

ESTUDO SOBRE A TRANSMISSIBILIDADE DE VÍRUS POR SEMENTES DE
FEIJÃO-DE-CORDA, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. E
DE LEGUMINOSAS NATIVAS DA REGIÃO NORDESTE

LÚCIA DE FÁTIMA SOUSA SILVEIRA

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

FORTALEZA - 1987

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.

Lúcia de Fátima Sousa Silveira

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 18/05/87

Prof. José Albérsio de Araújo Lima, Ph.D.
Orientador da Dissertação

Prof. Marcos Vinicius Assunção, Ph.D.

Prof. Jonas Paes de Oliveira, Ph.D.

Prof. Clairton Martins do Carmo, MS
Coordenador Substituto

Aos meus pais
José Ludgero da Silveira† e
Franci de Sousa Silveira,

D E D I C O

AGRADECIMENTOS

À Deus, que nas horas difíceis me concedeu força e perseverança para continuar este trabalho.

Ao Professor JOSÉ ALBÉRSIO DE ARAÚJO LIMA, pelas oportunidades e incentivo para a realização do curso e, sobretudo, pelos valiosos ensinamentos e segura orientação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES), pelos recursos financeiros.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia e a todo o corpo docente deste Departamento, pela atenção e ensinamentos durante o curso.

Aos professores MARCOS VINICIUS ASSUNÇÃO e JONAS PAES DE OLIVEIRA, pelas sugestões apresentadas e honrosas presenças na banca examinadora.

Aos funcionários do Laboratório de Virologia Vegetal e, em especial, à MARIA JOSÉ DA CUNHA LIMA e ELIANE DE LIMA MARCELINO, pela colaboração na execução dos trabalhos de laboratório e de datilografia.

À minha mãe, pelo incentivo e companheirismo em todos os momentos de minha vida, o meu mais profundo reconhecimento.

Aos meus tios GERARDO LOUZADA DE SOUZA e MARIA IRENE MIRANDA DE SOUZA, pelo carinho e inestimável amizade.

Às minhas irmãs, pelo afeto, compreensão e apoio.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela amizade, convivência e apreço durante todo o período do curso.

A todos, em fim, que de maneira direta ou indireta contribuíram para a elaboração deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE TABELAS</u>	viii
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	ix
<u>RESUMO</u>	x
<u>ABSTRACT</u>	xi
1 - <u>INTRODUÇÃO</u>	1
2 - <u>REVISÃO DE LITERATURA</u>	3
3 - <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	13
3.1 - <u>Análise de Sementes Comercializadas no Ceará</u> ..	13
3.1.1 - Origem das Amostras de Sementes	13
3.1.2 - Análise das Amostras de Sementes	13
3.1.2.1 - Análise visual das sementes	15
3.1.2.2 - Plantio direto	15
3.1.2.3 - Testes sorológico	16
3.1.2.4 - Exames citológicos	16
3.1.3 - Obtenção de Isolados de Vírus	17
3.2 - <u>Transmissibilidade de Vírus Através de Plantas Artificialmente Inoculadas</u>	17
3.2.1 - Obtenção de Sementes a Partir de Plantas Artificialmente Inoculadas, em Casa-de-Vegetação .	18
3.2.2 - Obtenção de Sementes a Partir de Plantas Artificialmente Inoculadas, em Condições de Campo.	19

3.2.3 - Análise de Sementes Colhidas de Plantas Infetadas por CpSMV	19
3.2.4 - Análise de Sementes Colhidas de Plantas Infetadas por CAMV	26
4 - <u>RESULTADOS</u>	27
4.1 - <u>Sementes Comercializadas</u>	27
4.1.1 - Amostras Obtidas	27
4.1.2 - Análise Visual das Amostras	28
4.1.3 - Plantio Direto	29
4.1.4 - Testes Sorológicos	29
4.1.5 - Exames Citológicos	30
4.1.6 - Obtenção de Isolados de Vírus	30
4.2 - <u>Estudo com Sementes de Plantas Artificialmente Inoculadas</u>	30
4.2.1 - Sementes de Plantas Inoculadas com CpSMV ..	30
4.2.2 - Sementes de Plantas Inoculadas com CAMV ..	34
5 - <u>DISCUSSÃO</u>	36
6 - <u>CONCLUSÕES</u>	43
7 - <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	44

LISTA DE TABELAS

TABELA	Página
1 Características de amostras de sementes comercializadas de feijão-de-corda, <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp., analisadas em função da presença de vírus	14
2 Número de sementes plantadas, número de sementes germinadas e percentagem de transmissão dos vírus CAMV e CMV de 18 amostras de feijão-de-corda, <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp., de diferentes procedências do Estado do Ceará em 1984..	28
3 Sementes de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp., 'Pitiúba' e 'Seridó' e <i>Macroptilium lathyroides</i> (L.) Urban sistematicamente infetadas por "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV), classificadas segundo seu fenótipo e resultados da avaliação da germinação e do vigor em papel GERMITEST e testes sorológico realizados com seus hipocôtilos	32
4 Sementes de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp., 'Pitiúba' e 'Seridó' e <i>Cassia occidentalis</i> (L.) sistematicamente infetadas por "cowpea aphid-borne mosaic virus" (CAMV) e resultados dos testes sorológicos realizados com as plantas oriundas do teste de plantio direto	35

LISTA DE FIGURAS

FIGURA

Página

- | | | |
|---|---|----|
| 1 | Sementes de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. cv. Pi
tiúba, colhidas de plantas sistematicamente infe
tadas por "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV),
apresentando-se normais, manchadas e enruga
das e manchadas. | 21 |
| 2 | Cartuchos formados por duas folhas de papel
GERMITEST, contendo 50 sementes de feijão-de-
corda, <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp., cada e se
mentes germinadas após um período de incubação
de 6-8 dias. | 22 |
| 3 | Plântulas de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp., cv.
Pitiúba classificadas em atrofiadas, pouco de
senvolvidas, e desenvolvidas, 6-8 dias após co
locadas para germinar em papel GERMITEST. ... | 23 |
| 4 | Teste sorológico de dupla difusão em agar para
demonstrar sua sensibilidade em detectar a pre
sença de "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV)
em mistura com extrato de hipocôtilos de plân
tulas com 6-8 dias. | 24 |
| 5 | Preparação de antígenos para teste sorológico,
a partir de plântulas com 6-8 dias. | 25 |
| 6 | Teste sorológico de dupla difusão em agar para
detectar a presença de "cowpea severe mosaic
virus" (CpSMV) em hipocôtilos de plântulas com
6-8 dias. | 33 |

RESUMO

No presente estudo objetivou-se identificar vírus transmitidos por sementes comercializadas de feijão-de-corda, *Vigna unguiculata*, assim como estudar a transmissibilidade por sementes de "cowpea aphid-borne mosaic virus" (CAMV) e "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV).

Foram testadas 18 amostras de sementes comercializadas de várias cultivares produzidas em diferentes localidades totalizando 17.720 sementes. Dentre as amostras testadas, cinco continham sementes infetadas somente com CAMV, em percentuais de 0,1 a 0,3%, uma amostra apresentou 1% de sementes com CAMV e 0,3% com "cucumber mosaic virus" (CMV) e outra exibiu 0,1% de transmissão apenas para CMV sendo que o CpSMV não foi detectado em nenhuma das amostras. Os resultados foram confirmados através de testes sorológicos com anti-soros específicos para os vírus em estudo.

As sementes de 'Seridó' e 'Pitiúba' provenientes de plantas artificialmente inoculadas com o CAMV apresentaram 0,1% de transmissão, enquanto que sementes de *Cassia occidentalis* colhidas de plantas infetadas não o perpetuaram. Nos estudos com CpSMV foram testadas sementes produzidas em condições de campo e de casa-de-vegetação, em totais de 2.000 da cv. Pitiúba, 626 da cv. Seridó e 1.200 de *Macroptilium lathyrOIDES*, mediante testes sorológicos com hipocôtilos de sementes germinadas em papel GERMITEST. Um grupo adicional de 1.500 sementes de *M. lathyrOIDES* foi testado pelo método de plantio direto. Não se constatou transmissão do CpSMV, entretanto, os sintomas induzidos pelo mesmo no tegumento das sementes reduziram seus percentuais de germinação e vigor das plântulas.

ABSTRACT

The objective of the present study was to identify the viruses transmitted by commercial seeds of cowpea, *Vigna unguiculata*, produced in the State of Ceará, as well as to investigate the seed-transmissibility of cowpea aphid-borne mosaic virus (CAMV) and cowpea severe mosaic virus (CpSMV) in cowpea and their native hosts.

Eighteen samples, involving 17.720 commercial seeds from different cultivars and produced in different areas were tested. Five samples had seeds infected only with CAMV, in percentages varying from 0.1 to 0.3%; one showed 1.0% of its seeds infected with CAMV and 0.3% with cucumber mosaic virus (CMV) and another one exhibited 0.1% of transmission for CMV alone. The CpSMV was not detected in neither one of the samples tested. All the results were confirmed by serology with specific antisera to the virus involved.

The seeds of cowpea cv. 'Seridó' and 'Pitiúba' obtained from artificially CAMV-inoculated plants showed 0.1% of transmission, while seeds harvested from *Cassia occidentalis* inoculated with the same virus were not able to transmit it. Seeds from CpSMV-infected plants produced in greenhouse and field conditions, in totals of 2.000 from cowpea 'Pitiúba', 626 from cv. 'Seridó' and 1.200 from *Macroptilium lathyroides*, were serologically tested, using hypocotyls of germinated seeds. An additional group of 1.500 seeds of *M. lathyroides* was tested by the growing-on method. The presence of CpSMV was not detected in neither one of the seeds tested, however, the virus induced severe symptoms on the cowpea seed tegument and reduced its percentage of germination and seedling vigour.

1 - INTRODUÇÃO

A qualidade das sementes disponíveis aos agricultores constitui um importante aspecto na produtividade agrícola de uma região, uma vez que, além de elementos de propagação das espécies, elas também funcionam como importantes veículos de disseminação de agentes causadores de doenças (MATTHEWS, 1970; SHEPHERD, 1972; PHATAK, 1974; WALKEY, 1985). A presença de agentes fitopatogênicos na semente pode afetar sua germinação e o vigor, emergência e desenvolvimento das plântulas, além de introduzir patógenos onde os mesmos ainda não existem.

Vários pesquisadores apontam as viroses como um dos fatores responsáveis por grandes prejuízos à cultura do feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., subsp. *unguiculata*, ocasionando perdas acentuadas da sua produção em diferentes partes do mundo, inclusive no Brasil (KUNH et al., 1966; ZETTLER & EVANS, 1972; KAISER & MOSSAHEBI, 1975; LIMA, 1978; GONÇALVES & LIMA, 1982; OLIVEIRA, 1985). No Estado do Ceará, as doenças de etiologia viral têm sido consideradas como um dos principais problemas fitopatológicos do feijão-de-corda, ocasionando elevadas reduções na sua produtividade (LIMA & NELSON, 1977; LIMA et al., 1981; GONÇALVES & LIMA, 1982). Levantamentos feitos por LIMA & NELSON (1974, 1977) mostraram o comovirus "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV, vírus do mosaic severo do caupi), como sendo o patógeno mais predominante sobre a cultura, no Ceará, na década de 70. Mais tarde, LIMA et al. (1979a) e LIMA et al. (1981) isolaram um potyvirus em plantas de feijão-de-corda cultivadas no Ceará e o identificaram como uma possível estirpe de "cowpea aphid-borne mosaic virus" (CAMV, vírus do mosaico do caupi transmitido por pulgão). Atualmente este vírus tem sido considerado como o responsável pela

virose do feijão-de-corda mais difundida no Ceará e Estados vizinhos (LIMA et al., 1979a; LIMA & LIMA, 1980; LIMA et al., 1984).

Existem evidências de que um apreciável número de vírus de plantas é eficientemente transmitido no tempo e no espaço através de sementes infetadas. De acordo com PHATAK (1974), muitos vírus são constantemente disseminados nas regiões tropicais e subtropicais destituídas de Programas de Produção e Certificação de Sementes. Com o objetivo de encontrar solução para esses problemas, pesquisas vêm sendo realizadas no sentido de melhorar os conhecimentos sobre a transmissão de patógenos através de sementes, objetivando desenvolver formas adequadas de controle, mediante a produção de sementes livres de patógenos. Dentro desta linha de pesquisa, o controle de várias viroses vegetais mediante o uso de sementes certificadas, tem sido sugerido por muitos estudiosos do assunto (FAJARDO, 1930; THOMAS & GRAHAM, 1951; ZETTLER & EVANS, 1972; BAKER, 1972; PHATAK, 1974; SINCLAIR & SHURLEFF, 1975; WILLIAMS, 1975; LIMA, 1978; MAGALHÃES & COSTA, 1978; TRINDADE et al., 1979; HOLLINGS & BRUNT, 1981; KAPER & WATERWORTH, 1981).

A presente atividade de pesquisa teve como objetivos precípuos, identificar vírus transmitidos por sementes comercializadas de feijão-de-corda no Ceará e estudar mais intensamente a transmissibilidade do CAMV e CpSMV em sementes de feijão-de-corda e nas suas hospedeiras nativas, através dos métodos de plantio direto e sorológico com sementes germinadas em papel GERMITEST. Parte dos resultados, aqui contida, já foi apresentada em congresso científico na forma de resumo (SILVEIRA & LIMA, 1986).

2 - REVISÃO DE LITERATURA

As sementes representam um importante meio de disseminação dos vírus de plantas de uma região para outra ou de uma época para outra, havendo várias pesquisas demonstrado que muitos vírus são transmitidos no espaço e no tempo através de sementes de plantas infetadas. FULTON (1964), listou 36 vírus transmitidos por sementes, dentre os quais se destacam: "soybean mosaic virus" (SoyMV, vírus do mosaico da soja) e "bean common mosaic virus" (BCMV, vírus do mosaico comum do feijoeiro), ambos pertencentes ao grupo potyvirus e importantes patógenos das duas leguminosas mais difundidas em todo o mundo, soja, *Glycine max* (L.) Merr. e feijão comum, *Phaseolus vulgaris* L. Mais tarde, MATTHEWS (1970) afirmou que, aproximadamente, um em cada dez vírus de plantas conhecidos era transmitido por sementes de plantas hospedeiras infetadas ou por polinização das flores de plantas saudáveis com pólen proveniente de plantas doentes. Entre os 256 vírus de plantas descritos no "Commonwealth Mycological Institute" (CMI) até setembro de 1985 (PURCIFULL & GONSALVES, 1985), 69 vírus foram experimentalmente transmitidos por sementes de uma ou mais espécies hospedeiras.

Embora a transmissão por sementes desempenhe importante papel na ecologia e epidemiologia de determinados vírus, na maioria dos casos, uma pequena porção da progénie resultante de plantas com vírus, apresenta-se infetada. Apesar de vários vírus serem transmitidos em altas proporções (60-90%) através de sementes, a transmissão para toda a progénie é bastante rara. Isto é verdadeiro até mesmo para aqueles vírus mais facilmente transmitidos por sementes tais como BCMV - 60 a 90% - (SMITH & HEWITT, 1938) e "barley stripe mosaic virus" (BSMV, vírus do mosaico estriado da cevada) - 90 a 100% - (GOLD et al., 1954; ATABEKOV & NOVIKOV, 1971).

REDDICK & STEWART (1919) foram os primeiros a demonstrar o fenômeno da transmissibilidade de vírus por sementes quando constataram que o BCMV era transmitido para 50% da progênie de plantas de *P. vulgaris* sistematicamente infetadas. A transmissão de vírus por sementes, já foi revista por FULTON (1964); BENNETT (1966); SHEPHERD (1972); BAKER (1972); PHATAK (1974) e LIMA (1978).

O percentual de transmissão de vírus por sementes pode ser afetado por vários fatores tais como: vírus e raças; relação vírus-hospedeiro; época de infecção e temperatura (MATTHEWS, 1970; SHEPHERD, 1972). ANDERSON (1957) testou a transmissão por sementes de duas estirpes de "bean yellow mosaic virus" (BYMV, vírus do mosaico amarelo do feijoeiro), em várias variedades de feijão-de-corda, constatando que uma das estirpes era transmitida por índices de até 1% em diferentes variedades, enquanto que outra atingiu um percentual de 55% de transmissão em uma das variedades testadas. SHEPHERD & FULTON (1962) descreveram uma estirpe do "southern bean mosaic virus" (SBMV, vírus do mosaico do sul do feijoeiro) que foi transmitida em 3 a 4% de sementes provenientes de plantas de feijão-de-corda infetadas. A combinação vírus-hospedeiro, aparentemente, é o principal fator a influenciar na transmissão por semente, podendo alguns vírus serem transmitidos por sementes em um hospedeiro enquanto em outros não. Para MATTHEWS (1970), a extensão da transmissão varia com a combinação vírus-hospedeiro em 0 - 100%. SMITH & HEWITT (1938) realizando estudos com 51 variedades de feijão comum infetadas com BCMV, observaram que a transmissão variou de menos de 1% a mais de 75%. MCLEAN (1941) observou que um vírus de feijão-de-corda era transmitido em, aproximadamente, 5% de sementes de variedades altamente suscetíveis, no entanto, variedades levemente suscetíveis ou com alguma resistência produziram baixos percentuais de sementes infetadas. A intensidade de transmissão para a progênie através da semente é altamente dependente da época na qual a semente ou pólen torna-se infetado. Normalmente a transmissão para a progênie só

ocorre quando as plantas são infetadas antes da fertilização do óvulo (SHEPHERD, 1972). Quanto mais cedo a planta for infectada maior será o percentual de transmissão do vírus pela semente (OWUSU et al., 1968). Por outro lado, CROWLEY (1959) relatou que o SBMV em embriões de feijão-de-corda ocorre quando as plantas mães são infetadas antes ou imediatamente após o florescimento. A transmissão por sementes, portanto, parece requerer que o embrião seja infectado nos primeiros estádios de desenvolvimento. Segundo SHEPHERD (1972) a temperatura é, provavelmente, o mais importante fator ambiental influenciando a transmissão. CROWLEY (1959), por exemplo, constatou a presença do BCMV em 95% dos embriões de sementes colhidas de plantas cultivadas em temperaturas de 16 - 20°C, enquanto que referido vírus foi constatado em apenas 50% de sementes produzidas em temperatura de 28 - 30°C.

Várias técnicas já foram desenvolvidas para detectar a presença de vírus em sementes. Entre as técnicas que podem ser usadas nos trabalhos de rotina dos Programas de Certificação e/ou Quarentena destacam-se as seguintes:

a) Análise visual - consiste em se fazer uma inspeção visual nas amostras de sementes, separando aquelas com modificações fenotípicas que possam ser causadas por vírus, tais como: manchas, necroses, redução do tamanho e enrugamento. Entretanto nem todas as sementes aparentemente sadias podem estar infectadas. Sugere-se, então, que todas as sementes analisadas através deste método, sejam testadas por procedimentos mais sensíveis (PHATAK, 1974; LIMA, 1978);

b) Plantio direto - as sementes são plantadas em solo esterilizado, em condições de casa-de-vegetação ou telado e as primeiras folhas são cuidadosamente examinadas com relação ao aparecimento de sintomas característicos de vírus, os quais podem variar com a combinação vírus-hospedeiro. Este método pode falhar sob condições ambientais desfavoráveis ao aparecimento dos sintomas e com estírpes latentes de vírus que não produzem sintomas visíveis. Da mesma forma, recomenda-se,

também, a realização de um teste complementar (PHATAK, 1974; LIMA, 1978).

c) Plantas indicadoras - as sementes são maceradas em grupos, na presença de solução tampão e o extrato obtido é mecanicamente inoculado em plantas indicadoras (hospedeira de lesão necrótica localizada), ou seja espécies vegetais que apresentam reações de hipersensibilidade aos vírus, na forma de lesões necróticas nos locais de infecção. Este método vem sendo usado em certos Programas de Certificação de Sementes para testar lotes com relação à presença de vírus. Tais programas têm sido aplicados com sucesso para os casos do BSMV e "lettuce mosaic virus" (LMV, vírus do mosaico da alface), nos Estados Unidos e alguns Países da Europa (ZINK et al., 1956; PHATAK, 1974; SLACK & SHEPHERD, 1975). No Brasil, de acordo com BATISTA (1985), é usado no programa de indexação de vírus no Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN);

d) Testes sorológicos de dupla difusão em agar - esta técnica sorológica tem sido usada e adaptada para detectar vírus em extratos de sementes isoladas (SCOTT, 1961), seus embriões individualmente (HAMILTON, 1965) e plântulas com 5 a 6 dias resultantes de sementes infetadas (LIMA, 1978; LIMA & PURCIFULL, 1979). Outras técnicas sorológicas mais aprimoradas e sofisticadas já foram desenvolvidas e adaptadas ao estudo de caracterização de vírus de plantas, assim como na constatação dos mesmos em sementes de plantas infetadas. Entre elas destacam-se, pela capacidade de detectar a presença de vírus em baixa concentração, a técnica sorológica de microscopia eletrônica e o teste de ELISA, a seguir descritos:

e) Técnica sorológica de microscopia eletrônica - desenvolvida por DERRICK & BRLANSKY(1976) tem sido usada, com muito sucesso para detectar a presença de partículas de vírus em extratos de grupos de sementes (HAMILTON & NICHOLS, 1977; LIMA, 1978; LIMA & PURCIFULL, 1979; KERLAN et al., 1981). A mesma consiste, basicamente, em colocar anti-soro específico para

vírus em telinhas apropriadas recobertas com filme de Parlodion e, em seguida, tratá-las com extrato de plantas infetadas. As partículas virais são fixadas e concentradas na superfície do filme de Parlodion, combinando-se com os anticorpos aderidos ao mesmo. No sentido de remover excessos de sais e outros componentes, as telinhas são lavadas com solução tamponada e água destilada por repetidas vezes. Para serem examinadas ao microscópio eletrônico, as mesmas são coradas com acetato de uranila. Segundo BATISTA (1985) este método sorológico, também, vem sendo usado nos Programas de Quarentena do CENARGEN;

f) Técnica de Elisa (= enzyme linked immunosorbent assay) - introduzida no estudo de vírus de plantas por VOLLE et al. (1976) e CLARK & ADAMS (1977), a técnica de ELISA tornou-se largamente usada para detectar infecção com vírus devido a sua alta sensibilidade. Os testes são realizados em placas de polisterina, dotadas de orifícios dentro dos quais ficam adsorvidos anticorpos específicos que imobilizam e prendem as partículas de vírus. Tais partículas combinam-se, então, com uma segunda camada de anticorpos previamente ligada a uma enzima apropriada. Após fortes e cuidadosas lavagens, os anticorpos ligados à enzima que reagirem especificamente com as partículas virais serão detectadas colorimetricamente pela adição de um adequado substrato (LIMA, 1982). Este método pode ser usado com vírus de diferentes características morfológicas (CLARK & ADAMS, 1977; JAFARPOUR et al., 1979; MARCO & COHEN, 1979; LIMA, 1982). O mesmo tem sido usado com êxito na identificação de sementes infetadas por vírus (HAMILTON & NICHOLS, 1977; LISTER, 1978; JAFARPOUR et al., 1979; ZAMBOLIM et al., 1985);

g) Citopatologia - levando em consideração que determinados vírus induzem a formação de inclusões específicas no interior de tecidos vegetais infetados, os hipócotilos de sementes germinadas podem ser testados através de estudos citopáticos ao microscópio ótico (LIMA, 1978; LIMA & PURCIFULL, 1979),

em complementação aos demais testes.

O intercâmbio internacional de sementes de várias espécies de leguminosas cultivadas tem se constituído num dos meios responsáveis pela larga distribuição geográfica de vírus transmitidos por sementes das espécies de maior importância na alimentação humana. As ocorrências do SoyMV em soja (BOS, 1972) e do BCMV em feijão (BOS, 1971), em diversos Países onde estas leguminosas têm sido testadas com relação à presença de vírus, ilustra muito bem esta afirmativa.

Em feijão-de-corda, GARDNER (1927) foi o primeiro a relatar a transmissão de vírus por sementes. Desde, então, muitos vírus que infetam naturalmente o feijão-de-corda têm sido transmitidos em maior ou menor proporção por sementes de plantas infetadas. Dentre eles destacam-se o "cowpea severe mosaic virus" (= CpSMV, vírus do mosaico severo do caupi); "cowpea mosaic virus" (=CpMV, vírus do mosaico do caupi); "cowpea aphid-borne mosaic virus" (=CAMV, vírus do mosaico do caupi transmitido por pulgão); "cucumber mosaic virus" (= CMV, vírus do mosaico do pepino); "blackeye cowpea mosaic virus" (=B1CMV, vírus do mosaico do "blackeye" caupi); "southern bean mosaic virus" (= SBMV, vírus dos mosaicos do sul do feijoeiro); "cowpea mottle virus" (= CMoV, vírus do mosqueado do caupi); "cowpea mild mottle virus" (= CMMoV, vírus do mosqueado leve do Caupi).

As informações sobre a transmissibilidade dos comovírus CpSMV e CpMV por sementes de feijão-de-corda, têm sido publicadas de forma bastante ambígua e baseadas em apenas alguns trabalhos que datam do período em que referidos vírus eram ainda considerados estirpes de um mesmo vírus (DALE, 1949; SHEPHERD, 1964; HAQUE & PERSAD, 1975). De acordo com estes autores a taxa de transmissão por sementes de CpSMV variava de 0-10% e, aparentemente, depende da cultivar envolvida. O trabalho desenvolvido por DALE (1949) mostrou que 8% das sementes de asparagus-bean, *Vigna sesquipedalis* (L.), provenientes de plantas infetadas com um isolado de CpSMV, foram capazes de transmiti-lo. Mais tarde SHEPHERD (1964), trabalhan-

do com um isolado do mesmo vírus em Arkansas, constatou um percentual de transmissão de 10% em sementes de feijão-de-corda. Por outro lado, PEREZ & CORTEZ-MONLLOR (1970) não constataram nenhum sintoma em, aproximadamente, 620 plantas de feijão-de-corda, variedade 'Blackeye' obtidas de sementes procedentes de plantas artificialmente inoculadas com CpSMV. Subsequentemente, HAQUE & PERSAD (1975) observaram que, dependendo da variedade de feijão-de-corda, a taxa de transmissão por sementes desse vírus, variava de 0,0 a 5,8%. GONÇALVES (1983) trabalhando com duas estirpes de CpSMV isoladas no Ceará (CpSMV-Ce) e no Piauí (CpSMV-Pi), não constatou a presença do mesmo em nenhuma das 1.626 sementes colhidas da cv. Pitiúba infetadas com CpSMV-Ce e das 4.954 sementes provenientes de plantas inoculadas com CpSMV-Pi, quando testadas mediante o método de plantio direto. Posteriormente, LIMA et al. (1983), usando a mesma cultivar e plantio direto, não constataram a presença do CpSMV-Ce em 7.395 sementes colhidas de plantas artificialmente inoculadas. De acordo com GAMEZ & MORENO (1983), a transmissão do CpSMV por sementes não tem sido constatada na América Central. Recentemente, SANTOS (1986) estudando a transmissão por sementes dos vírus que ocorrem no feijão-de-corda no Estado do Piauí, não encontrou a transmissão do CpSMV em 3.717 sementes das cvs. Seridó, Quebra Ca deira e CNCX 24-015E em testes realizados em regime de casa-de-vegetação, com plantas artificialmente inoculadas.

De acordo com a descrição do CpMV no CMI, em agosto de 1978 (van KAMMEN & de JAGER, 1978), o mesmo é considerado como transmitido por sementes de feijão-de-corda, com base no trabalho desenvolvido por GILMER et al. (1974) na Nigéria, os quais constataram sua transmissibilidade em índice de 1 a 5%.

A transmissão por sementes de "cowpea aphid-borne mosaic virus" (CAMV), vírus alongado pertencente ao grupo potyvirus (BOCK & CONTI, 1974), foi primeiramente relatada por LOVISOLI & CONTI (1966), o que, mais tarde, foi confirmado por muitos estudos envolvendo diferentes estirpes do vírus e va

riedades de feijão-de-corda (BOCK, 1973; BOCK & CONTI, 1974; FEGLA et al., 1981; OLIVEIRA, 1985). BOCK & CONTI (1974) afirmaram que embora altas percentagens de transmissibilidade por sementes hajam sido observadas para o CAMV, a sua transmissão por sementes de feijão-de-corda é bastante baixa(0-3%). LOVISOLI & CONTI (1966) já demonstravam que tal transmissão não ultrapassava ao índice de 1,6%. RAHEJA & LELEJI (1974) não encontraram nenhuma evidência sobre a transmissibilidade por sementes de uma possível estirpe de CAMV isolada de feijão-de-corda na Nigéria. Da mesma forma, LIMA et al. (1981), estudando um potyvirus identificado como uma possível estirpe de CAMV, no Ceará, não constataram a sua transmissibilidade em, aproximadamente, 1.500 sementes provenientes de plantas sistematicamente infetadas. Baixos percentuais de transmissão também foram conseguidos por FEGLA et al. (1981) e OLIVEIRA (1985). De acordo com os mencionados autores, foram constatados índices de transmissão de CAMV, variando de 0,80% a 1,02% em sementes de feijão-de-corda. Por outro lado, têm sido constatados índices de 2,9 a 19% para isolados do vírus na Índia (PHATAK, 1974; MALI et al., 1983) e de 1,1 a 39% para isolados do Irã (KAISER & MOSSAHEBI, 1975). Em meio a essas divergências ABOUL ATA et al. (1982) afirmaram que a transmissão do CAMV por sementes de feijão-de-corda, depende da estirpe do vírus e cultivar envolvidos.

De acordo com GIBBS & HARISSON (1970) a transmissibilidade do "cucumber mosaic virus" (CMV) - vírus poliédrico pertencente ao grupo cucumovirus não é muito frequente. No entanto, PHATAK (1974) afirmou que existem trabalhos relatando a transmissão de referido vírus por sementes de diferentes culturas. Segundo KAPER & WATERWORTH (1981), o CMV é transmitido através de sementes de 20 espécies vegetais, sendo que, em feijão-de-corda, a sua taxa de transmissão varia de 4 a 28%. ANDERSON (1957) relatou a transmissão de três vírus por sementes de feijão-de-corda, inclusive uma estirpe de CMV que foi transmitida através de 4 a 28% de sementes provenientes de plantas artificialmente

inoculadas. Um vírus bem relacionado com CMV apresentou uma taxa de transmissão de 5 a 16% em feijão-de-corda (CHENULU et al., 1968). Com base nos sintomas em plantas de feijão-de-corda provenientes de sementes comercializadas, GAY & WINSTEAD (1970) detectaram a transmissão do CMV por sementes, além da estirpe "cowpea" de "southern bean mosaic virus" (SBMV), considerada como estirpe do "BYMV ou BCMV". Outra estirpe de CMV isolada de feijão-de-corda em Marrocos, foi transmitida em, aproximadamente, 25% das sementes colhidas de plantas artificialmente inoculadas (FISCHER & LOCKHART, 1976). LIN et al. (1980, 1981) constataram uma taxa de transmissão de 5,4% para CMV, em sementes de feijão-de-corda cv. Seridó colhidas de plantas infetadas e de 2,5%, em sementes de Pitiúba (LIN et al., 1981). SANTOS (1986) trabalhando com um isolado de CMV constatou sua transmissão em 0,7% das sementes da cv. Quebra Cadeira, sem contudo, verificar sua transmissão nos genótipos Seridó e CNCX 24-015E. Segundo MALI et al. (1983), a taxa de transmissão de CMV em feijão-de-corda, variou de 3,5 a 31,5% de acordo com a cultivar.

O potyvirus "blackeye cowpea mosaic virus" (B1CMV) foi primeiramente encontrado na Flórida por ANDERSON (1955a, 1955b) e sua denominação original vem sendo mantida (ZETTLER & EVANS, 1972, EDWARDSON et al., 1972; LIMA, 1978; PIO RIBEIRO et al., 1978; LIMA et al., 1978; LIN et al., 1981), sendo finalmente, referendada com a sua descrição no CMI (PURCIFULL & GONSALVES, 1985). Sua taxa de transmissão por sementes varia de 3,5 a 55% e depende da cultivar de feijão-de-corda e isolados do vírus (ANDERSON, 1957; GAY & WINSTEAD, 1970; ZETTLER & EVANS, 1972; LIMA, 1978; MALI et al., 1983; PURCIFULL & GONSALVES, 1985). ZETTLER & EVANS (1972) encontraram 18% de sementes infetadas com B1CMV em lotes de sementes de feijão-de-corda comercializadas e UYEMOTO et al. (1973) constataram 28% de transmissão para vírus em feijão-de-corda cv. Knucle Purple Hull. PIO RIBEIRO et al. (1978), em suas pesquisas, encontraram índices de transmissão de 6,3% nas sementes da cv. Blackeye e de 5,4% na cv. Knucle Purple Hull. Pos-

teriormente, LIMA & PURCIFULL (1979), trabalhando com as cultivares Knucle Purple Hull e Early Ramshorn e usando técnicas de sorologia e plantio direto, encontraram índices de transmissão bem próximos para ambos os métodos. LIN et al. (1981) afirmam que com a cv. Alagoas, observaram 1,2% de transmissão do BLCMV isolado no Brasil.

A transmissão do "southern bean mosaic virus" (SBMV) - vírus poliédrico pertencente ao grupo sobemovirus- por sementes, ocorre, frequentemente, em feijão-de-corda, com taxas que variam de 5 a 40% (SHEPHERD & FULTON, 1962; LAMPTEY & HAMILTON, 1974; GIVORD, 1981). O trabalho desenvolvido por SHEPHERD & FULTON, (1962) mostrou índices de transmissão de 3 a 4% em plantas de feijão-de-corda originadas de lotes de sementes comercializadas. LAMPTEY & HAMILTON (1974), detectaram 1,3% de transmissão na variedade Early Ramshorn, enquanto que GIVORD (1981) constatou índices de 15 a 44%, também, em sementes de feijão-de-corda.

O "cowpea mottle virus" (CpMoV), cujo grupo ainda não se encontra definido, pode, também, ser transmitido por sementes de feijão-de-corda (BRUNT & KENTEN, 1974). SHOYNKA et al. (1978) detectaram até 10% de transmissão em sementes de plantas naturalmente infetadas e até 7% em plantas de diferentes cultivares artificialmente inoculadas, em diferentes estádios de desenvolvimento. Referidos autores observaram, ainda, que plantas artificialmente inoculadas nos primeiros estádios de desenvolvimento foram mais severamente afetadas pelo vírus; no entanto, aquelas inoculadas mais tarde produziram um maior percentual de sementes infetadas.

Um vírus isolado de feijão-de-corda, em Ghana, foi descrito e denominado de "cowpea mild mottle virus" (CpMMoV, vírus do mosqueado leve do caupi) por BRUNT & KENTEN (1973). O mesmo pertence ao grupo carlavirus (BRUNT, 1974) e pode ser transmitido por sementes de feijão-de-corda, soja e feijão comum. Os resultados dos trabalhos desenvolvidos por BRUNT & KENTEN (1973) demonstram que a transmissão do CpMMoV por sementes destas três leguminosas varia de 2 a 90%, sendo que em feijão comum a transmissão é menos frequente.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi conduzida em condições de campo e de casa-de-vegetação e no laboratório de Virologia Vegetal, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, durante os anos de 1985 e 1986.

3.1 - Análise de Sementes Comercializadas no Ceará

3.1.1 - Origem das Amostras de Sementes

Um total de 18 amostras de sementes de feijão-de-corda produzidas em diferentes Regiões do Estado do Ceará foi testado, segundo a metodologia, a seguir descrita, objetivando identificar os vírus mais comumente transmitidos por sementes no Estado. Amostras de 0,5 a 1,0 kg de sementes foram coletadas de diferentes lotes colocados à venda para os agricultores regionais através de postos da Companhia Cearense de Desenvolvimento Agropecuário (CODAGRO), Universidade Federal do Ceará (UFC), bem como daquelas produzidas por diferentes produtores de sementes credenciados ou pelos próprios agricultores. As 18 amostras obtidas, foram designadas de A₁, A₂, A₃ ... A₁₈ e caracterizadas em função da cultivar envolvida, local e época de produção e responsável pela sua comercialização (TABELA 1).

3.1.2 - Análise das Amostras de Sementes

Este estudo foi realizado usando-se os métodos mais

TABELA 1 - Características de amostras de sementes comerciais de feijão-de-corda *Vigna unguiculata* (L.) Walp., analisadas em função da presença de vírus.

AMOSTRAS	CARACTERÍSTICAS			
	Cultivar	Procedência	Período de produção	Responsável ou Produtor
A ₁	BR 1-Poty	Jaguaribe	84/1*	Adauto C. Ferreira
A ₂	BR 1-Poty	CODAGRO	84/1	CODAGRO
A ₃	CE-315	UFC	84/2	José Albérsio A. Lima
A ₄	Corujinha	Morada Nova	84/1	Ariosvaldo B. Maia
A ₅	EPACE-1	Quixeramobim	84/1	Nôdge Diógenes
A ₆	EPACE	Canindé	84/1	Coop. Agr. de Canindé
A ₇	Frade Preto	UFC	84/2	José Júlio da Ponte
A ₈	Fradão Maranhão	Barbalha	84/1	EPACE
A ₉	João Paulo II	UFC	84/2	Centro Ciênc. Agrar.
A ₁₀	Pitiúba	Morada Nova	84/1	Gerson Rabelo
A ₁₁	Pitiúba	S. Gonçalo	84/1	AGROVALE
A ₁₂	Pitiúba	Morada Nova	84/1	José Assis Oliveira
A ₁₃	Quarenta Dias	UFC	84/2	Centro Ciênc. Agrar.
A ₁₄	Seridó	UFC	84/2	Centro Ciênc. Agrar.
A ₁₅	Var. Local 1	Quixadá	84/1	Marcondes
A ₁₆	Var. Local 2	Morada Nova	84/1	Edílio Girão
A ₁₇	Var. local 3	Morada Nova	84/1	Osmar Rabelo
A ₁₈	Pitiúba	Quixadá	84/2	Raimundo Marques

* Ano/semestre

comumente empregados para detectar a presença de vírus em sementes, iniciando-se sempre com uma análise visual e complementando-se com as técnicas de plantio direto, sorologia e estudos citopatológicos.

3.1.2.1 - Análise visual das sementes

Todas as amostras foram, inicialmente, submetidas a uma análise visual, com o objetivo de separar aquelas com modificações fenotípicas, resultantes de possíveis infecções virais, tais como: manchas, redução do tamanho, necrose ou enrugamento (FIGURA 1). Em seguida, sub-amostras das sementes foram testadas pelo método de plantio direto, sempre complementado por testes sorológicos e estudos citopatológicos das plantas com evidências ou suspeitas de sintomas de natureza viral.

3.1.2.2 - Plantio direto

Sementes de todas as amostras foram testadas pelo método de plantio direto, desenvolvido em regime de casa-de-vegetação, com temperatura variando de 26 a 38°C. As amostras representadas por 800 a 1.000 sementes cada, foram semeadas em caixões contendo substrato esterilizado constituído por uma parte de esterco e duas de solo agrícola, em lotes de, aproximadamente, 500 unidades e as plantas resultantes foram, cuidadosamente, observadas por um período de 20 a 25 dias, em relação ao aparecimento de sintomas. Aos 15 dias após o plantio, foi realizado um desbaste rigoroso, eliminando-se as plantas consideradas sadias, em função do seu desenvolvimento e ausência de sintomas. Todas as plantas com sintomas aparentes e/ou com suspeita de infecção viral, bem co-

mo 10 coletadas ao acaso por cada grupo de 200 plantas, foram testadas sorologicamente em testes de dupla difusão em agar.

3.1.2.3 - Testes sorológicos

Estudos sorológicos foram realizados através de teste de dupla difusão em agar (OUCHTERLONY, 1962), em meio contendo 0,8% de agar noble, 1,0% de azida de sódio (NaN_3) e 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS), preparado de acordo com a metodologia descrita por PURCIFULL & BATHCHELOR (1977). Os testes para potyvirus foram desenvolvidos com anti-soros específicos para "blackeye cowpea mosaic virus" (B1CMV), potyvirus sorologicamente relacionado com o CAMV (LIMA *et al.*, 1979b) e "bean common mosaic virus" (BCMV, vírus do mosaico comum do feijoeiro). Testes para o comovirus CpSMV foram, também, realizados, sendo que, neste caso, usou-se meio de agar preparado com 0,8% de agar noble, 0,85% de NaCl e 0,05% de NaN_3 . Extratos de plantas a serem testados (antígenos) foram distribuídos em orifícios abertos no meio, em arranjos hexagonais, nos quais os orifícios centrais eram destinados aos anti-soros e os orifícios externos aos antígenos. Extratos de plantas saudáveis foram incluídos em todos os testes sorológicos, como controle. Quando os resultados mostravam inexistência de reação do material testado, com os anti-soros acima mencionados e determinadas plantas continuavam apresentando sintomas, estas eram submetidas a um novo teste, no qual se incluía anti-soro específico para "cucumber mosaic virus" (CMV, vírus do mosaico do pepino).

3.1.2.4 - Exames citológicos

Estudos citológicos foram também efetuados para con-

firmar ou não, infecções em plantas originadas das sementes testadas. Camadas de células da epiderme foliar foram coradas com uma combinação de calcomina laranja e "luxol" verde brilhante durante 5-10 min. Em seguida, foram lavadas em etanol a 95% por um período de, aproximadamente, 15s, com a finalidade de remover o excesso de corante. Finalmente, as camadas foram montadas em euparal e examinadas ao microscópio ótico, obedecendo à metodologia descrita por CHRISTIE & EDWARDSON (1977) e LIMA (1978).

3.1.3 - Obtenção de Isolados de Vírus

Os vírus identificados foram mecanicamente inoculados em plantas saudáveis de feijão-de-corda cv. Pitiúba com 8 a 10 dias após a semeadura, as quais foram mantidas em solos envasados, em condições de casa-de-vegetação, visando a manutenção dos vírus para estudos posteriores.

3.2 - Transmissibilidade de Vírus Através de Sementes de Plantas Artificialmente Inoculadas

A possibilidade da transmissão de CAMV e de CpSMV por sementes de plantas de *Vigna unguiculata*, *Cassia occidentalis* (CAMV) e *Macroptilium lathyroides* (CpSMV) sistematicamente infetadas pelos seus respectivos vírus, em condições de campo e de casa-de-vegetação, foi analisada através dos métodos de plantio direto e sorologia de sementes germinadas em papel GERMITEST, cuja metodologia será descrita posteriormente.

3.2.1 - Obtenção de Sementes a Partir de Plantas Artificialmente Inoculadas em Casa-de-Vegetação

Sementes de feijão-de-corda, 'Seridó' e 'Pitiúba', e das plantas nativas *C. occidentalis* e *M. lathyroides* foram semeadas em substrato esterilizado constituído por uma parte de esterco e duas de solo contido em vasos de, aproximadamente, 20 cm de diâmetro. Cultivou-se uma média de quatro plantas por vaso, perfazendo um total de 40 plantas para cada leguminosa, após o desbaste. A inoculação com CAMV foi realizada em 36 plantas de cada cultivar de feijão-de-corda e 36 de *C. occidentalis*, ficando as 12 plantas restantes sem inoculação, mantidas como testemunha. A mesma metodologia foi utilizada quando se efetuou a inoculação com CpSMV na cv. Seridó e *M. lathyroides*. Todas as inoculações foram realizadas na fase inicial de desenvolvimento das plantas, ou seja, 8 a 10 dias após a semeadura. O processo de inoculação dos vírus, consistiu na extração de seiva de tecido vegetal sistematicamente infetado pelos mesmos, mediante sua maceração com o auxílio de um almofariz na presença de solução tamponada de fosfato de potássio a 0,05M, pH 7,5, na proporção de 1,0g de tecido para 2,0 ml de solução. Após filtração em gaze dupla, pequena quantidade de "carborundum" foi adicionada ao extrato contendo o vírus o qual foi inoculado nas plantas sadias pela fricção das superfícies foliares com um pedaço de gaze embebido no mesmo. Logo após o aparecimento de sintomas, foi realizado um teste sorológico, com o objetivo de confirmar a infecção das plantas com o referido vírus. Decorrido um período de 100 dias para as cultivares Seridó e Pitiúba e 150 para *C. occidentalis* e *M. lathyroides*, as sementes foram colhidas e acondicionadas em geladeira para, posteriormente, serem testadas. Visando o controle de vetores, semanalmente, as plantas foram pulverizadas com inseticida monocrotophos.

No final de cada período de produção foram obtidas as seguintes quantidades de sementes das plantas sistemi-

camente infetadas com os respectivos vírus: a) 'Pitiúba' infetada com CAMV = 1.300 sementes; b) 'Seridó', infetada com CAMV = 425 sementes; c) 'Seridó' inoculada com CpSMV = 626 sementes; d) *Cassia occidentalis* infetada com CAMV = 940 sementes e e) *Macroptilium lathyroides* infetado com CpSMV = 2.700 sementes.

3.2.2 - Obtenção de Sementes a partir de Plantas Artificialmente Inoculadas em Condições de Campo

Foram realizados plantios de feijão-de-corda, visando a produção de plantas artificialmente inoculadas pelos vírus CAMV e CpSMV em condições de campo, na Fazenda Lavoura Seca em Quixadá-CE e em áreas irrigadas do Centro de Ciências Agrárias, em Fortaleza-CE. Em Quixadá, as cultivares Seridó e Pitiúba foram artificialmente inoculadas com CAMV, enquanto que, em Fortaleza, plantou-se somente a cultivar Pitiúba que foi inoculada com CpSMV. Todas as plantas foram mantidas sob observações periódicas, tendo-se o cuidado de eliminar aquelas que não apresentassem sintomas. As sementes colhidas foram, também, conservadas em geladeira e posteriormente testadas mediante os métodos de plantio direto e soro^{logia} com sementes germinadas em papel GERMITEST.

No final dos períodos de produção, foram colhidas as seguintes quantidades de sementes a partir das plantas inoculadas e sistematicamente infetadas com cada vírus: a) 'Pitiúba' infetada com CAMV = 1kg de sementes; b) 'Pitiúba' infetada com CpSMV = 2kg de sementes e c) 'Seridó' infetada com CAMV = 1kg de sementes.

3.2.3 - Análise de Sementes Colhidas de Plantas Infetadas por CpSMV

Um total de 626 sementes provenientes da cv. Seridó,

2.000 daquelas produzidas por 'Pitiúba' e 1.200 por plantas de *M. lathyroides* infetadas com CpSMV, foram colocadas para germinar em papel GERMTEST e, em seguida, submetidas a testes sorológicos de dupla difusão em agar contra anti-soro específico para CpSMV.

As sementes foram, inicialmente, submetidas a uma análise visual e classificadas em normais, manchadas e enrugadas e manchadas (FIGURA 1). Em seguida, foram, superficialmente, desinfetadas com hipoclorito de sódio a 0,5% durante 10 min. e postas para germinar entre duas folhas de papel GERMTEST umedecidas em água destilada e esterilizada, usando-se 50 sementes para as cultivares Seridó e Pitiúba e 100 para *M. lathyroides* por cada par de folhas de papel. Cada conjunto era disposto sob a forma de cartucho e colocado dentro de um bêcher, na posição vertical (FIGURA 2), contendo uma lâmina de 1-2 cm de água destilada e esterilizada. Os bêchers contendo entre quatro a seis cartuchos eram incubados em estufa incubadora BOD, regulada à temperatura de, aproximadamente, 27°C. Decorrido um período de 6-8 dias, foi realizada uma análise visual das plântulas as quais foram classificadas em atrofiadas, pouco desenvolvidas e desenvolvidas (FIGURA 3). Em seguida, as mesmas eram testadas sorologicamente, usando-se extrato de hipocôtilo de cada duas plântulas por orifício da periferia destinados aos抗ígenos. A opção de duas plântulas por orifício foi tomada em função dos resultados de testes preliminares com抗ígenos de CpSMV obtidos de folhas de plantas infetadas, diluídos em várias proporções com extrato de hipocôtilos de plântulas saudáveis, que confirmaram a presença de faixa de precipitação visível até mesmo quando uma parte do extrato de folhas com CpSMV era diluído com 9 partes do extrato de hipocôtilos saudáveis (FIGURA 4). Os hipocôtilos foram cortados em partes iguais com o auxílio de um bisturi esterilizado, macerados e, os extratos colocados nos orifícios do meio de agar contidos na placa (FIGURA 5). Hipocôtilos de plantas saudáveis, bem como tecidos de plantas infetadas foram incluídos em todos os testes, como controle. O

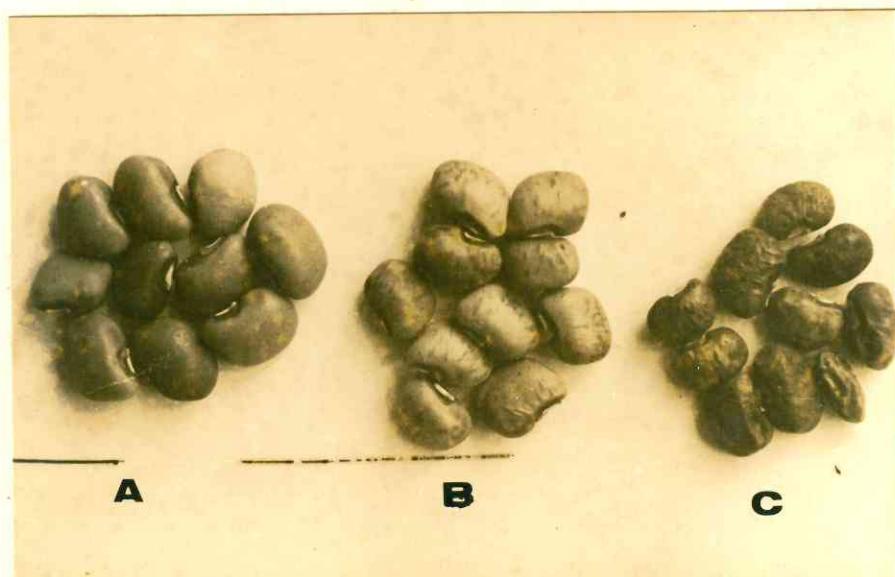


FIGURA 1 - Sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. Pitiúba colhidas de plantas sistematicamente infetadas por "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV), apresentando-se normais (A), manchadas (B) e enrugadas e manchadas (C)

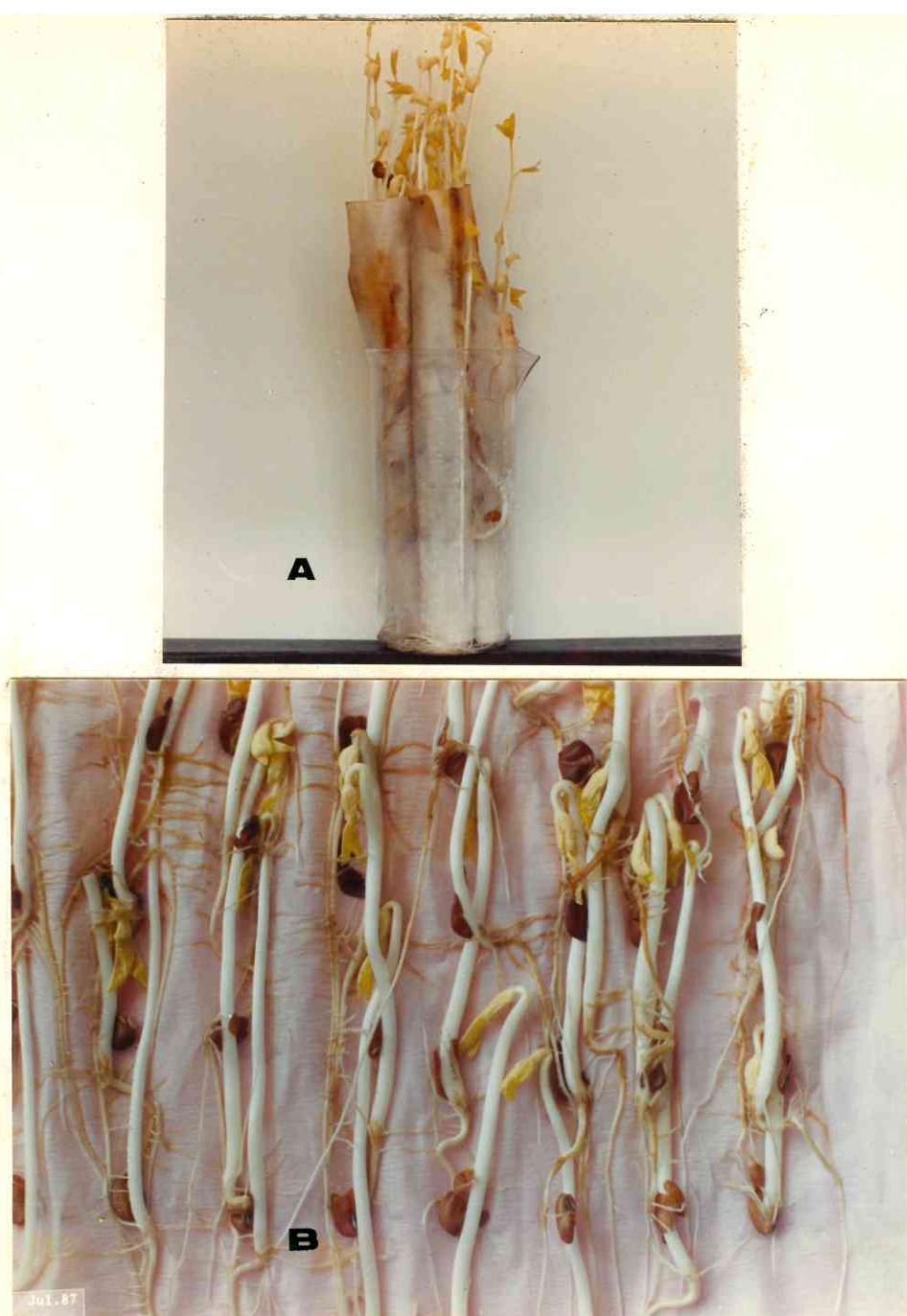


FIGURA 2 - Cartuchos formados por duas folhas de papel GERMITEST, contendo 50 sementes de feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., cada (A) e sementes germinadas após um período de incubação de 6-8 dias (B).

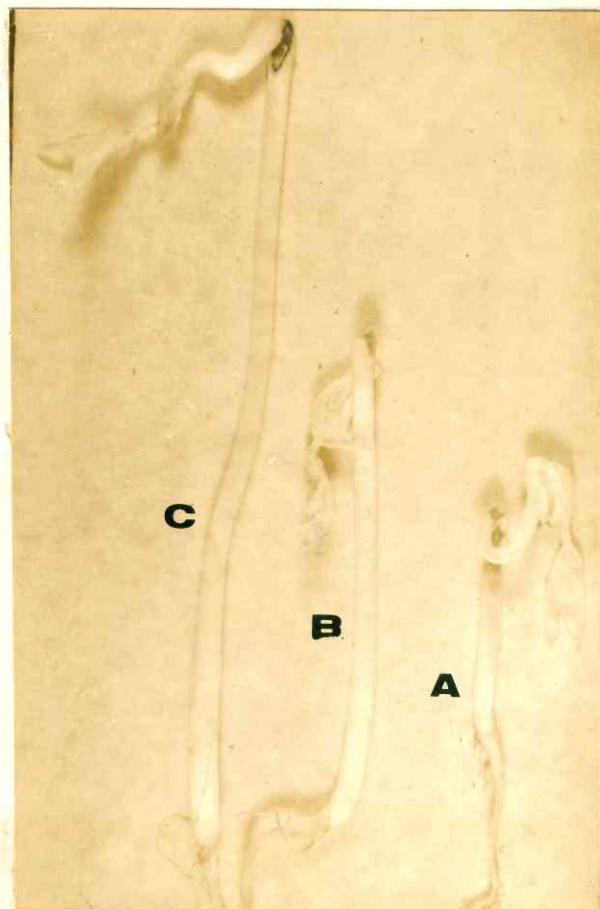


FIGURA 3 - Plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. Pitomba classificadas em atrofiadas (A), pouco desenvolvidas (B) e desenvolvidas (C), 6-8 dias após colocadas para germinar em papel GERMITEST.

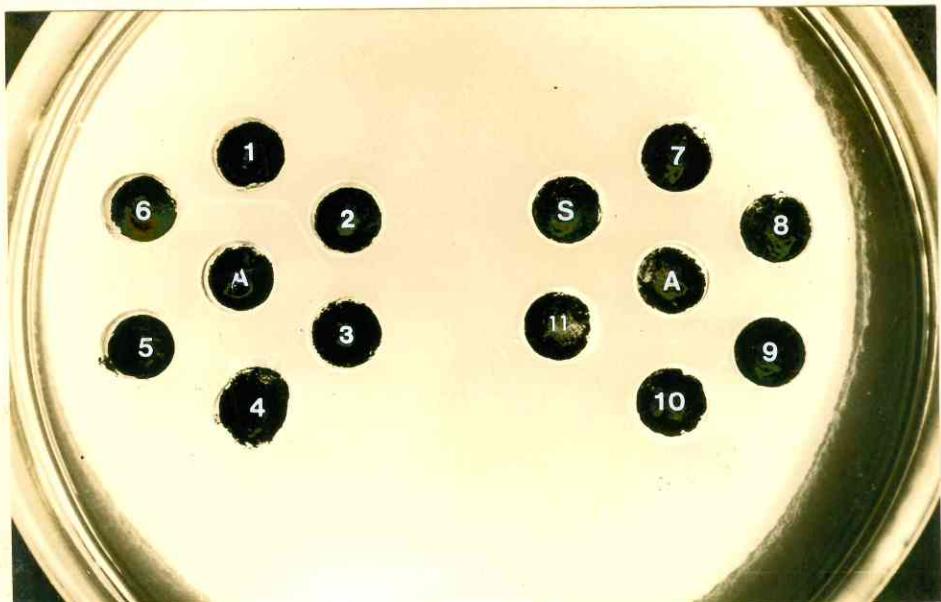


FIGURA 4 - Teste sorológico de dupla difusão em agar para demonstrar sua sensibilidade em detectar a presença de "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV) em mistura com extrato de hipocôtilos de plântulas com 6-8 dias. Os orifícios foram preenchidos da seguinte maneira: (A) - Anti-soro específico para CpSMV; (1) - extrato de folhas infetadas com CpSMV; (S) - extrato de hipocôtilo saudável. Os demais orifícios foram preenchidos com extratos resultantes da mistura de tecido foliar infetado com CpSMV e hipocôtilos saudáveis, nas seguintes diluições: (2) - 1:2; (3) - 1:3; (4) - 1:4; (5) - 1:5; (6) - 1:6; (7) - 1:7; (8) - 1:8; (9) - 1:9; (10) - 1:10 e (11) - 1:11.

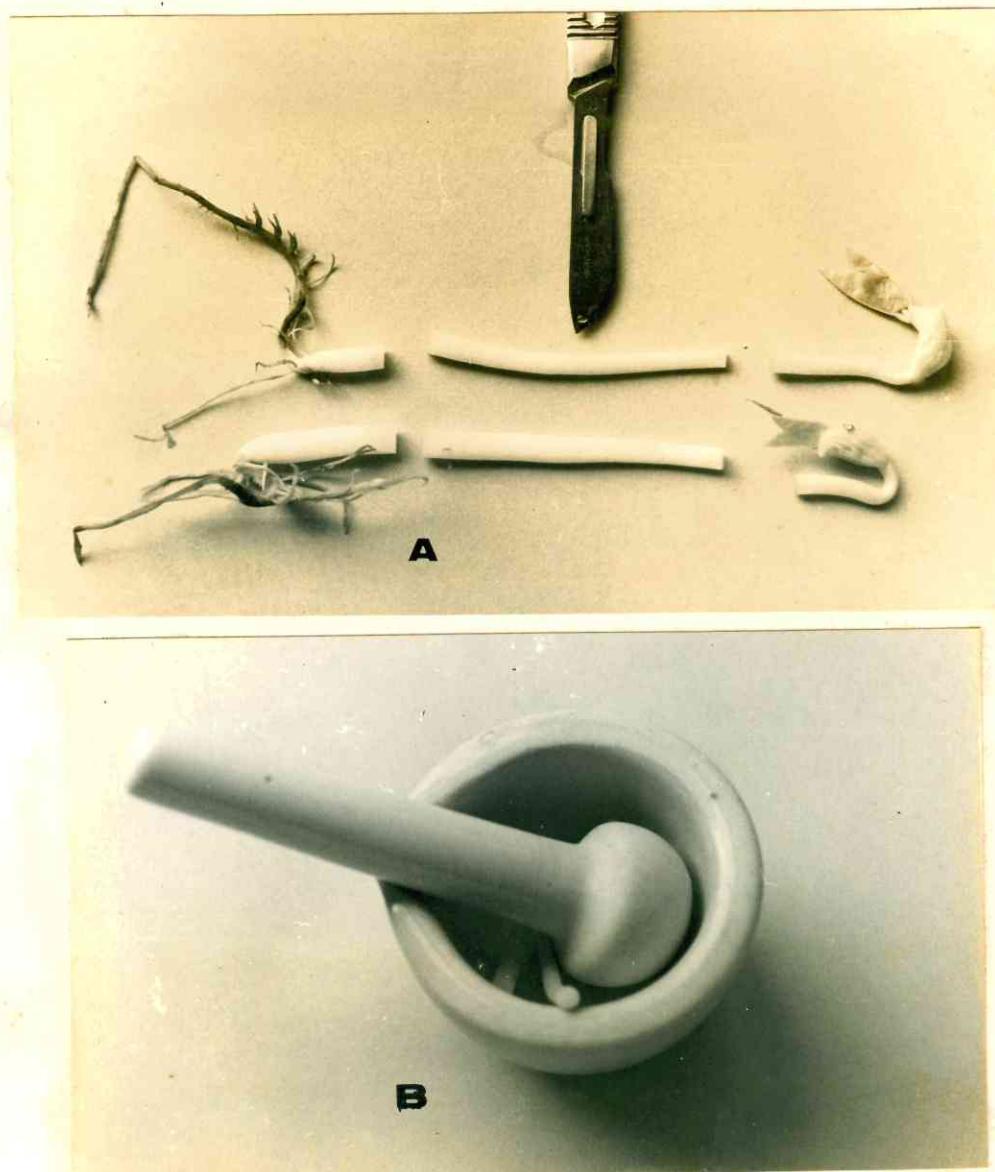


FIGURA 5 - Preparação de antígenos para teste sorológico, a partir de plântulas com 6-8 dias.
(A) - conjunto formado por dois pedaços de hipocôtilos, seccionados com bisturi esterilizado; (B) - maceração dos pedaços de hipocôtilos em almofariz esterilizado.

antígeno homólogo foi constituído por 1,0g de tecido foliar infetado com o CpSMV, macerado juntamente com 1,0g de hipocô_lo sadio.

2.3.4 - Análise de Sementes Colhidas de Plantas Infetadas por CAMV

Um total de 1.425 sementes provenientes da cultivar Seridó sistemicamente infetadas com CAMV, assim como 2.300 de Pitiúba e 940 de *C. occidentalis*, também infetadas por CAMV, foram testadas através do método de plantio direto, anteriormente descrito. Todas as plantas com sintomas ou com suspeitas de infecção viral e 10 com aspecto sadio, escolhidas aleatoriamente entre cada 200 plantas oriundas de sementes testadas, foram submetidas a testes sorológicos, visando confirmar os resultados obtidos mediante observações das reações sintomatológicas.

4 - RESULTADOS

4.1 - Sementes Comercializadas

4.1.1 - Amostras Obtidas

Foram obtidas 18 amostras dos seguintes órgãos ou localidades de produção, constituídas das cultivares, a seguir relacionadas, todas produzidas no ano agrícola de 1984: CODA GRO: 'BR 1 - Poty'; UFC: 'CE-315', 'Frade Preto', 'João Pau lo II', 'Quarenta Dias' e 'Seridó'; Barbalha: 'Fradão Mara nhão'; Canindé: 'EPACE-1'; Jaguaribe: 'BR 1-Poty'; Morada Nova: 'Curujinha', 'Pitiúba' (2 amostras), Variedade local (2 amostras); Quixadá: 'Pitiúba', Var. local; Quixeramobim: 'EPA CE-1'; São Gonçalo do Amarante: 'Pitiúba' (TABELA 1).

As amostras pesavam de 0,5 a 1,0kg de sementes cada, havendo sido testadas sub-amostras de 860 a 1.000 sementes nos testes de plantio direto (TABELA 2).

4.1.2 - Análise Visual das Amostras

Analizando-se as amostras obtidas constatou-se que todas as sementes apresentavam-se sem nenhuma evidência de sintomas de vírus, mostrando, no entanto, algumas modificações das colorações normais, provavelmente, em consequência das condições de produção e de armazenamento das mesmas. Tal afirmação é respaldada pelos baixos percentuais de germinação apresentados pelas amostras com sementes escurecidas (A_{10} e A_{15}).

TABELA 2 - Número de sementes plantadas, número de sementes germinadas e percentagem de transmissão dos vírus CAMV e CMV de 18 amostras de feijão-de-corda, de diferentes procedências do Estado do Ceará em 1984.

AMOSTRAS (Procedências)	Sementes Semeadas	Sementes Germinadas	% de transmissão	
			CAMV	CMV
A ₁ (Jaguaribe)	1000	959	0,0	0,0
A ₂ (CODAGRO)	1000	890	0,0	0,0
A ₃ (Quixadá)	1000	986	0,0	0,0
A ₄ (Morada Nova)	1000	614	0,0	0,0
A ₅ (Quixeramobim)	1000	773	0,1	0,0
A ₆ (Canindé)	1000	686	0,0	0,0
A ₇ (Quixadá)	1000	913	0,0	0,0
A ₈ (Barbalha)	1000	940	0,0	0,0
A ₉ (UFC)	1000	980	0,0	0,0
A ₁₀ (Morada Nova)	1000	597	0,0	0,2
A ₁₁ (São Gonçalo)	1000	981	0,0	0,0
A ₁₂ (Morada Nova)	860	710	0,3	0,0
A ₁₃ (UFC)	1000	670	0,0	0,0
A ₁₄ (UFC)	1000	795	0,3	0,0
A ₁₅ (Quixadá)	960	307	1,0	0,3
A ₁₆ (Morada Nova)	960	662	0,2	0,0
A ₁₇ (Morada Nova)	1000	953	0,0	0,0
A ₁₈ (Quixadá)	1000	770	0,3	0,0

4.1.3 - Plantio Direto

De conformidade com os dados obtidos dentre as 18 amostras testadas perfazendo um total de 17.720 sementes, 9.964 germinaram e apenas 13 sementes deram origem a plantas infetadas.

Coincidemente, as amostras com maior número de sementes germinadas não apresentaram nenhum tipo de infecção, enquanto a amostra A₁₅ que apresentou maior número de sementes infetadas, registrou o menor índice de germinação. Tal fato, possivelmente, está ligado às condições ambientais e graus de incidência de pragas e patógenos nos campos de cultura destinados à produção de tais sementes.

4.1.4 - Testes Sorológicos

As amostras A₁, A₂, A₃, A₄, A₆, A₇, A₈, A₉, A₁₁, A₁₃ e A₁₇, embora tenham dado origem a algumas plantas com sintomas aparentes de vírus, que desapareciam com o desenvolvimento das plantas, não apresentaram nenhuma reação específica nos testes sorológicos com anti-soros para os potyvirus BLCMV e BCMV, o comovirus CpSMV e o cucumovirus CMV. Por outro lado, os resultados dos testes sorológicos contidos na TABELA 2 revelaram os seguintes percentuais de transmissão de CAMV e CMV, por sementes das amostras A₅ (0,1% CAMV); A₁₀ (0,2% CMV); A₁₂ (0,3% CAMV); A₁₄ (0,3% CAMV); A₁₅ (1,0% CAMV e 0,3% CMV); A₁₆ (0,2% CAMV); A₁₈ (0,3% CAMV).

4.1.5 - Exames Citológicos

Os estudos de microscopia ótica revelaram a presença de inclusões citoplasmáticas típicas daquelas induzidas por potyvirus (EDWARDSON, 1974) nas células das epidermes foliares provenientes de plantas resultantes de sementes infetadas por CAMV.

4.1.6 - Obtenção de Isolados de Vírus

Isolados de CAMV e CMV foram obtidos a partir das plantas resultantes de sementes infetadas através da técnica de inoculação mecânica. Referidos vírus foram mantidos em casa-de-vegetação, mediante repicagens periódicas de plantas infetadas para plantas saudáveis, desde suas identificações até o final do experimento, a fim de serem utilizados como teste-munhas positivas nos testes sorológicos, frequentemente, realizados. Observações efetuadas, durante o processo de repicagem mostraram um retardamento no aparecimento de sintomas nas plantas inoculadas com CMV, não havendo sido, todavia, o mesmo observado com o potyvirus CAMV, cujos sintomas mostravam-se visíveis, 5 - 7 dias após as inoculações.

4.2 - Estudo com Sementes de Plantas Artificialmente Inoculadas

4.2.1 - Sementes de Plantas Inoculadas com CpSMV

A análise visual de 2.000 sementes de feijão-de-corda cv. Pitiúba provenientes de plantas infetadas com CpSMV

revelou a existência de 450 sementes com aparência normal, 1.075 manchadas e 475 enrugadas e manchadas (FIGURA 1). Por outro lado, todas as 626 sementes da cv. Seridó produzidas em casa-de-vegetação apresentaram-se manchadas enquanto que as 2.700 sementes de *M. lathyroides*, também provenientes de plantas infetadas com CpSMV foram consideradas com aparência normal, isto é, sem nenhuma modificação fenotípica. Enquanto as sementes de 'Pitiúba' com aparência normal (FIGURA 1-A) apresentaram um índice de germinação de 82,8%, as sementes manchadas (FIGURA 1-B) exibiram um percentual de 79,9% e aquelas enrugadas e manchadas (FIGURA 1-C) mostraram-se com um percentual de germinação em torno de 76,4%. Da mesma forma, as plântulas resultantes das diferentes categorias de sementes foram classificadas em atrofiadas, pouco desenvolvidas e desenvolvidas (FIGURA 3), objetivando-se investigar qual a categoria que possuiria maior índices de sementes infetadas. Os resultados, contudo, apresentaram-se negativos para todas as categorias testadas separadamente. Por outro lado, constatou-se um certo relacionamento entre a qualidade das sementes e o vigor das plântulas. As sementes com aparência normal (FIGURA 1-A) produziram menor percentual de plântulas atrofiadas (FIGURA 3-A) do que sementes manchadas (FIGURA 1-B) e as enrugadas e manchadas (FIGURA 1-C), como mostram os resultados contidos na TABELA 3. Tais resultados são indicativos de que a par de reduzir quantitativamente a produtividade do feijão-de-corda (GONÇALVES, 1983), o vírus afeta de forma considerável, a qualidade das sementes, tornando-as impróprias para o plantio e indesejáveis para o consumo.

Os resultados dos testes sorológicos com hipocôtilos de sementes germinadas em papel GERMITEST, envolvendo todas as sementes das cultivares 'Pitiúba' e 'Seridó' (FIGURA 6) e 1.200 de *M. lathyroides*, revelaram a ausência do CpSMV, confirmado a sua não transmissibilidade por sementes. Resultados semelhantes foram obtidos nos testes de plantio direto com 1.500 sementes de *M. lathyroides*.

TABELA 3 - Sementes de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp., 'Pitiúba' e 'Seridó' e *Macroptilium lathyroides* (L.) Urban sistematicamente infetadas por "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV), classificadas segundo o seu fenótipo e resultados da avaliação de germinação e do vigor em papel GERMITEST e de testes sorológicos com seus hipocôtilos.

Categorias de Sementes	Número de Sementes Testadas	% de Germinação	% de Sementes Infetadas	% Atrofia-das	Pouco Desenvolvidas	Desenvolvidas
<i>Vigna unguiculata</i>						
'Pitiúba'						
-Aparência normal	450	82,8	0,0	19,0	28,1	35,7
-Manchadas	1.075	79,9	0,0	19,8	29,4	31,7
-Enrugadas e Manchadas	475	76,4	0,0	25,4	24,0	27,0
'Seridó'						
-Manchadas	626	80,8	0,0	18,3	35,7	26,8
<i>Macroptilium lathyroides</i>						
-Aparência normal	1.200	*	0,0	*	*	*

* não determinados.

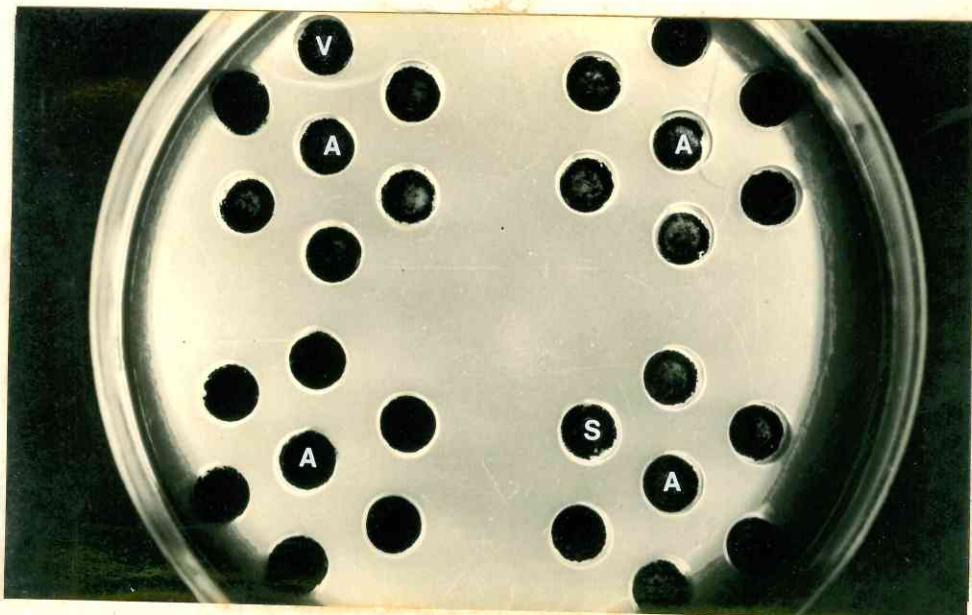


FIGURA 6 - Teste sorológico de dupla difusão em agar para detectar a presença de "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV) em hipocôtilos de plântulas com 6 a 8 dias. (A) - Antisoro específico para CpSMV. (V) - Tecido foliar infetado com CpSMV e (S) - hipocôtilos saudáveis. Os demais orifícios foram preenchidos com extrato preparado a partir de pares de hipocôtilos de sementes germinadas.

4.2.2 - Sementes de Plantas Inoculadas com CAMV

Os resultados de teste de plantio direto complementados com testes sorológicos das sementes colhidas de plantas de feijão-de-corda e de *C. occidentalis* infetadas com CAMV, revelaram um percentual de transmissão de 0,1% para ambas as cultivares 'Seridó' e 'Pitiúba', sem contudo mostrar nenhum resultado positivo com sementes de *C. occidentalis* (TABELA 4).

TABELA 4 - Sementes de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp., 'Pitiúba' e 'Seridó' e *Cassia occidentalis* (L.) sistemicamente infetadas por "cowpea aphid-borne mosaic virus" (CAMV) e resultados dos testes sorológicos realizados com as plantas oriundas de teste de plantio direto.

Espécies Vegetais	Nº de Sementes testadas	Nº de Sementes germinadas	Sorologia Sementes Infetadas (%)
<i>Vigna unguiculata</i>			
'Pitiúba'	2.300	2.210	0,1
'Seridó'	1.425	1.375	0,1
<i>Cassia occidentalis</i>	940	*	0,0

* não determinado

5 - DISCUSSÃO

Os baixos índices de transmissão de vírus por sementes constatados na presente pesquisa podem ser justificados pelas condições de alta temperatura em que algumas sementes foram produzidas, pelas baixas taxas de transmissão próprias dos vírus envolvidos, pela tolerância ou grau de resistência por parte de algumas cultivares utilizadas e pelas falhas inerentes ao próprio método de plantio direto usado para maioria dos casos.

De acordo com MATTHEWS (1970) e SHEPHERD (1972), a temperatura é o principal fator ambiental que afeta a transmissão de vírus por sementes. Plantas desenvolvidas em temperaturas elevadas, normalmente, produzem sementes com baixos percentuais de vírus. Para HOLLINGS & BRUNT (1981), alguns potyvirus apresentam-se mais severos em condições de baixas temperaturas do que sob condições de temperatura acima de 25°C e outros deixam até de induzir sintomas em plantas cultivadas em temperaturas mais elevadas. As sementes resultantes de plantas artificialmente inoculadas, em regime de casa-de-vegetação, foram produzidas sob temperaturas variando de 26 a 38°C, o que, possivelmente, deve ter interferido na taxa de transmissão do CAMV, resultando no baixo índice de 0,1% constatado. Segundo WALKEY (1985) tratamentos com altas temperaturas têm sido largamente usados na produção de plantas livres de vírus. Existem evidências que dentro de uma planta infetada, a síntese e a degradação de vírus ocorrem simultaneamente e à altas temperaturas a síntese do vírus pára mas a sua degradação continua (WALKEY, 1985). Isto explicaria porque os vírus são eventualmente erradicados de plantas infetadas mantidas à temperatura de 30 a 40°C, apesar de que temperaturas mais altas sejam requeridas para inativar o ví-

rus in vitro. De acordo com PHATAK (1974) os sintomas de Soymv são melhores expressados à temperaturas de 20 a 25°C porém, próxima ou acima de 30°C a infecção sem sintomas ocorre frequentemente. De acordo com observações efetuadas no de correr desta pesquisa, os sintomas do potyvirus CAMV expressaram-se melhor em temperaturas próximas a 30°C.

Os baixos índices de transmissão encontrados para o CAMV nas amostras de sementes comercializadas, estão dentro dos limites (0 a 3%) registrados para o mesmo na literatura (LOVISOLI & CONTI, 1966; BOCK & CONTI, 1974). Da mesma forma, as taxas de transmissão de CMV por sementes de feijão-de-corda, registrados na literatura (PIO RIBEIRO et al., 1978; LIN et al., 1981; SANTOS, 1986), são na maioria dos casos, baixas. Por outro lado os baixos percentuais e a reduzida frequência com que o CMV foi encontrado nas amostras de sementes testadas, deve-se, possivelmente, ao fato da baixa incidência com que este vírus deve ocorrer no Ceará, levando em consideração que o mesmo foi detectado pela primeira vez em feijão-de-corda no Estado, no ano de 1985 (LIMA & SANTOS, 1985). Por outro lado, a sua constatação em sementes produzidas no interior, amostra A₁₀ proveniente de Morada Nova e amostra A₁₅ produzida em Quixadá, significa um aumento no seu grau de dispersão, uma vez que o mesmo só havia sido identificado em campos de cultura no município de Fortaleza (LIMA & SANTOS, 1985). Outro aspecto que, também, poderia ter influenciado para os baixos percentuais de transmissão do CMV seria o tempo de 20 a 25 dias em que as plantas foram observadas, uma vez que existem evidências de que ocorre um retardamento no aparecimento de sintomas deste vírus. LIN et al. (1981) observaram um mascaramento de sintomas em culturas de feijão-de-corda 2-3 semanas após a inoculação.

No tocante ao comovirus CpSMV, muitos trabalhos têm demonstrado sua não transmissibilidade por sementes (PEREZ & CORTEZ-MONLLOR, 1970; GONÇALVES, 1983; LIMA et al., 1983; GAMEZ & MORENO, 1983; SANTOS, 1986) contrariando os resultados de outras investigações sobre o assunto (DALE, 1949;

SHEPHERD, 1964; HAQUE & PERSAD, 1975). O elevado número de sementes testadas dentre aquelas constantes das amostras co
mercializadas (17.720) e sementes de plantas artificialmente
inoculadas (2.626), associado à alta eficiência e sensibilidade
do método sorológico empregado para o último caso, con
stituem evidências confirmatórias da não transmissibilidade des
te vírus por sementes de feijão-de-corda. A par da não con
tatação de sintomas típicos de CpSMV nas plantas resultantes
das 17.720 sementes comercializadas, nenhum resultado positi
vo foi observado nos testes sorológicos com anti-soro especí
fico para o referido vírus, envolvendo, aproximadamente, 709
plantas com suspeita de sintomas e/ou coletadas ao acaso den
tre aquelas que tomaram parte no teste. De outra parte, os
testes sorológicos com hipocôtilos de 2.626 sementes germinada
das em papel GERMITEST, são evidências incontestes da não
transmissibilidade do vírus, uma vez que a sensibilidade do
método empregado ficou devidamente comprovada para o caso
(FIGURA 4). O curioso fato de sementes com sintomas resultantes
de infecções virais não perpetuarem o vírus pode ser ex
plicado pela necessidade da localização embrionária do vírus
para que possa ocorrer a sua transmissão (MATTHEWS, 1970;
BAKER, 1972; SHEPHERD, 1972; WALKEY, 1985). Provavelmente o
CpSMV infeta o tegumento ocasionando os sintomas de manchas
e enrugamentos sem, contudo, atingir o embrião.
LIMA et al. (1983) detectaram a presença do mesmo em
diferentes partes das sementes verdosas colhidas de plantas
sistemicamente infetadas enquanto que em sementes secas o vírus
foi constatado somente no tegumento de algumas delas. Tudo
indica, portanto que o vírus é inativado durante a maturação
e secagem das sementes (ROSS, 1970). Além do mais, os
resultados obtidos por GAY (1969) indicaram que "cowpea chlorotic
mottle virus" pode ser detectado na casca de sementes imaturas
mas não em sementes secas. O fato do CpSMV ocasionar
sintomas evidentes nas sementes (FIGURA 1) de plantas infetadas,
sem, contudo, ser perpetuado pelas mesmas (TABELA 3)
é uma demonstração de que a simples análise visual das

sementes constitui um método bastante falho para determinar taxas de transmissibilidade de vírus. Segundo ROSS (1970) a percentagem de sementes de soja com SoyMV não pode ser prognosticada pela quantidade de sementes manchadas, uma vez que o vírus foi igualmente transmitido por sementes manchadas e não manchadas.

A resistência ou tolerância por parte das cultivares utilizadas é um outro fator que pode ter influenciado os resultados. De acordo com as pesquisas desenvolvidas no Laboratório de Virologia Vegetal da Universidade Federal do Ceará, a cultivar CE-315 mostrou-se imune ao CAMV, enquanto a 'BR 1-Poty' comportou-se como altamente resistente ao referido potyvirus (LIMA *et al.*, 1981; 1986). Estas cultivares apresentam boas características agronômicas e ambas encontram-se envolvidas em programas de controle deste potyvirus nos Estados do Ceará e Piauí.

Embora o teste de plantio direto, sozinho ou em associação com a sorologia, tenha sido largamente usado para detectar a presença de vírus em lotes de sementes, o seu bom desempenho requer temperatura adequada, condições livres de insetos vetores e períodos de duração variando de 2 a 6 semanas. KAISER & MOSSAHEBI (1974) relatam que os sintomas não se evidenciavam até a fase de formação da segunda ou terceira folha trifoliada em plantas de feijão comum resultante de sementes infetadas com BCMV. HAQUE & PERSAD (1975) estudando a transmissão de CpSMV, mantiveram as plantas sob observação por um período de 40 dias. COCKBAIN *et al.* (1976) encontraram que sob altas temperaturas, os sintomas foram frequentemente moderados e efêmeros e as plântulas de *P. vulgaris* infetadas por "broad bean stain virus" permaneceram sem sintomas óbvios por mais de 6 semanas. Por tais razões, a estimativa da quantidade de sementes infetadas por vírus de leguminosas através do método de plantio direto pode ser dificultada devido a existência de infecção sem sintomas. Os baixos índices de transmissão de CAMV encontrados na presente pesquisa, podem, possivelmente, ter sido resultantes das ele-

vadas temperaturas (26-38°C) sob as quais os testes foram conduzidos e o não aparecimento de sintomas durante o período de observação de 20 a 25 dias. No entanto, a fim de minimizar o problema do retardamento no aparecimento de sintomas, para cada grupo de 200 plantas, 10 foram testadas sorologicamente, independente da presença ou não de sintomas. Uma forma de obter informações mais precisas sobre a transmissibilidade deste vírus por sementes, seria preparar anti-soro específico para o mesmo em quantidade suficiente de viabilizar o uso do teste sorológico com hipocôtilos de sementes germinadas em papel GERMITEST, usado nos testes com o CpSMV. LIMA (1978) ao desenvolver o referido teste, demonstrou sua eficiência e sensibilidade para detectar a presença de outros potyvirus - B1CMV e SoyMV - em sementes de feijão-de-corda e soja, respectivamente. LIMA & PURCIFULL (1979) apresentaram várias vantagens desta técnica na identificação de sementes infetadas por vírus, mas concluíram que a escolha do método deverá fundamentar-se, prioritariamente, nos objetivos e experiências dos pesquisadores, no grau de sensibilidade requerido e nos equipamentos e materiais disponíveis. Com base em tais parâmetros, optou-se pelo método de plantio direto para todos os estudos envolvendo CAMV.

De acordo com as informações contidas na literatura (SNYDER, 1942; SHEPHERD, 1964), a transmissão de vírus por semente pode atingir níveis elevados em testes experimentais, enquanto que em lotes de sementes comercializadas, as taxas de transmissão correspondentes são normalmente menores. Os resultados contraditórios obtidos para o caso do CAMV na presente atividade de pesquisa, são justificados pelo efeito das elevadas temperaturas, já mencionado, na produção de sementes destinadas aos testes experimentais. Entretanto, mesmo nos casos de baixo percentual de transmissão, a semente infetada é de importância crítica na introdução de vírus em Regiões ou Países onde o mesmo ainda não existe ou em campos de cultura isolados em que ela constitui a única fonte inicial de vírus. De acordo com STACE-SMITH

(1981), os baixos níveis de transmissão de comovírus por sementes comercializadas, parecem constituir a maior fonte inicial de vírus nos campos de cultura. A larga distribuição do SoyMV em soja (BOS, 1972) e do BCMV em feijão comum (BOS, 1971) nos Países onde estas leguminosas são cultivadas, servem para ilustrar o relevante papel que as sementes desempenham na distribuição dos vírus a longa e curta distâncias. De acordo com PHATAK (1974), várias leguminosas são constantemente propagadas juntamente com seus vírus transmitidos por sementes, principalmente nos Países destituídos de programas organizados de produção e certificação de sementes livres de vírus.

Embora não se tenha constatado a transmissibilidade de CpSMV e de CAMV por sementes de suas hospedeiras nativas *M. lathyroides* e *C. occidentalis*, respectivamente, as características destas leguminosas de semi-perenidade e de resistência às secas devem desempenhar importante papel na sobrevivência e ecologia de referidos vírus, máxime do CpSMV, cuja não transmissibilidade por sementes de feijão-de-corda foi aqui confirmada. Segundo GAMEZ & MORENO (1983) a transmissão de CpSMV por sementes, não tem sido constatada na América Central e a larga expansão do vírus dentro dos plantios de feijão-de-corda é atribuída a fontes fora da cultura, a maioria constituída pela planta nativa *M. lathyroides* (ALCONERO & SANTIAGO, 1973; LIMA & NELSON, 1977). A par de *M. lathyroides*, outras leguminosas nativas também funcionam como reservatórios naturais de CpSMV, no Nordeste brasileiro (VASCONCELOS, 1982; LIMA *et al.*, 1983). A hospedeira nativa de CAMV - *C. occidentalis* - tem também marcante influência na sobrevivência e perpetuação deste vírus, constituindo-se em importante reservatório natural do mesmo (LIMA *et al.*, 1981). De qualquer forma, o estudo da transmissibilidade de CpSMV e CAMV por sementes de suas hospedeiras nativas deve ser mais explorado, envolvendo um maior número de sementes produzidas em condições de temperaturas mais amenas e, se possível em condições naturais.

A par de demonstrar que as sementes de feijão-de-cor-

da produzidas no Ceará, estão servindo para aumentar os graus de dispersão dos vírus CAMV e CMV, a presente pesquisa confirmou a não transmissibilidade de CpSMV através de sementes das principais cultivares plantadas no Estado. De outra parte, a não constatação da presença do potyvirus B1CMV nas 17.720 sementes comercializadas, testadas, é um indicativo da sua inexistência no Ceará, o que tem sido sempre evidenciado nos estudos de levantamentos sobre viroses do feijão-de-corda em referido Estado (LIMA & NELSON, 1974; 1977; LIMA et al., 1980; 1984).

6 - CONCLUSÕES

Nas condições em que foram desenvolvidas as atividades da presente pesquisa, os resultados permitem-nos emitir as seguintes conclusões:

- a) As taxas de transmissão do CAMV e CMV por sementes de feijão-de-corda mostraram-se baixas, entretanto, podem desempenhar importante papel na sua disseminação a longa distância e na introdução de fontes iniciais de vírus dentro de uma cultura;
- b) A temperatura sob a qual as sementes foram produzidas deve ter influenciado para os baixos índices de transmissão;
- c) A não constatação do BLCMV nos testes realizados com as 17.720 sementes comercializadas é um indicativo de sua ausência no Estado do Ceará;
- d) O CpSMV induz a formação de sintomas em sementes de plantas infetadas, exibidos na forma de manchas e enrugamento, sem, no entanto, ser transmitido através das mesmas;
- e) Mencionados sintomas afetam a qualidade das sementes, tornando-as impróprias para o consumo e com tendência a reduzir seu potencial de germinação e vigor das plântulas;
- f) O método de análise visual é bastante falho, visto que nem sempre sementes manchadas encontram-se infetadas enquanto que sementes aparentemente sadias podem apresentar infecção e transmitir o vírus.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUL ATA, A.E.; ALLEN, D.J.; THOTTAPPILLY, G. & ROSSEL, H. W. Variation of cowpea aphid-borne mosaic virus in cowpea. Tropical Grain Legume Bulletin 25: 2-7. 1982.
- ALCONERO, R. & SANTIAGO, A. Phaseolus lathyroides as a reservoir of cowpea mosaic virus in Puerto Rico. Phytopathology 63: 120-122. 1973.
- ANDERSON, C.W. Vigna and Crotalaria viruses in Florida. I. Preliminary report on a strain of cucumber mosaic virus obtained from cowpea plants. Plant Dis. Rep. 39: 346-348. 1955a.
- ANDERSON, C.W. Vigna and Crotalaria viruses in Florida. II. Notations concerning cowpea mosaic virus (Marmor vignae). Plant Dis. Rep. 39: 349-352. 1955b.
- ANDERSON, C.W. Seed transmission of three viruses in cowpea. Phytopathology 47: 515. 1957. (Abstr.).
- ATABEKOV, J.G. & NOVIKOV, V.K. Barley strip mosaic virus. № 68 IN: Descriptions of plant viruses. England, Common. Mycol. Inst. Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, 1971. 4p.
- BAKER, K.F. Seed Pathology IN: KOZLOWSKI, T.T. Seed biology, ed. New York Academic Press, 1972. Cap. 5, p. 317-416.
- BATISTA, M.F. Quarentena de material vegetal. Fitopatologia Brasileira 10: 207-208. 1985. (Abstr.).

BENNET, C.W. Seed transmission of plant virus IN: SMITH, K. M.; LAUFER, M.A. Advances in virus research. New York, Academic press, 1966. V. 14, p. 221-261.

BOCK, K.R. East african strains of cowpea aphid-borne mosaic virus. Ann. Appl. Biol. 74: 75-83. 1973.

BOCK, K.R. & CONTI, M. Cowpea aphid-borne mosaic virus. № 134 IN: Descriptions of plant viruses. England, Commonw. Mycol. Assoc. Appl. Biol., New, Surrey, 1974. 4p.

BOS, L. Bean common mosaic virus. № 173 In: Descriptions of plant viruses. England, Commonw. Mycol. Inst. Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, 1971. 4p.

BOS, L. Soybean mosaic virus № 39 In: Descriptions of plant viruses. England, Commonw. Mycol. Inst. Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, 1972. 4p.

BRUNT, A.A. Tropical leguminous crops. Glasshouse Crop Research Institute. Anual Report. 1974. (Abstr.).

BRUNT, A.A. & KENTEN, R.H. Cowpea mild mottle a newly recognized virus infecting cowpea (*Vigna unguiculata*) in Ghana. Ann. Appl. Biol. 74: 67-74. 1973.

BRUNT, A.A. & KENTEN, R.H. Cowpea mild mottle virus. № 140 In: Descriptions of plant viruses. England, Commonw. Inst. Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, 1974. 4p.

CHENULU, V.V.; SACHCHIDANANDA, J. & MEHTA, S.C. Studies on a mosaic disease of cowpea from India. Phytopathology Z 63: 381-387. 1968.

CHRISTIE, R.G. & EDWARDSON, J.R. Light electron microscopy of plant virus inclusions. Florida Agric. Exp. Stn. Monogr. Ser. 9, 150p. 1977.

CLARK, M.F. & ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate method of enzymelinked immonosorbent assay for the detections of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475-483. 1977.

CROWLEY, N.C. Studies on the time of embryo infection by seed transmited viruses. Virology 8: 116-123. 1959.

COCKBAIN, A.J.; BOWEN, R. & VORRA-URAI, S. Seed transmission of broad bean stain virus and achtes ackerbohnemosaik-virus in field bean (*Vicia faba*). Ann. Appl. Biol. 84: 321-332. 1976.

DALE, W.T. Observations on a virus disease of cowpea in Trinidad. Ann. Appl. Biol. 36: 372-383. 1949.

DERRICK, K.S. & BRLANSKY, R.H. Assay for viruses and mycoplasms using serologically specific electron microscopy. Phytopathology 66: 815-820. 1976.

EDWARDSON, J.R. Some properties of the potato virus-Y group. Fla. Agric. Exp. Stn. Monogr. Ser. 4, 398p. 1974.

EDWARDSON, J.R.; ZETTLER, F.W.; CHRISTIE, R.G. & EVANS, I.R. A citological comparison of the inclusions as a basis for distinguishing tow filamentous legume viruses. Jr. Gen. Virol. 15: 113-118. 1972.

FAJARDO, T.G. Studies on the mosaic disease of the bean. Phytopathology 20: 469-494. 1930.

FEGLA, G.I., SHAWKAT, A.L.B. & MOHAMMAD, S.Y. Certain viruses affecting cowpea and root nodulations. Mesopotāmia J. Agric. 16: 137-152. 1981.

FISCHER, H.U. & LOCKHART, B.E. A strain of cucumber mosaic virus isolated from cowpea in Marroco. Phytopathology Z. 85: 43-48. 1976.

FULTON, R.W. Transmission of plant viruses by grafting, dodder, seed and mechanical inoculation In: CORBETT, M. K. & SISLER, H.D. Plant Virology. Gainesville, Florida University Press, 1964. Cap. 3, p. 39-61.

GAMEZ, R. & MORENO, R.A. Epidemiology of beetle-borne viruses of grain legumes in Central America. In: PLUMB, R.T. & THRESH, J.M. Plant virus epidemiology. The spread control of insect-borne viruses. Boston, Blackwell Scientific Publications. 1983. p. 103-113.

GARDNER, M.W. Seed transmission of cowpea mosaic. Proc. Ind. Acad. Sci. 43. 1927.

GAY, J.D. Effect of seed maturation on the infectivity of cowpea chlorotic mottle virus. Phytopathology 58: 1609-1965. 1969.

GAY, J.D. & WINSTEAD, E.E. Seed borne viruses and fungi from southern pea seed grown in eight states. Plant. Dis. Rep. 54: 243-245. 1970.

GIBBS, A.J. & HARRISON, B.D. Cucumber mosaic virus N° 1 In: Descriptions of plant viruses. England, Commonw. Mycol. Inst. Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, 1970. 4p.

GILMER, R.M.; WHITTNEY, W.K. & WILLIAMS, R.J. Epidemiology and control of cowpea mosaic in Western Nigéria. In: IITA, Proceeding on the 1st grain legume improvement workshop, IITA, Ibadan, Nigéria, 29 October-2 November 1974.

GIVORD, L. Southern bean mosaic virus, located from cowpea (*Vigna unguiculata*) in the Ivory Coast. Plant Disease 65: 755-756. 1981.

GOLD, A.H.; SUNESON, C.A.; HOUSTON, B.R. & OSWALDO, J. W. Electron microscopy and seed pollen transmission of rod shaped particles associated with the false stripe virus disease of barley. Phytopathology 44: 115-117. 1954.

GONÇALVES, M.F.B. Purificação e sorologia de duas raças de "cowpeal severe mosaic virus" isoladas no Ceará e Piauí e avaliação de seus efeitos em feijão-de-corda. Fortaleza, Universidade Federal do Ceará. 75p. 1983. Tese de Mestra do.

GONÇALVES, M.F.B. & LIMA, J.A.A. Efeitos do cowpea severe mosaic virus sobre a produtividade do feijão-de-corda cv. Pitiúba. Fitopatologia Brasileira 7: 547. 1982.

HAMILTON, R.I. An embryo test for detecting seed borne barley stripe mosaic virus in barley. Phytopathology 55: 798-799. 1965.

HAMILTON, R.I. & NICHOLS, C. Serological methods for detection of pea seed-borne mosaic virus in leaves and seeds of *Pisum sativum*. Phytopathology 68: 539-543. 1977.

HAQUE, S.Q. & PERSAD, G.C. Some observations on the seed transmission of beetle transmitted cowpea mosaic virus. In: BIRD, J. & MARAMOROSCH, K. Tropical diseases of legumes, New York, Academic Press. 1975. p. 119-121.

HOLLINGS, M. & BRUNT, A.A. Potyvirus In: KURSTAK, E. Handbook plant virus infections. Comparative diagnosis. Amsterdam, Elsevier, 1981. Cap. 23, p. 731-799.

- JAFARPOUR, B.; SHEPHERD, R.J. & GROGAN, R.G. Serological detection of bean common mosaic and lettuce mosaic viruses in seed. Phytopathology 69: 1125-1129. 1979.
- KAISER, W.J. & MOSSAHEBI, G.H. Natural infection of mung-bean by bean common mosaic virus. Phytopathology 64: 1209-1214. 1974.
- KAISER, W.J. & MOSSAHEBI, G.H. Studies with cowpea aphid-borne mosaic virus and effect on cowpea in Iran. FAO Plant Protection Bull. 23: 33-39. 1975.
- KAPER, J.M. & WATERWORTH, H.E. Cucumovirus IN: KURSTAK, E. Handbook of plant virus infections. Comparative diagnosis. Amsterdam, Elsevier, 1981. Cap. 11, p. 257-323.
- KERLAN, C.; MILLE, B. & DUNEZ, J. Immunusorbent electron microscopy for detecting apple chlorotic leaf spot and plum pox viruses. Phytopathology 71: 400-404. 1981.
- KUNH, C.W.; BRANTLEY, B.B. & SOWELL, G. Southern pea viruses: identification, symptomatology and sources of resistance. Univ. Georgia Agric. Exp. Stn. Bull. 157. 22p. 1966.
- LAMPTHEY, P.N. & HAMILTON, R.I. A new cowpea strain of southern bean mosaic virus from Ghana. Phytopathology 64: 1100-1104. 1974.
- LIMA, J.A.A. Blackeye cowpea mosaic virus: Purification partial characterization, serology and immunochemical and cytological techniques for detection of virus infected legumes seeds. Gainesville, University of Florida, 154p. 1978. Tese Doutorado.
- LIMA, J.A.A. Técnicas sorológicas para a diagnose de viroses vegetais In: Primeira conferência sobre impacto das doen

cas virais no desenvolvimento dos países Latino-americanos e da região do Caribe. Rio de Janeiro. Instituto Oswaldo Cruz. 1982. v. 2,p. 592-611.

LIMA, J.A.A., GONÇALVES, M.F.B. & SILVEIRA, L.F.S. Ausência de transmissão de cowpea severe mosaic virus" através de sementes de feijão-de-corda cv. Pitiúba. Fitopatologia Brasileira 8: 619. 1983. (Abstr.).

LIMA, J.A.A. & LIMA, M.G.A. Ocorrência de um potyvirus em feijão-de-corda no Estado do Rio Grande do Norte. Fitopatologia Brasileira 5: 415. 1980. (Abstr.).

LIMA, J.A.A. & NELSON, M.R. Purificação e identificação sorológico de cowpea mosaic virus em *Vigna sinensis*. Endl. no Ceará. Ciência Agronômica 3: 5-8. 1974.

LIMA, J.A.A. & NELSON, M.R. Etiology and epidemiology of mosaic of cowpea in Ceará, Brazil. Plant Dis. Rep. 63: 864-867. 1977.

LIMA, J.A.A.; OLIVEIRA, F.M.E.S. & PAIVA, J.B. Algumas propriedades biológicas e citológicas de um potyvirus isolado de caupi no Estado do Ceará. Fitopatologia Brasileira 4: 1119-1120. 1979a. (Abstr.).

LIMA, J.A.A.; OLIVEIRA, F.M.E.S.; KITAJIMA, E.W. & LIMA, M.G.A. Propriedades biológicas, citológicas e sorológicas de um potyvirus isolado de feijão-de-corda. Fitopatologia Brasileira 6: 205-216. 1981.

LIMA, J.A.A. & PURCIFULL, D.E. Técnicas sorológicas de simples difusão em agar e de microscopia eletrônica para identificação de vírus de caupi. Fitopatologia Brasileira 4: 299-308. 1979.

LIMA, J.A.A.; PURCIFULL, D.E. & HIEBERT, E. Purification, partial characterization and serology of blackeye cowpea mosaic virus. Phytopathology 69: 1252-1258. 1979b.

LIMA, J.A.A.; PURCIFULL, D.E. & EDWARDSON, J.R. Serological biological and cytological distinctions between three legume potyviruses. International Virology 4: 586. 1978.

LIMA, J.A.A. & SANTOS, C.D.G. Infecção natural de *Phaseolus lunatus* por uma estirpe de "cucumber mosaic virus", no Ceará. Fitopatologia Brasileira 10: 304. 1985. (Abstr.).

LIMA, J.A.A.; SANTOS, C.D.G. & SILVEIRA, L.F.S. Redução do grau de incidência do vírus do mosaico severo do caupi ("cowpea severe mosaic virus") no Estado do Ceará. Fitopatologia Brasileira 9: 404. 1984. (Abstr.).

LIMA, J.A.A.; SANTOS, C.D.G. & SILVEIRA, L.F.S. Comportamento de genótipos de caupi em relação aos dois principais vírus que ocorrem no Ceará. Fitopatologia Brasileira 11: 151-161. 1986. (Abstr.).

LIMA, J.A.A.; SOUZA, C.A. & MENDES, C. Desenvolvimento epidemiológico de uma virose em feijão-de-corda no Estado do Ceará. Fitopatologia Brasileira 5: 416. 1980.

LIN, M.T.; KITAJIMA, E.W. & RIOS, G.P. Detecção sorológico de dois vírus previamente desconhecidos em caupi (*Vigna unguiculata*) no Brasil Central. Fitopatologia Brasileira 5: 419. 1980. (Abstr.).

LIN, M.T.; KITAJIMA, E.W. & RIOS, G.P. Serological identification of several cowpea viruses in central Brazil. Fitopatologia Brasileira 6: 73-85. 1981.

LISTER, R.M. Application of the enzyme-linked immunosorbent assay for detecting viruses in soybean seed and plants. Phytopathology 68: 1393-1400. 1978.

LOVISOLI, T. & CONTI, M. Identification of an aphid-transmitted cowpea mosaic virus. Neth J. Pl. Pathol., 72: 265-269. 1966.

MAGALHÃES, B.B. & COSTA, C.L. Transmissibilidade do vírus do mosaico comum do feijoeiro pela semente de variedades recomendadas para o plantio no Brasil. Fitopatologia Brasileira 3: 96. 1978. (Abstr.).

MCLEAN, D.M. Studies on mosaic of cowpea *Vigna sinensis*, Phytopathology 31: 420-430. 1941.

MALI, V.R.; KHALIKAR, P.V. & GAUSHAL, D.H. Seed transmission of potyvirus and cucumo-virus in cowpea in India. Indian Phytopathology 36: 343. 1983.

MARCO, S. & COHEN, S. Rapid detection evaluation of pepper by enzyme-linked immunosorbent assay. Phytopathology 69: 1259-1262. 1979.

MATTHEWS, R.E.F. Plant Virology. New York, Academic Press, 1970. 778p.

OUCHTERLONY, O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II. Prog. Allergy. 6: 30-154. 1962.

OLIVEIRA, F.M.E.S. Propriedades sorológicas, citológicas e de transmissibilidade de um potyvirus e avaliação dos seus efeitos em feijão-de-corda. Fortaleza, Universidade Federal do Ceará. 1985. 57p. Tese mestrado.

OWUSU, G.K.; CROWLEY, N.C. & FRANCKI, R.I.B. Studies of the seed transmission of tobacco ringspot virus. Ann. Appl. Biol. 61: 195-202. 1968.

PEREZ, J.E. & CORTES-MONLLOR, A. A mosaic virus of cowpea from Puerto Rico. Plant Dis. Rep. 54: 212-216. 1970.

PHATAK, H.C. Seed borne plant virus - identification and diagnosis in seed health testing. Seed Sci. Technol. 2: 3-155. 1974.

PIO-RIBEIRO, G.; WYATT, S.D. & KUHN, C.W. Cowpea stunt: A disease caused by synergistic interations of two viruses. Phytopathology 68: 1260-1265. 1978.

PURCIFULL, D.E. & BATCHELOR, D.L. Immunodifusion, tests with sodium dodecyl sulfate (SDS) - Treated Plant Virus and Plant Viral Inclusion. Gainesville, Florida Agric. Exp. Stn., Technical bulletim, 788. 36p. 1977.

PURCIFULL, D.E. & GONSALVES, D. Blackeye cowpea mosaic virus. № 305 in: Descriptions of plant viruses. England, Commonw. Mycol. Inst. Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey. 1985. 3p.

RAHEJA, J.K. & LELEJI, O.I. An aphid-borne virus disease of irrigated cowpea in northern Nigéria. Plant. Dis. Rep. 58: 1080-1084. 1974.

REDDICK, D. & STEWART, V.B. Transmission of virus of bean mosaic in seed and observations on thermal death-point of seed and virus. Phytopathology 9: 445-450. 1919.

ROSS, J.P. Effect of temperature on mottling of soybean seed caused by soybean mosaic virus. Phytopathology 60: 1798-1800. 1970.

SANTOS, A.A. Transmissão de vírus através de sementes de caupi (*Vigna unguiculata*) no Estado do Piauí. Fitopatologia Brasileira 11: 287. 1986. (Abstr.).

SCOTT, H.A. Serological detection of barley stripe mosaic virus in seeds and in dehydrated leaf tissue. Phytopathology 51: 200-201. 1961.

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. Transmission of virus through seed and pollen In: KADO, C., & AGRAWAL, H.O. Principles and techniques in plant virology. New York, van Nostrand Reinhold Company, 1972. Cap. 10. p. 267-292.

SHEPHERD, R.J. & FULTON, R.W. Identify of a seed-borne virus of cowpea. Phytopathology 52: 489-493. 1962.

SHOYINKA, S.A.; BOZARTH, R.F.; REESE, J. & ROSSEL, W. Cowpea mottle virus: A seed-borne virus with distinctive properties infecting cowpeas in Nigéria. Phytopathology 68: 693-699. 1978.

SILVEIRA, L.F.S. & LIMA, J.A.A. Identificação de "cowpea aphid-borne mosaic virus" e "cucumber mosaic virus" em sementes comercializadas no Estado do Ceará. Fitopatologia Brasileira 11: 369. 1986. (Abstr.).

SINCLAIR, J.B. & SHURTLEFF, M.C. Compendium of soybean diseases. Am. Phytopathol. Soc., St. Paul, minnesota. 1975. 69p.

SLACK, S.A. & SHEPHERD, R.J. Serological detection of seed borne barley stripe mosaic virus by a simplified radialdiffusion technique. Phytopathology 65: 948-955. 1975.

SMITH, F.L. & HEWITTI, W.B. Varietal susceptibility of common bean mosaic and transmission through seed. Calif. Agric. Exp. Stn. Bull. 612: 3-18. 1938.

SNYDER, W.C. A seed-borne mosaic of asparagus bean, *Vigna sesquipedalis*. Phytopathology 32: 518-523. 1942.

STACE-SMITH, R. Comoviruses IN: KURSTAK, E. Handbook of plant virus infections comparative diagnosis. Amsterdam, Elsevier, 1981. Cap. 8. p. 171-195.

THOMAS, W.D. Jr. & GRAHAM, R.W. Seed transmission of red node in pinto bean. Phytopathology 41: 959-962. 1951.

TRINDADE, D.R.; COSTA, C.L.; KITAJIMA, E.W. & LIN, M.T. Caracterização de estirpes do vírus do mosaico comum do feijoeiro, no Brasil. Fitopatologia Brasileira 4: 157. 1979.

UYEMOTTO, J.K.; PROVIDENTI, R.G. & PURCIFULL, D.E. Host range and serological properties of a seed borne cowpea virus. Phytopathology 63: 206-208. 1973. (Abstr.).

van KAMMEN, A. & de JAGER, A.P. Cowpea mosaic virus. № 197 (№ 47 revised) IN: Descriptions of plant viruses England, Commonw. Mycol. Inst. Assoc. Appl. Biol. Kew, Surrey, 1978. 6p.

VASCONCELOS, M.F.R. Purificação e sorologia de raças de "cow

pea severe mosaic virus" isoladas de leguminosas que vegetam no Nordeste brasileiro. Fortaleza, Universidade Federal do Ceará, 50p. 1982. Tese de Mestrado.

VOLLER, A.; BARTLETT, A.; BINDELL, D.E.; CLARK, M.F. & ADAMS, A.N. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). J. Gen. Virol. 33: 165. 1976.

WALKEY, D.G.A. Applied Plant Virology. New York. John Wiley & Sons, 1985. 329p.

WILLIAMS, R.J. Diseases of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) in Nigéria. PANS 21: 253-267. 1975.

ZAMBOLIN, E.M., CARVALHO, M.G. & MOREIRA, M.A. Detecção do vírus do masaico comum do feijoeiro (VMCF) em sementes de *Phaseolus vulgaris* pelo teste de immunoadsorção com enzima ligada ao anti-corpo. Fitopatologia Brasileira 10: 309, 1985. (Abstr.).

ZETTLER, F.W. & EVANS, I.R. Blackeye cowpea mosaic in Florida: Host range and incidence in certified cowpea seed. Proc. Fla. State Hortc. Soc. 85: 99-101. 1972.

ZINK, F.W.; GROGAN, R.G. & WELCH, J.E. The effect of the percentage of seed transmission upon subsequent spread of lettuce mosaic virus. Phytopathology 46: 662-664. 1956.