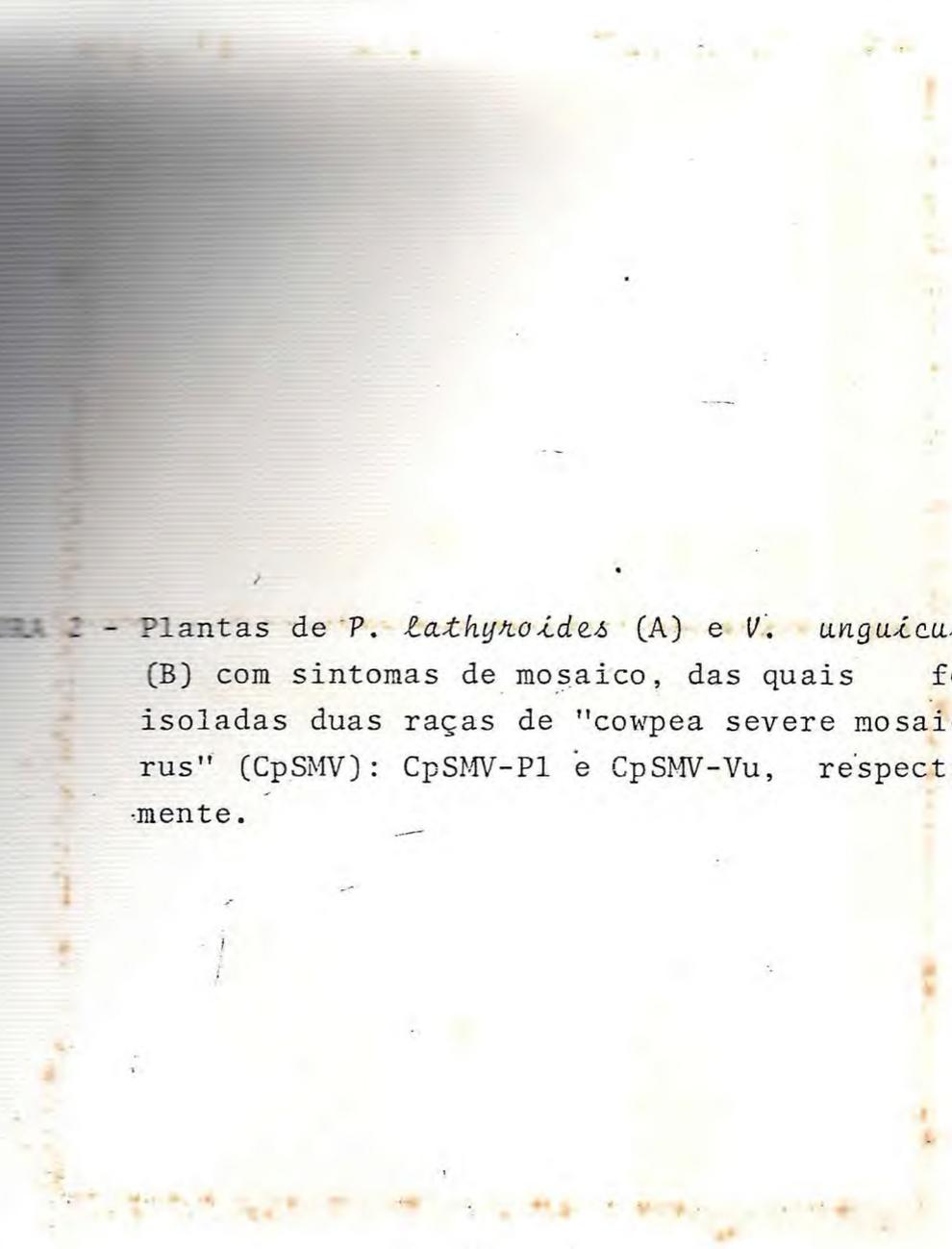


FIGURA 2 - Plantas de *P. lathyroides* (A) e *V. unguiculata* (B) com sintomas de mosaico, das quais foram isoladas duas raças de "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV): CpSMV-P1 e CpSMV-Vu, respectivamente.



siliensis proveniente de 4 lesões necróticas, produzidas em *P. vulgaris*. Plantas de *C. amaranticolor*, igualmente cultivadas em condições de casa-de-vegetação, foram mecanicamente inoculadas com o vírus isolado de *P. lathyroïdes*, 16 dias após a sua germinação. Da mesma forma, 4 plantas de *P. lathyroïdes* foram inoculadas com diferentes inóculos do vírus isolado de *P. lathyroïdes*, obtidos de 4 lesões necróticas produzidas em *C. amaranticolor*. Entre as plantas inoculadas com cada vírus, selecionou-se aquela que apresentava os sintomas mais típicos de cada um deles. Tal planta iria servir como fonte de inóculo para a propagação e estudo das propriedades biológicas e sorológicas do mesmo vírus.

2.3 - Transmissão Mecânica

Todas as inoculações mecânicas foram realizadas usando-se, como inóculo, seiva extraída de plantas sistemicamente infetadas pelos vírus. Os inóculos foram preparados, mediante trituração do tecido foliar em solução tampão de fosfato 0,05 M, pH 7,5, na proporção de 1,0g de tecido para 2,0ml de solução. Pequena quantidade de "carborundum" foi adicionada ao extrato obtido e as inoculações foram executadas pela fricção das superfícies adaxiais das folhas, com pedaços de gaze embebidos nas preparações contendo vírus.

2.4 - Círculo de Hospedeiras

Os isolados dos vírus foram mecanicamente inoculados em 11 cultivares de feijão-de-corda: "Barba de Guiné", "Carapicho", "CE-050", "Das almas", "Macaibo", "Pitiúba", "Potomac", "Seridó", "7(56)", "V-4 Alagoas", "2331" e ainda nas espécies vegetais: *C. ensiformis*, *C. brasiliensis*, *Chenopo*

dium amaranticolor, *Clitoria ternatea* L., *Cucumis melo* L., *Curcubita pepo* L., *Glicine max* (L.) Merr. cv. "IAC-2", *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth., *P. lathyroides* e *P. vulgaris* cv. local. Todas as plantas inoculadas foram mantidas em condições de casa-de-vegetação por um período mínimo de 30 dias. A infecção viral foi constatada através da sintomatologia apresentada pelas plantas inoculadas e, quando isto se torna va impossível, testava-se através da sorologia.

2.5 - Purificação

Os isolados de vírus foram mantidos em casa-de-vegetação, através de transferências sucessivas por inoculações mecânicas em suas respectivas hospedeiras originais, de onde foram purificados.

Cada hospedeira foi cultivada em dez vasos, e inoculada, mecanicamente, com o seu respectivo vírus. Decorrido o período de 20 dias, após o aparecimento dos primeiros sintomas, o material foliar era colhido e levado ao laboratório para purificação.

Cada isolado de vírus foi purificado em dias diferentes para evitar contaminação.

A purificação de cada vírus foi feita pelo método de precipitação com polietileno glicol (PEG) 6000 (peso molecular) usado por HERBERT (1963), após desnaturação das proteínas da planta com n-butanol (LIMA & NELSON, 1973).

O material foliar colhido em casa-de-vegetação, mostrando sintoma típico de mosaico de cada vírus, foi levado ao laboratório e macerado em liquidificador, junto com solução tamponada de fosfato 0,1M, pH 7,5, na proporção de 100g de material foliar para 200ml da solução. Antes de efetuada

a mistura, foi adicionado 0,5% de sulfito de sódio à solução tamponada, a fim de evitar problemas de oxidação. Após a maceração e homogeneização no liquidificador, o extrato foliar foi filtrado em gaze dupla e, em seguida, foi adicionado 8% de n-butanol ao suco resultante, cuja mistura foi agitada durante 40-60 minutos, em condições refrigeradas ($\pm 4^{\circ}\text{C}$). Depois de agitado, o suco foi submetido a uma centrifugação de 4000 rpm, durante 10 minutos, na centrífuga JANETZKY, modelo T-32, a fim de precipitar o coágulo resultante da ação do n-butanol. Ao sobrenadante, suco contendo o vírus, foram adicionados 6% de PEG 6000 e 4% de NaCl (peso/volume), visando-se a precipitação do vírus. Esta mistura foi agitada durante 40-60 minutos e, em seguida, submetida a outra centrifugação de 4000 rpm, também por 10 minutos na mesma centrífuga. A parte líquida foi descartada, sendo o precipitado ressuspenso em solução tamponada de fosfato a 0,1M, pH 7,5, e, em seguida, submetida a outra centrifugação de 10000 rpm, por 10 minutos, na centrífuga refrigerada JANETZKY, modelo K-24, para promover uma clarificação da solução contendo o vírus. Foram repetidas, por duas vezes, as etapas de precipitação e concentração com PEG e NaCl, a fim de obter-se uma solução viral melhor clarificada.

Após convenientemente diluídas, as soluções purificadas de cada vírus foram analisadas ao espectrofotômetro VARIAN UV/VIS duplo feixe, modelo 634. As concentrações dos vírus nas soluções foram determinadas, usando-se as densidades óticas obtidas através do comprimento de onda 260nm e do coeficiente de extinção 8,1, para a mistura das três partículas M, B e T (VAN KAMMEN, 1968).

As soluções purificadas dos vírus foram diluídas com água destilada, na proporção de 1:10 e, em seguida, inoculadas mecanicamente em suas respectivas hospedeiras de origem, para determinação da infectividade de cada vírus na solução purificada. As plantas, assim inoculadas, foram mantidas em

casa-de-vegetação, para observação das reações sintomatológicas típicas de cada vírus.

2.6 - Sorologia

As preparações purificadas dos vírus foram utilizadas na obtenção de anti-soros específicos para os mesmos, através da imunização de coelhos.

Quatro coelhos da raça Nova Zelândia Branca, adultos e saudáveis, criados e mantidos em gaiolas, foram escolhidos para o processo de imunização com as suspensões virais, havendo-se usado um animal para cada vírus.

Inicialmente, pequena quantidade de soro normal foi obtida de cada coelho e testada contra as soluções purificadas dos vírus, suco de plantas doentes e sadias de feijão-de-corda, *C. ensiformis*, *C. brasiliensis* e *P. lathyroides* em testes de dupla difusão em agar (OUCHTERLONY, 1962).

A imunização de cada animal constou de três inoculações com suspensão viral, espaçadas de 10 dias, na pata trazeira (ZIEMIECKI & WOOD, 1975) e por via intramuscular na região da coxa. Esta suspensão foi homogeneizada, inicialmente, com igual quantidade do "adjuvante incompleto de Freund". Em cada inoculação, injetaram-se 0,2ml da emulsão em uma das patas trazeiras e 1,0 a 1,8ml na região muscular da coxa trazeira.

Após um período de 15 dias, contados a partir da última inoculação, cada coelho foi sangrado pela veia marginal da orelha, em intervalos de 8 dias, sendo obtidos 15 a 20 ml de sangue em cada coleta. O sangue foi coagulado em banho-maria, à temperatura de 37°C, por 40 minutos, e, em seguida, centrifugado durante 10 minutos à velocidade de 4000 rpm, na

centrifuga JANETZKY, modelo T-32, a fim de precipitar o coagulo formado. Em seguida, o anti-soro foi clarificado através de nova centrifugação a 6000 rpm, por 10 minutos, na centrifuga JANETZKY, modelo K-24, e testado contra solução purificada do respectivo vírus, suco de planta infetada pelo mesmo e suco de planta sadia, através do teste de dupla difusão em agar (OUCHTERLONY, 1962).

Com o objetivo de se preservar os anti-soros, estes foram misturados com igual volume de glicerina e conservados em refrigerador, à temperatura de 0°C.

Os títulos dos anti-soros obtidos foram determinados em teste de dupla difusão em agar, através de suas diluições com água destilada, nas proporções de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024 e 1:2048. Para cada anti-soro, referidas diluições foram testadas contra suco de plantas infetadas pelo seu respectivo vírus homólogo, diluído nas proporções de 1:2, 1:4 e 1:8, em água destilada e suco de planta sadia nas mesmas diluições.

A par de testes sorológicos para comprovação de plantas hospedeiras dos vírus em estudo, determinação dos títulos dos anti-soros e determinação da infectividade das soluções purificadas, foram realizados testes adicionais com o intuito de estudar o relacionamento sorológico existente entre os referidos vírus e entre estes e outros vírus que infetam leguminosas. Extratos de plantas infetadas pelos vírus em estudo foram testados em dupla difusão em agar contra anti-soros específicos para os seguintes comovirus: "bean pod mottle virus" (BPMV), "bean rugose mosaic virus" (BRMV), "cowpea mosaic virus-SB" (CPMV-SB), "cowpea severe mosaic virus-Arkansas" (CpSMV-Ark.), "cowpea severe mosaic virus-Ceará" (CpSMV-Ce), CpSMV-Sorotipo I, CpSMV-Sorotipo II e "quail pea mosaic virus" (QPMV), e outros vírus poliédricos: "broad bean mottle virus" (BbMV), "bean yellow stipple virus" (BYSV) e "southern bean mosaic virus" (SBMV). As fontes dos referi-

dos anti-soros foram as seguintes: BPMV, BRMV, CpSMV-SB, CpSMV-Ark, QPMV, BbMV (J.P. Fulton, Universidade Arkansa-USA); CpSMV-Ce (LIMA & NELSON, 1973) e CpSMV-Sorotipo I e Sorotipo II (M.T. Lin, Universidade de Brasília). Todos os testes sorológicos foram realizados em agar gel, contendo 0,85% de agar noble, 0,85% de NaCl e 0,01% de NaN_3 .

3 - RESULTADOS

Os quatro vírus isolados de *C. brasiliensis*, *C. ensiformis*, *P. lathyroides* e *V. unguiculata* reagiram sorologicamente com o anti-soro específico para "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV) - previamente isolado no Ceará (LIMA & NELSON, 1977) - em testes de imunodifusão dupla em agar gel, indicando tratar-se de vírus pertencentes ao grupo Comovirus.

Os isolados dos vírus foram facilmente transmitidos de plantas doentes para plantas sadias através do processo experimental de transmissão mecânica. Isolados de lesão única dos vírus oriundos de *C. brasiliensis*, *C. ensiformis* e *V. unguiculata* foram obtidos a partir de lesões necróticas localizadas produzidas em *P. vulgaris*, enquanto que o isolado de lesão única do vírus oriundo de *P. lathyroides* foi obtido a partir de *C. amaranticolor*. Os vírus em referência, foram multiplicados nas suas respectivas hospedeiras originais, a partir das quais foram purificadas, para subsequente produção de anti-soro e utilizados nos estudos sorológico e de círculo de hospedeiras.

As hospedeiras nativas de cada vírus mostraram-se eficientes para suas respectivas propagação e purificação. As soluções purificadas de cada vírus, obtidas a partir de suas hospedeiras originais, apresentaram excelente aspecto, evidenciando a presença de vírus em ótimo estado de pureza. A presença de cada vírus nas preparações purificadas foi comprovada através da análise do espectro de absorção ao ultravioleta, obtido no espectrofotômetro para cada preparação viral. Os espectros de absorção obtidos apresentaram um máximo de absorção no comprimento de onda de 260nm e um mínimo em, aproximadamente, 240nm (FIGURAS 3, 4, 5 e 6), evidenciando a

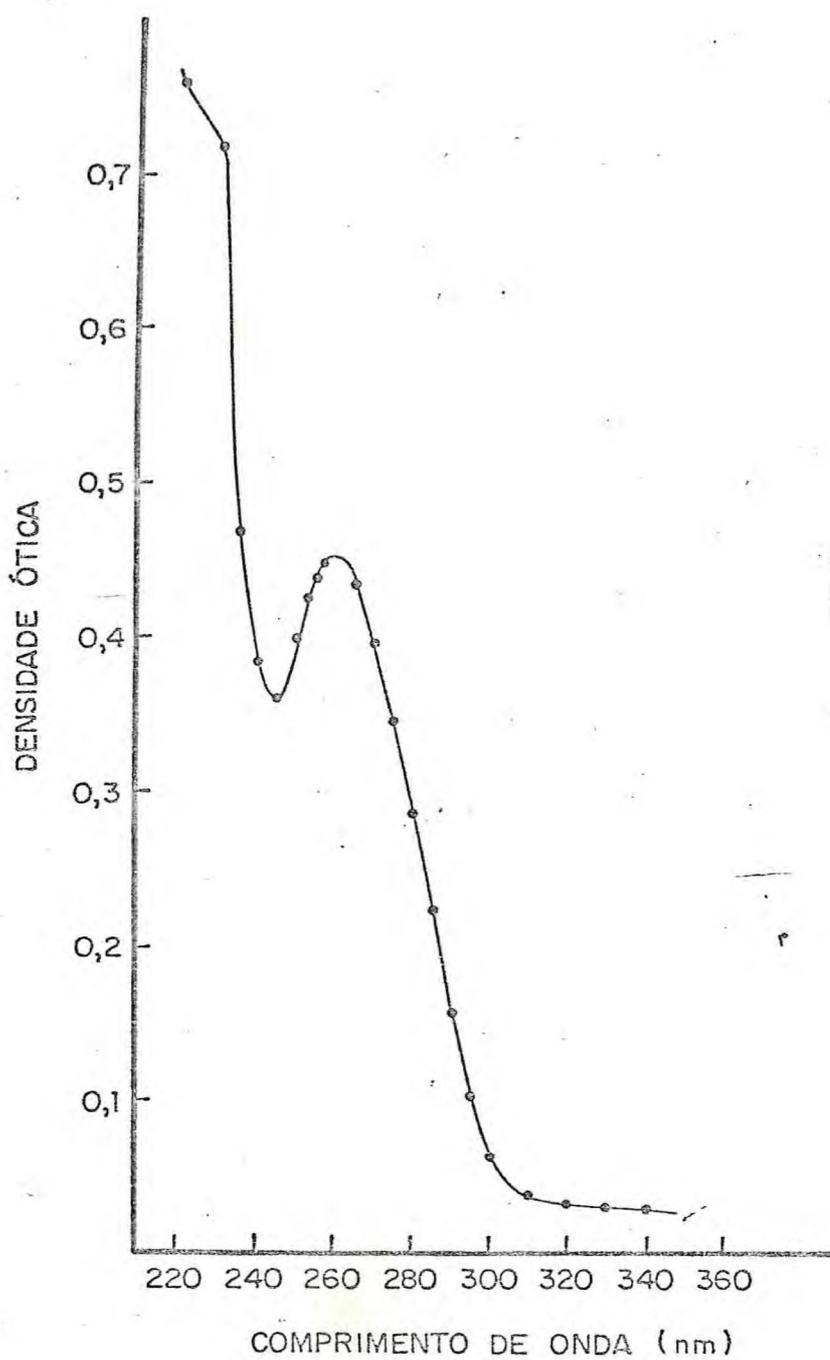


FIGURA 3 - Curva de absorção ao ultra-violeta obtida com a solução purificada de uma raça de "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV), isolada de *C. brasiliensis* e designada de CpSMV-Cb.

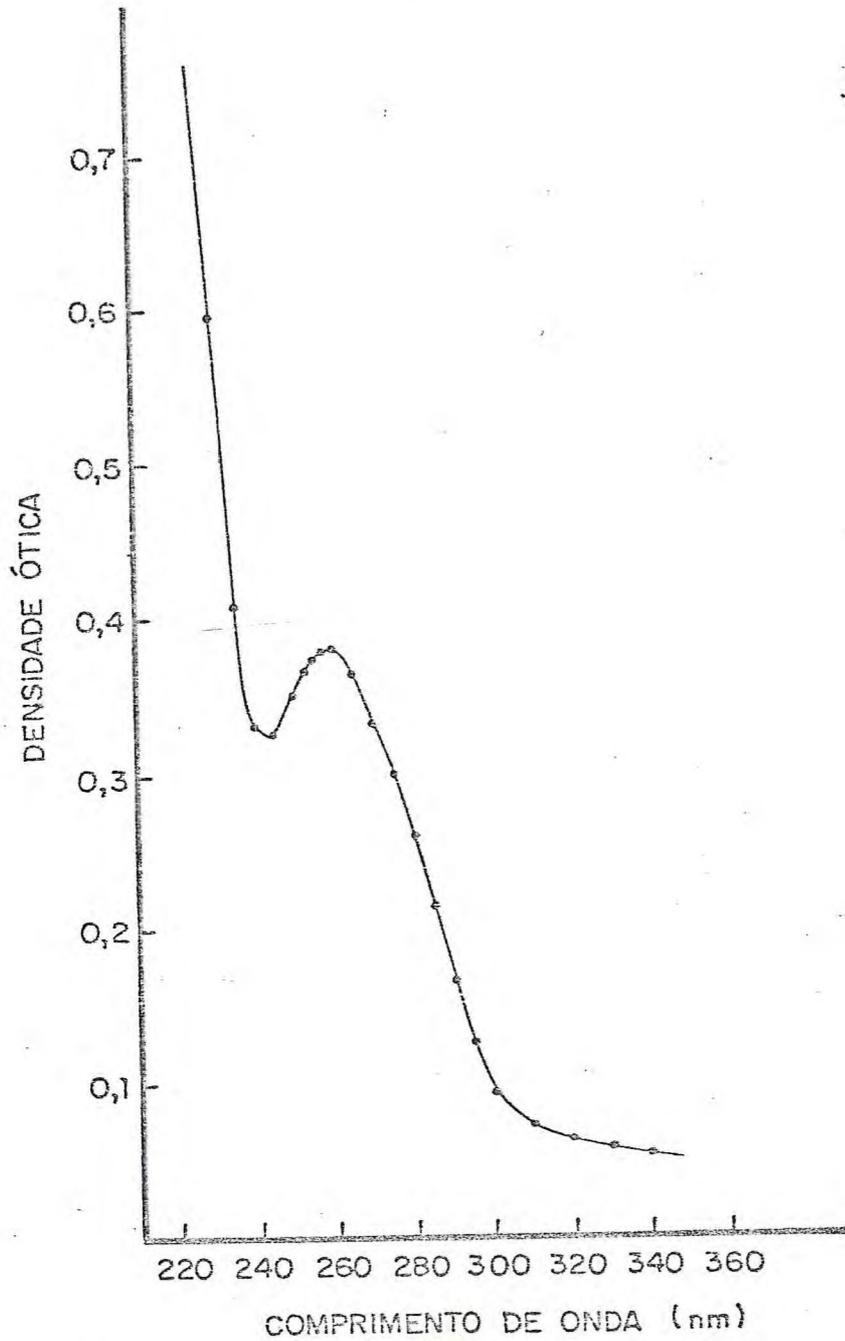


FIGURA 4 - Curva de absorção ao ultra-violeta obtida com a solução purificada de uma raça de "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV), isolada de *C. ensiformis* e designada de CpSMV-Ce.

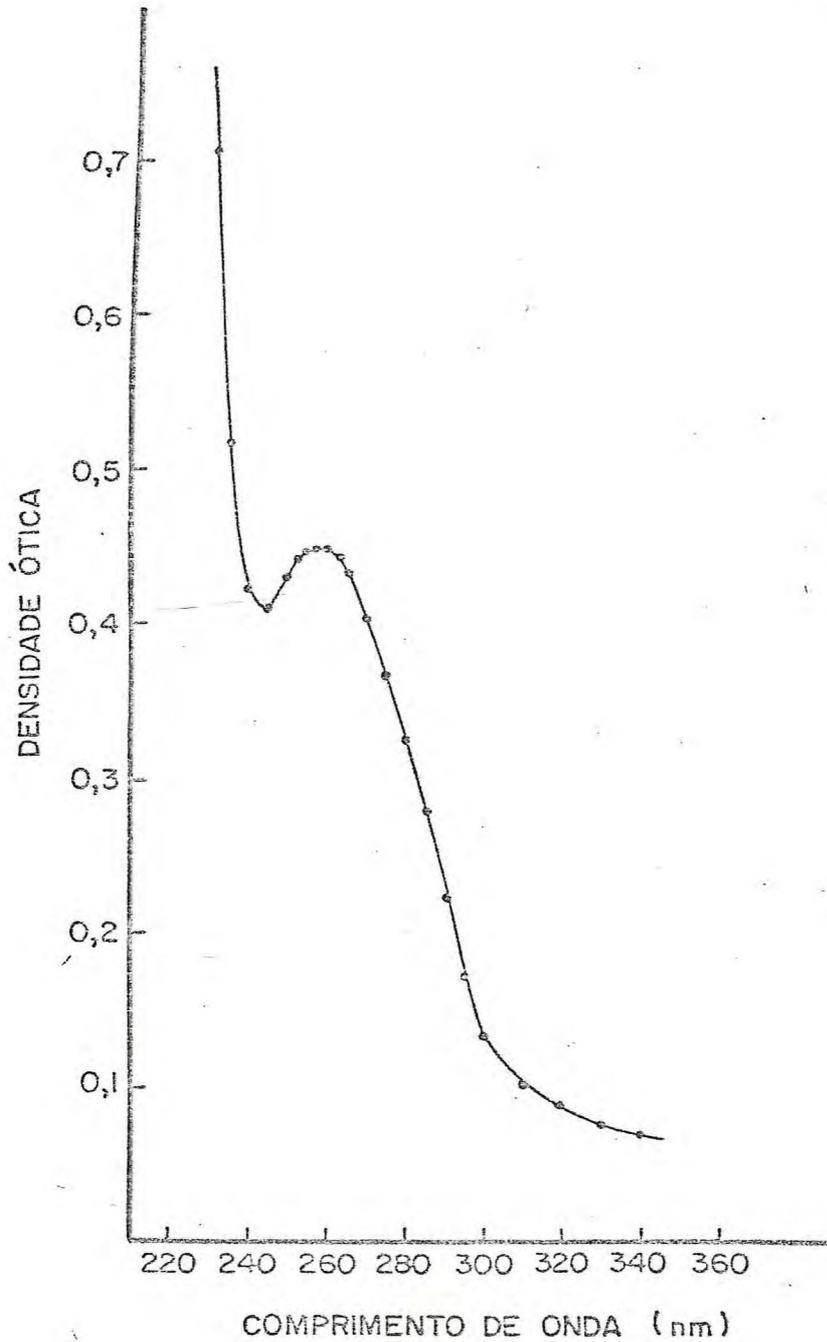


FIGURA 5 - Curva de absorção ao ultra-violeta obtida com a solução purificada de uma raça de "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV), isolada de *P. lathyroides* e designada CpSMV-P1.

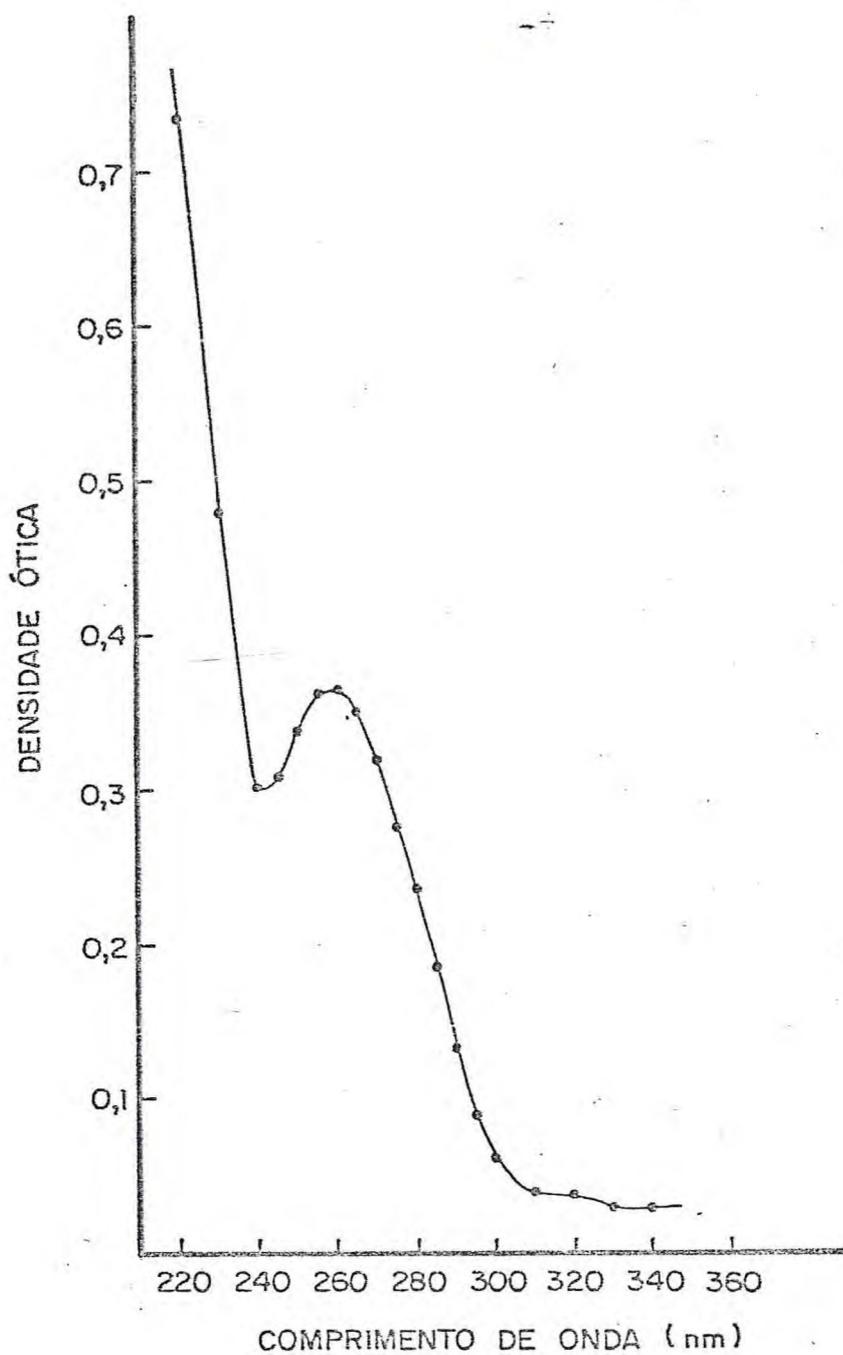


FIGURA 6 - Curva de absorção ao ultra-violeta obtida com a solução purificada de uma raça de "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV), isolada de *V. unguiculata* e designada de CpSMV-Vu.

presença de nucleoproteínas nas soluções. Através da densidade ótica obtida em 260nm para cada vírus, as concentrações aproximadas dos mesmos, nas soluções, foram calculadas em: 1,96mg de vírus por ml de solução (isolado de *C. brasiliensis*); 1,80mg de vírus por ml de solução (isolado de *C. ensiformis*); 1,60mg de vírus por ml de solução (isolado de *P. lathyroides*) e 1,91mg de vírus por ml de solução (isolado de *V. unguiculata*). Os sintomas apresentados pelas plantas inoculadas com as respectivas soluções indicaram elevado grau de infectividade das partículas virais presentes nas mesmas. Os primeiros sintomas de mosaico em *V. unguiculata* apareceram quatro dias após a inoculação com seu respectivo isolado, enquanto que os sintomas em *C. ensiformis*, *C. brasiliensis* e *P. lathyroides* surgiram decorrido um período de 8 - 13 dias, após as inoculações com os comovírus isolados das espécies vegetais mencionadas.

Os anti-soros produzidos contra os vírus, em estudo, reagiram especificamente com suco de plantas infetadas pelos mesmos, sem apresentarem reação com suco de plantas sadias, mediante teste de dupla difusão em agar, confirmando a eficiência do método usado na purificação dos referidos vírus (FIGURA 7). A ausência de reação com suco de plantas sadias evidenciou a inexistência de anti-corpos para as proteínas das plantas, em concentração capaz de apresentar reação em dupla difusão em agar, entre os anti-soros citados e suco de planta sadia.

Os títulos dos anti-soros determinados em testes de dupla difusão em agar foram de 512, para os isolados de *V. unguiculata* e *C. ensiformis* e de 1024, para os isolados de *C. brasiliensis* e *P. lathyroides*.

Os testes de reciprocidade em dupla difusão em agar, com os anti-soros obtidos para os quatro isolados virais, indicaram estreito relacionamento entre si, mas com diferenças sorológicas detectáveis, através da formação de esporão, entre

os vírus isolados de *C. brasiliensis* x *V. unguiculata*; *C. brasiliensis* x *P. lathyroides*; *V. unguiculata* x *P. lathyroides*; *V. unguiculata* x *C. ensiformis* e *P. lathyroides* x *C. ensiformis* (FIGURA 7). Por outro lado, os isolados de *C. brasiliensis* e *C. ensiformis* mostraram-se sorologicamente idênticos (FIGURA 7).

Estudos de relacionamento sorológico em teste de dupla difusão em agar com anti-soros específicos para BYSV, SBMV, CPMV-Sb e BbMV indicaram a inexistência de qualquer relacionamento entre os vírus em estudo e referidos anti-soros. De outra parte, testes de imunodifusão em meio de agar mostraram que os quatro comovírus estudados no presente trabalho são sorologicamente relacionados com o sorotipo I de CpSMV-Ark (LIN et al., 1980a) e com CPMV e BPMV. Com exceção do isolado de *P. lathyroides*, os demais reagiram com anti-soro específico para BRMV. O isolado de *V. unguiculata* mostrou-se também sorologicamente relacionado com o sorotipo II de CpSMV (LIN et al., 1980c) e QPMV, apresentando reações leves com este último anti-soro.

Os quatro isolados de vírus infetaram, sistemicamente, soja "IAC-2" (FIGURAS 8 e 9) e feijão-de-corda cv. "2331". Plantas de *C. ensiformis* e *C. brasiliensis* apresentaram lesões necróticas localizadas, quando inoculadas mecanicamente com os isolados de *V. unguiculata* e *P. lathyroides* e sintomas sistêmicos depois de inoculadas com os vírus isolados de *C. brasiliensis* e *C. ensiformis*. Plantas de *C. amaranticolor* apresentaram lesões necróticas localizadas quando inoculadas com os quatro isolados do vírus, enquanto *P. vulgaris* apresentou lesões necróticas localizadas quando inoculado com os isolados de *C. brasiliensis*, *C. ensiformis* e *V. unguiculata*, sem apresentar nenhum sintoma quando inoculado com o isolado de *P. lathyroides*. *Phaseolus lathyroides* mostrou-se resistente ao isolado de *C. brasiliensis* e suscetível aos demais vírus em estudo, exibindo sintomas de mosaico. Com exceção de "Macaibo", as demais cultivares do feijão-de-corda testadas

os vírus isolados de *C. brasiliensis* x *V. unguiculata*; *C. brasiliensis* x *P. lathyroides*; *V. unguiculata* x *P. lathyroides*; *V. unguiculata* x *C. ensiformis* e *P. lathyroides* x *C. ensiformis* (FIGURA 7). Por outro lado, os isolados de *C. brasiliensis* e *C. ensiformis* mostraram-se sorologicamente idênticos (FIGURA 7).

Estudos de relacionamento sorológico em teste de dupla difusão em agar com anti-soros específicos para BYSV, SBMV, CPMV-Sb e BbMV indicaram a inexistência de qualquer relacionamento entre os vírus em estudo e referidos anti-soros. De outra parte, testes de imunodifusão em meio de agar mostraram que os quatro comovirus estudados no presente trabalho são sorologicamente relacionados com o sorotipo I de CpSMV-Ark (LIN et al., 1980a) e com CPMV e BPMV. Com exceção do isolado de *P. lathyroides*, os demais reagiram com anti-soro específico para BRMV. O isolado de *V. unguiculata* mostrou-se também sorologicamente relacionado com o sorotipo II de CpSMV (LIN et al., 1980c) e QPMV, apresentando reações leves com este último anti-soro.

Os quatro isolados de vírus infectaram, sistemicamente, soja "IAC-2" (FIGURAS 8 e 9) e feijão-de-corda cv. "2331". Plantas de *C. ensiformis* e *C. brasiliensis* apresentaram lesões necróticas localizadas, quando inoculadas mecanicamente com os isolados de *V. unguiculata* e *P. lathyroides* e sintomas sistêmicos depois de inoculadas com os vírus isolados de *C. brasiliensis* e *C. ensiformis*. Plantas de *C. amaranticolor* apresentaram lesões necróticas localizadas quando inoculadas com os quatro isolados do vírus, enquanto *P. vulgaris* apresentou lesões necróticas localizadas quando inoculado com os isolados de *C. brasiliensis*, *C. ensiformis* e *V. unguiculata*, sem apresentar nenhum sintoma quando inoculado com o isolado de *P. lathyroides*. *Phaseolus lathyroides* mostrou-se resistente ao isolado de *C. brasiliensis* e suscetível aos demais vírus em estudo, exibindo sintomas de mosaico. Com exceção de "Macaibo", as demais cultivares do feijão-de-corda testadas

FIGURA 7 - Testes sorológicos de dupla difusão em meio de agar, contendo 0,85% de agar noble, 0,85% de NaCl e 0,01% de NaN_3 , para demonstrar o relacionamento sorológico entre raças de "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV), isoladas de *C. brasiliensis*, *C. ensiformis*, *P. lathyroides* e *V. unguiculata*, designadas de CpSMV-Cb, CpSMV-Ce, CpSMV-P1 e CpSMV-Vu, respectivamente.

Os orifícios centrais foram preenchidos com anti-soros específicos para CpSMV-Vu (A), CpSMV-Ce (B), CpSMV-Cb (C) e CpSMV-P1 (D). Os orifícios da periferia foram preenchidos com extrato de plantas infetadas por CpSMV-Cb (Cb), CpSMV-Ce (Ce), CpSMV-P1 (P1), CpSMV-Vu (Vu), e extrato de planta sadia (Ps).

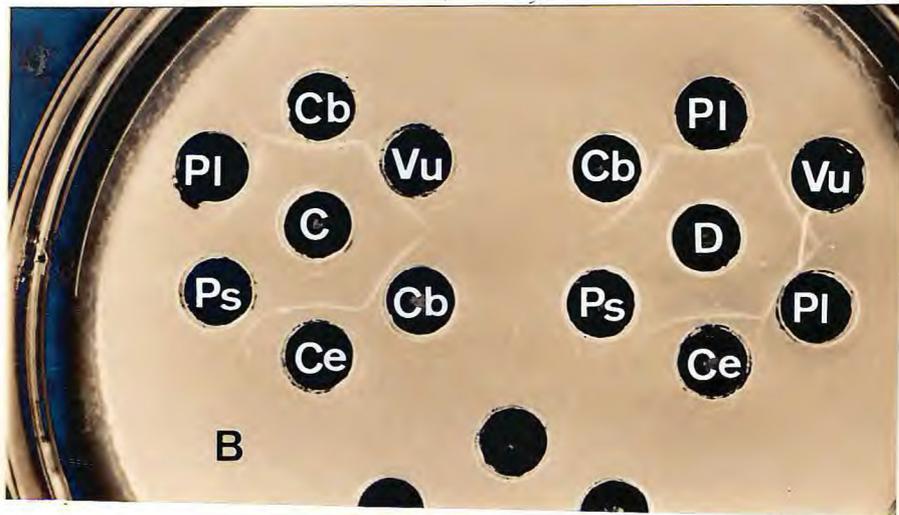
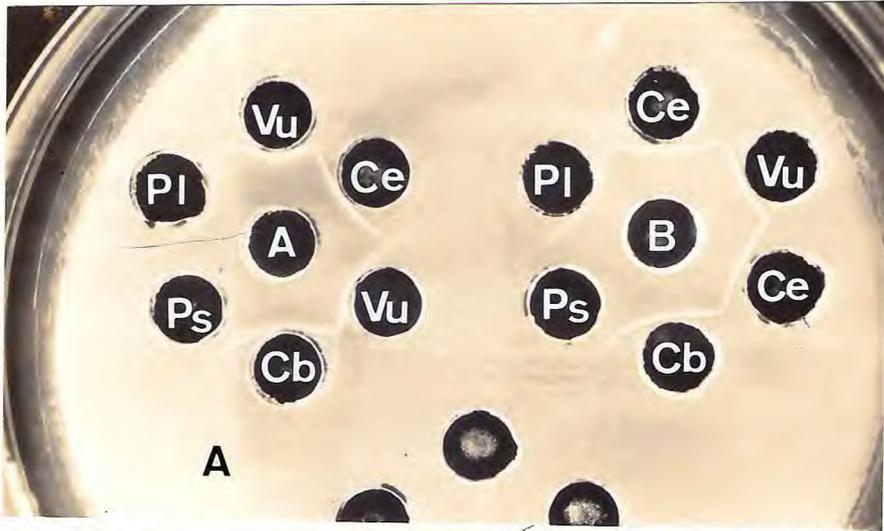


FIGURA 8 - Plantas de *Glicine max* cv. "IAC-2" inoculadas mecanicamente com raças de "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV), isoladas de *C. brasiliensis* (A) e *C. ensiformis* (B), apresentando sintomas típicos de mosaico severo (A) e mosaico leve (B).



FIGURA 9 - Plantas de *Glicine max* cv. "IAC-2" inoculadas mecanicamente com raças de "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV), isoladas de *P. lathyroides* (A) e *V. unguiculata* (B), apresentando sintomas típicos de mosaico.



A



B

mostraram-se suscetíveis ao isolado de *V. unguiculata*, apresentando sintomas que variaram de mosaico severo (cultivares "Barba de Guiné", "CE-050" e "V-4 Alagoas") a mosaico leve (demais cultivares). As cultivares "CE-050", "Pitiúba" e "Potomac", após inoculadas com o isolado de *C. ensiformis*, exibiram lesões necróticas localizadas. De outra parte, o isolado de *C. brasiliensis* foi capaz de infetar sistemicamente as cultivares "Seridó" e "2331", enquanto que os isolados de *C. ensiformis* e *P. lathyroides* infetaram somente a cultivar "2331". As demais espécies de plantas testadas mostraram-se imunes aos quatro isolados do vírus. Os resultados dos estudos de círculo de hospedeiras, envolvendo os quatro vírus em estudo, estão relacionados na TABELA 1. Com base nas reações sintomatológicas apresentadas pelas espécies vegetais testadas (TABELA 1), foram selecionadas plantas diferenciadoras (TABELA 2) para os quatro vírus em estudo, os quais foram identificados como raças de CpSMV, com base nos resultados dos estudos sorológicos e de círculo de hospedeiras aqui relatados.

TABELA 1 - Reações sintomatológicas apresentadas por diferentes espécies vegetais inoculadas com raças de "cow pea severe mosaic virus" (CpSMV) isoladas de *Canavalia brasiliensis*, *Canavalia ensiformis*, *Phaseolus lathyroides* e *Vigna unguiculata*.

Plantas Inoculadas	Reações sintomatológicas aos vírus (*) isolados de			
	<i>Canavalia brasiliensis</i>	<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Phaseolus lathyroides</i>	<i>Vigna unguiculata</i>
<i>Canavalia brasiliensis</i>	M,B	M,B	LNL	LNL
<i>Canavalia ensiformis</i>	M,B	M,B	LNL	LNL
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LNL	LNL	LNL	LNL
<i>Clitoria ternatea</i>	-	-	-	-
<i>Cucumis melo</i>	-	-	-	-
<i>Curcubita pepo</i>	-	-	-	-
<i>Glicine max</i> "IAC-2"	MS,B	M	M,L	MS,B
<i>Mimosa caalpimaeifolia</i>	-	-	-	-
<i>Phaseolus lathyroides</i>	-	M	M,B	M
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. local	LNL	LNL	-	LNL
<i>Vigna unguiculata</i>				
"Barba de Guiné"	-	-	-	MS,B
"Carrapicho"	-	-	-	M,B
"CE-050"	-	LNL	-	MS,B
"Das almas"	-	-	-	M,B
"Macaiço"	-	-	-	-
"Pitiúba"	-	LN	-	M,B
"Potomac"	-	LNL	-	M,B
"Seridô"	M,B	-	-	M
"7(56)"	-	-	-	M,B
"V-4 Alagoas"	-	-	-	MS,B
"2331"	M,B	M,B	MS,B	MS,B

(*) B - bolhosidade; LNL - lesão necrótica localizada; M - mosaico; ML - mosaico leve; MS - mosaico severo.

TABELA 2 - Plantas diferenciadoras para raças de "cowpea severe mosaic virus" isoladas de *Canavalia brasiliensis*, *Canavalia ensiformis*, *Phaseolus lathyroides* e *Vigna unguiculata*.

Plantas Inoculadas	Reações sintomatológicas aos vírus (*) isolados de			
	<i>Canavalia brasiliensis</i>	<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Phaseolus lathyroides</i>	<i>Vigna unguiculata</i>
<i>Phaseolus lathyroides</i>	-	M	M,B	M
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. local	LNL	LNL	-	LNL
<i>Vigna unguiculata</i>				
"Barba de Guiné"	-	-	-	MS,B
"Potomac"	-	LNL	-	M,B
"Seridô"	M,B	-	-	ML
"2331"	M,B	M,B	MS,B	MS,B

(*) B - bolhosidade; LNL - lesão necrótica localizada; M - mosaico;
MS - mosaico severo; ML - mosaico leve.

4 - DISCUSSÃO

Os isolados de lesão única dos vírus estudados no presente trabalho foram obtidos a partir de plantas de *C. amaranticolor* e *P. vulgaris* cv. local, inoculadas com os mesmos. O feijão comum (*P. vulgaris*) não apresentou nenhuma reação sintomatológica ao vírus isolado de *P. lathyroides*, característica que pode ser usada para distingui-lo dos demais. Desta forma, o vírus obtido de *P. lathyroides* foi reisolado de *C. amaranticolor*. Embora os vírus isolados de *C. brasiliensis*, *C. ensiformis* e *V. unguiculata* induzam também a formação de lesões necróticas em *C. amaranticolor*, o feijão comum é mais indicado para obtenção de isolados de lesão única, por apresentar maior rapidez de germinação, maior rapidez de desenvolvimento, maior facilidade de cultivo e menor espaço de tempo para a formação de sintomas. VAN KAMMEN & DE JAGER (1978) e DE JAGER (1979) sugerem o uso de *P. vulgaris* cv. "Pinto" para obtenção de isolados de lesão única de CPMV e CpSMV, uma vez que as lesões necróticas localizadas, induzidas pelos mesmos, nas folhas inoculadas de referida espécie vegetal, possuem alta concentração de vírus e pequena quantidade de inibidores. De acordo com FRANKI (1972), sempre que possível, deve-se trabalhar com uma cultura de vírus biologicamente pura, o que pode ser obtido através do seu reisolamento a partir de lesões necróticas localizadas. Testes sorológicos, exames citológicos e observações sintomatológicas de plantas de *C. brasiliensis*, *C. ensiformis*, *P. lathyroides* e *V. unguiculata*, sistemicamente infetadas com os isolados de lesão única de seus respectivos vírus originais, comprovaram a inexistência de qualquer contaminação com outros vírus que infetam o feijão-de-corda e com aqueles mantidos na mesma casa-de-vegetação, onde esta pesquisa foi realizada.

As hospedeiras originais dos vírus em estudo mostraram-se adequadas para manutenção, propagação e purificação dos mesmos. Embora todos os vírus possam infetar uma ou mais cultivar de *V. unguiculata* (TABELA 1), espécie vegetal de comprovada eficiência para manutenção e purificação de vírus (HOLLING & STONE, 1970; BANCROFT, 1971; SHEPHERD, 1971; MINK, 1972; BOCK & CONTI, 1974; BOCK & KUHN, 1975; TSUCHIZAAKI, 1975; SHEPARD & GROGAN, 1975; BOZARTH & SHOYINKA, 1979), merecem destaque as espécies *C. brasiliensis*, *C. ensiformis* e *P. lathyroides*, leguminosas nativas do Nordeste (BRAGA, 1976), que se comportaram como excelentes hospedeiras do vírus para os referidos fins. O excelente estado de pureza das soluções purificadas dos vírus isolados e purificados a partir de *C. brasiliensis*, *C. ensiformis* e *P. lathyroides*, evidenciados através de seus respectivos espectros de absorção ao ultra-violeta (FIGURAS 3, 4 e 5), e a elevada especificidade dos anti-soros obtidos para os mesmos (FIGURA 7), constituem importantes indicativos da eficiência das mencionadas espécies vegetais para propagação e purificação de vírus. De acordo com MATTHEWS (1970), a escolha de uma adequada planta hospedeira para a propagação de um vírus constitui fator de importância fundamental para a sua purificação. Segundo FRANCKI (1972), na escolha da planta hospedeira para propagação viral, deve-se, sempre que possível, considerar os seguintes fatores: concentração do vírus nos tecidos vegetais, presença de substâncias inibidoras de vírus nas células vegetais, facilidade e velocidade de propagação e desenvolvimento da planta. No decorrer da presente pesquisa, observou-se que as citadas espécies vegetais possuem as propriedades sugeridas por FRANCKI (1972) para propagação viral, notadamente *P. lathyroides*, por possuir sementes de fácil germinação, tecido tenro, desenvolvimento rápido, porte pequeno, favorecendo o cultivo de várias plantas por vaso e fácil produção de sementes em condições de casa-de-vegetação. Por outro lado, a possibilidade de uma mesma espécie vegetal, usada para manutenção e propagação de vírus, poder ser infetada

por mais de um vírus, deve sempre ser levada em consideração (MATTHEWS, 1970). Desta forma, deve-se, sempre que possível, dar preferência a hospedeiras específicas para manutenção e propagação viral. De outra parte, as hospedeiras originais favorecem, normalmente, a replicação viral com a conseqüente produção de grande quantidade de vírus nas células infetadas. A alta infectividade das soluções purificadas, associada à eficiência na transmissão mecânica de referidos vírus com inóculos preparados a partir de suas hospedeiras nativas, indicam a inexistência de inibidores de vírus nos tecidos das plantas testadas.

A purificação de um vírus, segundo FRANCKY (1972), é fundamental para o completo conhecimento de suas características, sendo inúmeros os métodos que podem ser usados, dependendo do tipo de vírus a ser purificado. Na purificação dos vírus em estudo, utilizou-se um método simples, se comparado a outros utilizados na purificação de certos vírus, como "blackeye cowpea mosaic virus" (BICMV) (LIMA *et al.*, 1979), "cowpea chlorotic mottle virus" (CCMV) (KUHN, 1964) e CPMV (VAN KAMMEN, 1967, 1968; GEELLEN *et al.*, 1973). Este método já foi usado, com sucesso, para purificação de outros vírus, entre os quais, pode-se citar "squash mosaic virus" (SMV) (LIMA, 1972), "tobacco mosaic virus" (TMV) (LIMA & CHAGAS, 1974) e o CpSMV (LIMA & NELSON, 1973, 1977).

Os elevados títulos dos anti-soros obtidos para os vírus em estudo, são evidências de que o método de imunização usado é bastante eficiente. A eficiência do referido método ("foot pad") fundamenta-se na economia de antígeno (vírus) usado no processo de imunização. Aproximadamente 2,0 a 3,0 mg de cada vírus foram suficientes para a imunização de cada animal. De acordo com ZIEMIECKI & WOOD (1975), LIMA (1978 e 1979), anti-soros com boas concentrações de anticorpos para os vírus "cucumber mosaic virus" e "blackeye cowpea mosaic virus", respectivamente, foram obtidos através do uso

de referido método, à custa de pequena quantidade de antígenos. De outra parte, SHEPHERD (1963) utilizou aproximadamente 6,0 a 9,0 mg de vírus, administrados intramuscularmente, em doses semanais de 2,0 - 3,0 mg, para obtenção de anti-soro específico para CpSMV. KUHN (1964) usou 3,0 - 4,0 mg de "cowpea chlorotic mottle virus" por cada injeção intravenosa, num total de 3 aplicações ou 6,0 - 8,0 mg de vírus, em 3 injeções intramusculares.

Os testes de reciprocidade serviram para demonstrar o relacionamento sorológico existente entre os vírus em estudo. MATTHEWS (1970), tratando de relacionamento entre vírus, concluiu que se dois vírus são sorologicamente relacionados ou distintos, algum grau de reação cruzada será observado, porém, as reações não serão idênticas. Este grau de reação cruzada é observado através da formação de esporão. Os testes de reciprocidade com isolado de *V. unguiculata* x isolado de *C. ensiformis*, isolado de *V. unguiculata* x isolado de *C. brasiliensis*, isolado de *V. unguiculata* x isolado de *P. lathyroides*, isolado de *C. ensiformis* x isolado de *P. lathyroides* e isolado de *C. brasiliensis* x isolado de *P. lathyroides*, apresentaram a formação de esporão, demonstrando que os mesmos são sorologicamente distintos, porém, com estreitos laços de relacionamento (FIGURA 7). Segundo BERCKS et al. (1972), o grau de relação sorológica entre dois antígenos é inversamente proporcional ao comprimento e à intensidade do esporão. De outra parte, o isolado de *C. brasiliensis* e o isolado de *C. ensiformis* mostraram-se sorologicamente idênticos (FIGURA 7), embora apresentem diferenças biológicas com relação ao círculo de hospedeiras (TABELAS 1 e 2). Isolados de vírus sorologicamente idênticos reagem igualmente, quando testados cada um contra o anti-soro do outro (MATTHEWS, 1970).

Nos testes de relacionamento com anti-soros para vírus que não pertencem ao grupo Comovirus, houve ausência total de reações, ocorrendo, no entanto, reação com alguns

anti-soros para outros comovirus. FULTON & SCOTT (1979), em estudos com isolados do grupo Comovirus, observaram relacionamento sorológico entre os mesmos e o CPMV-Ark e BPMV. SHEPHERD (1963) constatou relacionamento sorológico entre BPMV e isolados de CPMV de Arkansas e Trinidad. Os isolados de CpSMV, em estudo reagiram com anti-soros para CPMV e sorotipo I de CpSMV. Os resultados dos estudos sorológicos realizados com os vírus isolados de *C. brasiliensis*, *C. ensiformis*, *P. lathyroides* e *V. unguiculata* servem para identificá-los como comovirus, de estreito relacionamento sorológico, que podem ser considerados raças ou estirpes de CpSMV, assim designadas: CpSMV-Cb, CpSMV-Ce, CpSMV-P1 e CpSMV-Vu, respectivamente.

Canavalia brasiliensis, *C. ensiformis* e *P. lathyroides*, hospedeiras naturais dos vírus em estudo, podem ser consideradas importantes reservatórios de vírus que infetam o feijão-de-corda, por apresentarem capacidade de sobrevivência nas condições adversas então predominantes nos períodos de estiagem do Nordeste. ALCONERO & SANTIAGO (1973) identificaram o *P. lathyroides* como excelente reservatório do CPMV em Porto Rico e LIMA & NELSON (1977) enfatizaram a importância desta leguminosa como reservatório do CpSMV, no Ceará. Estas plantas nativas, encontradas em todo o Nordeste brasileiro, constituem importantes fontes de vírus que infetam as culturas de feijão-de-corda. De outra parte, as plantas utilizadas como diferenciadoras (TABELA 2) para identificação dos referidos vírus tornam-se importantes porque, não só servem para identificá-los, como para distingui-los de novas raças de CpSMV que poderão surgir em feijão-de-corda. Outras hospedeiras naturais do CpSMV já foram identificadas em outras regiões brasileiros: Brasil Central, *Centrosema pubescens* e *Calopogonium mucunoides* (LIN et al., 1980a); Amazônia, *Psophocarpus tetragonolobus* (KITAJIMA et al., 1979); Centro-Oeste, *P. vulgaris* (CUPERTINO et al., 1981). Em razão da larga distribuição geográfica das hospedeiras naturais de CpSMV, nos

Estados nordestinos, a seleção e produção de cultivares com resistência ao mesmo há-se constituído na principal preocupação dos pesquisadores brasileiros envolvidos em programas de pesquisa com doenças do feijão-de-corda.

5 - CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados e discutidos no presente trabalho, pode-se evidenciar as seguintes conclusões:

- (a) Os vírus isolados de plantas de *C. brasiliensis*, *C. ensiformis*, *P. lathyroides* e *V. unguiculata*, naturalmente infetadas, pertencem ao grupo Como virus;
- (b) Os mencionados vírus são biológica e sorologicamente relacionados, porém distintos, podendo ser considerados raças ou estirpes de CpSMV, assim designadas: CpSMV-Cb, isolada de *C. brasiliensis*; CpSMV-Ce, isolada de *C. ensiformis*; CpSMV-Pl, isolada de *P. lathyroides* e CpSMV-Vu, isolada de *V. unguiculata*;
- (c) As leguminosas nativas *C. brasiliensis*, *C. ensiformis* e *P. lathyroides* devem desempenhar importante papel na sobrevivência e perpetuação do CpSMV no Nordeste brasileiro, funcionando como fonte de inóculo primário do vírus para campos de cultura de feijão-de-corda;
- (d) Em razão da larga dispersão de tais leguminosas, a sua erradicação, objetivando a eliminação de

fontes originais do vírus, nos Estados do Nordeste, seria, na prática, tarefa inviável, o que recomenda o uso de variedades resistentes como o principal método de controle da virose em questão;

- (e) As espécies vegetais, *Phaseolus lathyroides*, *P. vulgaris* e *Vigna unguiculata* ("Barba de Guiné", "Potomac", "Seridó" e "2331") são importantes como plantas diferenciadoras das raças de CpSMV envolvidas na presente pesquisa;
- (f) Os anti-soros específicos para as raças de CpSMV, obtidos na presente atividade de pesquisa, revelam-se de grande valia para os trabalhos de diagnose, zoneamento, identificação de hospedeiras naturais e seleção de cultivares imunes ou resistentes às raças de CpSMV, em menção.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, H.O. Identification of Cowpea Mosaic Virus in Montana. Plant Dis. Repor. 40 : 124. 1964.
- ALCONERO, R. & A. SANTIAGO. *Phaseolus lathyroides* as a Reservoir of Cowpea Mosaic Virus in Puerto Rico. Phytopathology 63 : 120-122. 1973.
- BAKER, K.F. Seed Pathology in Seed Biology, ed. T.T. Kozlowski, New York, Academic Press. 317-416. 1972.
- BANCROFT, J.B. Cowpea Chlorotic Mottle Virus nº 49 in Descriptions of Plant Viruses. Commonw. Mycol. Inst. Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England, 4pp. 1971.
- BERCKS, R., R. KOENING & G. QUERFURTH. Plant Virus Serology in Principles and Techniques in Plant Virology, ed. C.I. Kado e H.O. Agrawal, New York, Van Nostrand Reinhold Co., 446-190. 1972.
- BOCK, K.R. East African Strain of Cowpea Aphid-borne Mosaic Virus. Ann. Appl. Biol. 74 : 75-83. 1973.
- BOCK, K.R. & M. CONTI. Cowpea Aphid-Borne Mosaic Virus nº 134 in Descriptions of Plant Viruses. Commonw, Mycol. Inst. Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England, 4pp. 1974
- BOCK, K.R. & C.W. KUHN. Peanut Mottle Virus nº 141 in Descriptions of Plant Viruses. Commonw. Mycol. Inst. Assoc. Appl. Biol. Kew, Surrey, England. 4pp. 1975.
- BOZART, R.F. & S.A. SHOYINKA. Cowpea Mottle Virus nº 212 in Descriptions of Plant Viruses. Commonw, Mycol. Inst. Assoc. Biol., Kew Surrey, England. 3pp. 1979.

- BRAGA, R. Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará. 3^o ed., Col. Mossoroense XLII, ESAM, Mossoró, 540pp. 1976.
- BRUENING, G. COMOVIRUS Group n^o 199 in Descriptions of Plant Viruses. Commonw, Mycol. Inst. Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England. 5pp. 1978.
- BRUENING, G. & H.O. AGRAWAL. Infectivity of a Mixture of Cowpea Mosaic Virus Ribonucleoprotein Components. Virology 32:306-320. 1967.
- CHANT, S.R. Viruses of Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) in Nigéria. Ann. Appl. Biol. 47:565-572. 1959.
- CHANT, S.R. The Use of *Chenopodium amaranticolor* in the Study of Nigerian Cowpea Yellow Mosaic Virus. Phytopathology 51: 332-333. 1961.
- CHANT, S.R. Further Studies on the Host Range and Properties of Trinidad Cowpea Mosaic Virus. Ann. Appl. Biol. 50: 159-162. 1962.
- COSTA, C.L., M.T. LIN, E.W. KITAJIMA, A.S. SANTOS, R.C.M. MESQUITA & F.R. FREIRE. *Cerotoma arcuata* (Oliv.) um Crisomelídeo Vector do Mosaico da Vigna do Brasil. Fitopatologia Brasileira, 3:81-82. 1978.
- COSTA, C.L. & M.F. BATISTA. Viroses Transmitidas por Coleópteros no Brasil. Fitopatologia Brasileira. 4:177-179. 1979.
- COSTA, C.L., M.T. LIN & C.A. SPERANDIO. Besouros Crisomelídeos Vetores do Sorotipo IV do "Cowpea Severe Mosaic Virus" isolado do Feijoeiro. Fitopatologia Brasileira. 6: 523. 1981.
- CUPERTINO, F.P., C.L. COSTA, M.T. LIN & E.W. KITAJIMA. Infecção Natural do Feijoeiro pelo Vírus do Mosaico Severo do Caupi no Centro-Oeste do Brasil. Fitopatologia Brasileira. 6:529. 1981.

- DALE, W.T. Observations on a Virus Disease of Cowpea in Trinidad Tropical Agriculture 1949: 327-333. 1949.
- DE JAGER, C.P. Cowpea Severe Mosaic Virus nº 209 in Descriptions of Plant Viruses. Commonw. Mycol. Inst. Assoc. Appl. Biol., Kew. Surrey, England. 5pp. 1979.
- FRANCKY, R.I.B. Purification of Viruses in Principles and Techniques in Plant Virology. ed. C.I. Kado & H.O. Agrawal, New York, Van Nostrand Reinhold Co., 295-335. 1972.
- FULTON, J.P. Transmission and Biology of Legume Viruses Transmitted by Beetles. Fitopatologia Brasileira. 4:167-169. 1979.
- FULTON, J.P. & H.A. SCOTT. Bean Rugose Mosaic and Related Viruses and Their Transmission by Beetles. Fitopatologia Brasileira. 2:9-16, 1977.
- FULTON, J.P. & H.A. SCOTT. A Serogrouping Concept for Legume Comoviruses. Phytopathology 69:305-306. 1979.
- GEELEN, J.L.M.C., G. REZELMAN, & A. VAN KAMMEN. The Infectivity of the Two Electrophoretic Forms of Cowpea Mosaic Virus. Phytopathology. 51:279-286. 1973.
- GONÇALVES, M.F.B. & J.A.A. LIMA. Efeitos do Cowpea Severe Mosaic Virus sobre a Produtividade do Feijão-de-corda cv. "Pitiúba". Resumo do XV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, São Paulo, 185, 1982.
- HAQUE, S.Q. & G.C. PERSAD. Some Observations on the Seed-Transmission of Beetle - Transmitted Cowpea Mosaic Virus. Tropical Diseases of Legumes. 1975: 119-121. 1975.
- HERBERT, T.T. Precipitation of Plant Viruses by Polyethylene Glicol. Phytopathology. 53:362. 1963.

- HOLLINGS, M. & O.M. STONE. Carnation Ringspot Virus. nº 21 in Descriptions of Plant Viruses. Commonw. Mycol. Inst. Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England. 4pp. 1970.
- KITAJIMA, E.W., H. NODA, M.T. LIN & C.L. COSTA. Um Mosaico em Feijão-de-Asa (*Psophocarpus tetragonolobus*). Causado por um Isolado do Subgrupo Severo do Vírus do Mosaico da Vigna. *Fitopatologia Brasileira*, 4:519-524. 1979.
- KUHN, C.W. Purification, Serology, and Properties of a New Cowpea Virus. *Phytopathology*, 53:853-857. 1964.
- KUHN, C.W., B.B. BRANTLEY & G. SOWELL. Southern Pea Virus: Identification, Symptomatology, and Sources of Resistance, Univ. Georgia Agric. Exp. Stan. Bul., 157, 22p. 1966.
- LIMA, J.A.A. Interactions between Strains of Squash Mosaic Virus in Pumpkin and Cantaloupe Plants. (Tese de mestrado). Univ. do Arizona. Tucson Arizona, 36pp. 1972.
- LIMA, J.A.A. Blackeye Cowpea Mosaic Virus: Purification, Partial Characterization, Serology and Immunochemical and Cytological Techniques for Detection of Virus Infected Legume Seeds. PhD Dissertation, Univ. Florida, Gainesville, USA, 154pp. 1978.
- LIMA, J.A.A. Testes Sorológicos para Identificação de Vírus de Leguminosas. *Fitopatologia Brasileira*. 4:215-225, 1979.
- LIMA, J.A.A. & J.M.F. CHAGAS. Purificação e Sorologia de "Tobacco Mosaic Virus" constatado em *Nicotiana tabacum* L. e *Lycopersicum esculentum* Mill., no Estado do Ceará. *Fitossanidade*, 1:23-25. 1974.
- LIMA, J.A.A. & M.R. NELSON. Etiology and Epidemiology of Mosaic of Cowpea in Ceará, Brasil. *Plant Disease Reporter*, 61:864-867. 1977.

- LIMA, J.A.A., D.E. PURCIFULL & E. HIEBERT. Purification, Partial Characterization, and Serology of Blackeye Cowpea Mosaic Virus. *Phytopathology*, 69:1252-1258. 1979.
- LIMA, J.A.A. & M.F.B. GONÇALVES. Transmissibilidade de Cowpea Mosaic Virus pelo Manhoso *Chalcodermus bimaculatus*. *Fitopatologia Brasileira*, 5:414. 1980 (Resumo).
- LIMA, J.A.A. & M.R. NELSON. Purificação e Identificação Sorológica de Cowpea Mosaic Virus em *Vigna Sinensis* Endl. no Ceará. *Ciência Agrônômica*, 3:5-8, 1973.
- LIN, M.T., J.R.N. ANJOS e G.P. RIOS. Ocorrência natural do Serotipo I do "Cowpea Mosaic Virus - Arkansas serogroup" em *Centrosema pubescens* e *Calopogonium mucunoides* no Brasil Central. *Fitopatologia Brasileira*, 5:418. 1980(a) (Resumo).
- LIN, M.T., J.R.N. ANJOS e G.P. RIOS. Agrupamento Serológico de 14 Isolados de "Cowpea Mosaic Virus - Arkansas serogroup" obtidos no Brasil Central. *Fitopatologia Brasileira*. 5:418. 1980(b) (Resumo).
- LIN, M.T. e G.P. RIOS. Infecção Natural e simultânea de *Vigna sesquipedales* por serotipos I e II do "cowpea mosaic virus-Arkansas serogroup". *Fitopatologia Brasileira*, 5: 420, 1980(c) (Resumo).
- LIN, M.T., J.R.N. ANJOS & G.P. RIOS. Serological Grouping of Cowpea Severe Mosaic Virus Isolates from Central Brasil. *Phytopathology*, 71:435-438, 1981(a).
- LIN, M.T., E.W. KITAJIMA & C.L. COSTA, New Serotypes of Cowpea Severe Mosaic Virus. *Phytopathology*, 71:890, 1981(b), (Abstract).
- LIN., M.T. & J.H. HILL. Identificação dos Determinantes Antigenicos e Isolamento do Anticorpo Comum dos 4 Serotipos do Vírus do Mosaico Severo do Caupi. Resumo do XV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, São Paulo, 172. 1982.

- MARTIN, J.H., W.H. LEONARD & D.L. STAMP. Principles of Field Crop Production. Third Edition, 1975.
- MATTHEWS, R.E.F. Plant Virology. New York. Academic Press Inc. 778pp. 1970.
- MINK, J.G. Peanut Stunt Virus nº 92 in Descriptions of Plant Viruses. Commonw. Mycol. Inst. Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England, 4pp, 1972.
- MORSE, J.W. Cowpeas; Culture and Varieties U.S. Dep. of Agriculture, 18pp. 1924 (Farmers' Bulletin, 1148).
- OUCHETERLONY, O. Diffusion - in-gel. Methods for Immunological Analysis II. Progr. Allergy, 6 : 30-154, 1962.
- PADMA, R. *Chenopodium murale* - A Differential Host of Cowpea Mosaic Viruses. Curr. Sci. 42 : 620, 1973.
- PERÉZ, J.E. & A. CORTÉS - MONLLOR. A Mosaic Virus of Cowpea from Puerto Rico. Plant Disease Reporter, 54 : 212-216. 1970.
- PHATAK, H.C. Seed - born Plant Virus - Identification and Diagnosis in Seed Heath Testing - seed, Sci. Technol. 2 : 3 - 155. 1974.
- PIO - RIBEIRO, G. & O.R. PAGUIO. Informações Bibliográficas sobre as Denominações "Cowpea Mosaic Virus" e "Cowpea Severe Mosaic Virus". Fitopatologia Brasileira, 5 : 373-376. 1980.
- SANDERLIN, R.S. Survival of Bean Pod Mottle and Cowpea Mosaic Viruses in Beetles following Intramocoelic Infections. Phytopathology, 63 : 259-261. 1973.
- SCOTT, H.A. Biochemical and Biophysical Properties of Beetle-Transmitted Viruses. Fitopatologia Brasileira, 4 : 189-193. 1979.

- SHEPARD, J.F. & R.G. GROGAN. Cowpea Chlorotic Mottle Virus n° 49 in Descriptions of Plant Viruses. Commonw. Mycol. Inst. Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England, 4pp, 1975.
- SHEPHERD, R.J. Serological Relationship between Bean Pod Mottle Virus and Cowpea Mosaic Viruses from Arkansas and Trinidad. *Phytopathology*, 53: 865-866. 1963.
- SHEPHERD, R.J. Properties of a Mosaic Virus of Cowpea and its relationship to the Bean Pod Mottle Virus. *Phytopathology*, 54: 466-473. 1964.
- SHEPHERD, R.J. Southern Bean Mosaic Virus n° 49 in Descriptions of Plant Viruses. Commonw. Mycol. Inst. Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England, 5pp. 1971.
- SMITH, C.M. Transmission of Cowpea Mosaic by the Bean Leaf Beetle. *Science*, 60: 268. 1924.
- SWAANS, H. & A. VAN KAMMEN. Reconsideration of the Distinction between the Severe and Yellow Strain of Cowpea Mosaic Virus. *Neth I. Pl. Path.* 79: 259-265, 1973.
- TOLIN, S.A. Identification of Legume Viruses in the Field by Serology. *Fitopatologia Brasileira*, 2: 1-7. 1977.
- TSUCHIZAAKI, T. Mulberry Ringspot Virus n° 142 in Descriptions of Plant Viruses. Commonw. Mycol. Inst. Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England, 4pp. 1975.
- VAN KAMMEN, A. Purification and Properties of Components of Cowpea Mosaic Virus. *Virology*, 31: 633-642, 1967.
- VAN KAMMEN, A. The Relationship between the Component of Cowpea Mosaic Virus. Two Ribonucleoprotein Particles Necessary for the Infectivity of CPMV. *Virology*, 34: 312-318. 1968.
- VAN KAMMEN, A. Cowpea Mosaic Virus. n° 47 in Descriptions of

- Plant Viruses. Commonw. Mycol. Inst. Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England, 4pp. 1971.
- VAN KAMMEN, A. & C.P. DE JAGER. Cowpea Mosaic Virus, n° 197 (n° 47 revised) in Descriptions of Plant Viruses. Commonw. Mycol. Inst. Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England, 4pp. 1978.
- VASCONCELOS, M.F.R. & J.A.A. LIMA Purificação e Sorologia de Raças de "Cowpea Severe Mosaic Virus" Isoladas de 4 Es pécies de Leguminosas. Fitopatologia Brasileira, 6:534. 1981 (Resumo).
- WALTERS, H.J. & O.W. BARNETT. Bean Leaf Beetle Transmission of Arkansas Cowpea Mosaic Virus. Phytopathology, 54:911. 1964 (Abstract).
- WU, G. & G. BRUENING. Two Proteins from Cowpea Mosaic Viru ses. Virology. 64:596-612. 1971.
- ZIEMIECKI, A. & K.R. WOOD. Serological demonstration of Virus-specific Proteins Associated with "Cucumber Mosaic Virus" Infection of Cucumber Cotyledons. Physiol. Plant. Pathol. 7:171-177. 1975.