

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UM POTYVIRUS  
ISOLADO DE SIRATRO E PRODUÇÃO DE ANTI-SORO ESPECÍFICO**

C342289

MARY ANNE LOPES MARQUES



**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 - CEARÁ**

1992

IP  
632  
M319p  
1992  
ex. 1

UFC/BU/BCT 23/05/1997



R776548 Purificação e caracterização  
C342289 parcial de  
T632 M319p

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.

Mary Anne Lopes Marques'

DISSERTAÇÃO APROVADA EM \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
( ) Prof. José Albersio de Araújo Lima, Ph.D.  
Orientador da Dissertação

\_\_\_\_\_  
Prof. Francisco Valter Vieira, Dr.

\_\_\_\_\_  
Prof. José Júlio da Ponte, MS., LD.

\_\_\_\_\_  
Prof. Francisco Célio Guedes Almeida, Ph.D.  
Coordenador do Curso

Devo agradecer ao meu maravilhoso pai por ter me desenvolvido esta obra de arte

em 1970 (1970) (1970)

AGUARDAR... 100

À minha mãe,  
aos meus filhos, Mariana e Leonardo e  
à minha tia Ana.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido força e ânimo para desenvolver este trabalho de pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor JOSÉ ALBÉRSIO DE ARAÚJO LIMA, pela amizade e segura orientação.

Aos Professores JOSÉ JÚLIO DA PONTE e FRANCISCO VALTER VIEIRA, pelas honrosas presenças na banca examinadora.

Aos Professores OBED JERÔNIMO VIANA e MAILDE CARLOS DO REGO, pela colaboração na aquisição de material bibliográfico.

Ao Professor JOSÉ HIGINO RIBEIRO DOS SANTOS, pela identificação da espécie de afideo utilizada no estudo de transmissão do vírus.

Ao Professor ERNEST HIEBERT, pelas valiosas sugestões na etapa de purificação do vírus.

À minha mãe, aos meus filhos, aos meus irmãos e à minha tia Ana, por existirem na minha vida, pelo amor, apoio e estímulo que me concedem.

Ao CLÁUDIO, pelo companheirismo, apoio e compreensão.

À minha amiga CÉLIA CÂMARA, pela amizade, apoio, incentivo e ajuda, o meu sincero reconhecimento.

Aos amigos ANA CLÁUDIA e WAGNER, pela preciosa ajuda na digitação deste trabalho.

Ao EMANUEL, MAZÉ e RAIMUNDO e demais funcionários e bolsistas do Laboratório de Virologia Vegetal pela alegre convivência e ajuda nos trabalhos de laboratório e casa-de-vegetação.

Aos colegas do Curso de Mestrado, pelo agradável convívio.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	pág.
<b>ÍNDICE DE TABELA</b> .....	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 - REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
<b>3 - MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	11
3.1 - Fonte de Vírus e Purificação Biológica.....	11
3.2 - Gama Parcial de Plantas Hospedeiras do Vírus.....	12
3.3 - Efeitos Citopáticos em Plantas Infetadas.....	13
3.4 - Estabilidade do Vírus em Seiva.....	13
3.5 - Transmissibilidade do Vírus por Pulgão.....	14
3.6 - Transmissibilidade do Vírus por Sementes.....	15
3.7 - Purificação do Vírus.....	15
3.8 - Eletroforese da Proteína Capsidial do Vírus.....	17
3.9 - Produção de Anti-soro Específico para o Vírus.....	18
3.10 - Relacionamento Sorológico com outros Potyvirus.....	18
<b>4 - RESULTADOS</b> .....	20
4.1 - Purificação e Gama Parcial de Plantas Hospedeiras do Vírus.....	20
4.2 - Efeitos Citopáticos e Estabilidade do Vírus em seiva.....	25

4.3 - Transmissibilidade do Vírus por Pulgão e por Sementes.....	25
4.4 - Purificação do Vírus e Eletroforese da Proteína Capsidial.....	29
4.5 - Produção de Anti-soro Específico e Relacionamento Sorológico com outros Potyvirus.....	33
<b>5 - DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>6 - CONCLUSÕES.....</b>	<b>44</b>
<b>7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>45</b>

## ÍNDICE DE TABELA

TABELA		PÁGINA
1	Reações sintomatológicas e resultados sorológicos de espécies vegetais e cultivares inoculadas com o potyvirus isolado de <i>Macroptilium atropurpureum</i> .....	22

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Folhas de siratro, <i>Macroptilium atropurpureum</i> , exibindo sintomas ocasionados pelo potyvirus em estudo.....	21
2	Folhas de <i>Vigna unguiculata</i> 'TVu 2896' exibindo sintomas de mosaico e bolhosidade, induzidos pelo potyvirus isolado de <i>Macroptilium atropurpureum</i> .....	26
3	Sintomas em <i>Nicotiana benthamiana</i> induzidos pelo potyvirus isolado de <i>Macroptilium atropurpureum</i> .....	27
4	Lesões necróticas locais em folha de <i>Chenopodium amaranticolor</i> inoculada com o potyvirus isolado de <i>Macroptilium atropurpureum</i> .....	28
5	Diagrama do processo usado na purificação do potyvirus isolado de <i>Macroptilium atropurpureum</i> , multiplicado em <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	30
6	Espectro de absorção ultravioleta da preparação purificada do potyvirus isolado de <i>Macroptilium atropurpureum</i> .....	32
7	Análise da proteína capsial do potyvirus isolado de <i>Macroptilium atropurpureum</i> , mediante eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS).....	34

- 8      Teste sorológico de dupla difusão em agar, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), para mostrar a especificidade do anti-soro produzido para o potyvirus isolado de *Macroptilium atropurpureum*..... 35
- 9      Resultados de estudos de relacionamento sorológico entre o potyvirus isolado de *Macroptilium atropurpureum* e outros potyvirus..... 37

## RESUMO

A partir de plantas de siratro, *Macroptilium atropurpureum*, naturalmente infetadas no campo experimental de forrageiras do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, isolou-se um vírus com o qual foram realizados estudos visando a sua identificação e caracterização. Estudos citológicos ao microscópio ótico revelaram a presença de inclusões citoplasmáticas típicas dos potyvirus, induzidas pelo vírus em estudo, o qual foi denominado de vírus do mosaico do siratro ("siratro mosaic virus", SrMV). Testes de dupla difusão em agar revelaram relacionamento sorológico entre o SrMV e o vírus do mosaico do caupi "blackeye", o vírus do mosaico da clitória, o vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro e isolados do vírus do mosaico do caupi transmitido por pulgão. Por outro lado, o SrMV mostrou-se sorologicamente distinto do vírus do mosaico comum do feijoeiro e do vírus da mancha anelar do mamoeiro.

Dentre as 23 espécies vegetais incluídas nos estudos de gama de hospedeiras, o SrMV foi capaz de infetar sete, sendo cinco delas pertencentes à família **Leguminosae**. Entre as espécies vegetais infetadas destacou-se *Nicotiana benthamiana*, como hospedeira adequada para propagação e purificação do vírus. Extrato vegetal contendo o vírus foi clarificado com uma combinação de clorofórmio e tetracloreto de carbono, na etapa inicial do processo de purificação, seguida pela precipitação do vírus com polietilenoglicol combinado com triton X-100. O vírus precipitado e concentrado foi finalmente separado

dos constituintes celulares do hospedeiro por centrifugação em gradiente de cloreto de céσιο, seguido de um ciclo de centrifugações diferenciais, com uma ultracentrifugação final de 85.000g por 90 min. O rendimento final obtido na purificação do SrMV, foi de 19,00 mg de vírus por Kg de tecido infetado.

A análise eletroforética da preparação purificada do vírus, revelou um componente protéico principal de peso molecular igual a 36 k e uma proteína menor com um peso molecular igual a 29 k de ocorrência devida, provavelmente, à degradação enzimática da proteína capsidial, durante o processo de purificação e estocagem do vírus.

O SrMV foi eficientemente transmitido pelo pulgão *Aphis craccivora*, de forma não persistente. A transmissibilidade do vírus por sementes não foi constatada.

O anti-soro obtido para o SrMV apresentou um título de 1:16 em dupla difusão em agar, alta especificidade e bom nível de pureza, o que o torna adequado ao uso em testes sorológicos de dupla difusão em agar.

## ABSTRACT

A virus isolated from naturally infected plants of siratro, *Macroptilium atropurpureum*, grown on the Animal Science Department of the Federal University of Ceará was partially characterized according to its biological, serological and physical properties, and the cytopathological aspects of infected host. The cytopathological studies under the light microscope of infected cells indicated the presence of cytoplasmic inclusions similar to those described for the potyviruses. The virus was designated as siratro mosaic virus (SrMV).

Serological tests showed that the SrMV is serologically related to blackeye cowpea mosaic virus, clitoria mosaic virus, passionfruit woodiness virus and isolates of cowpea aphid-borne mosaic virus, and serologically different from bean common mosaic and papaya ringspot viruses.

The virus was able to infect systematically seven among 23 plant species studied, five of which belong to the family **Leguminosae**. *Nicotiana benthamiana* was selected for propagation and purification of the virus. In the purification procedure, a combination of chloroform and carbon tetrachloride was used in the clarification process, followed by precipitation with polyethylene glycol combined with triton X-100. The virus was further separated from the plant cell constituents by an isopycnic centrifugation in cesium chloride. Yields of ac. 19,00 mg of virus was obtained per Kg of infected tissue.

Polyacrilamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate of purified virus preparation revealed the presence of a main component protein with molecular

weight of 36 kDa and a smaller protein component of 29 k, probably due to an enzymatic degradation of the capsidial protein during the process of purification and storage of the virus.

The SrMV was transmitted efficiently by *Aphis craccivora*, in a non-persistent manner. The virus was not transmitted by 738 seeds from infected siratro plants.

The obtained antiserum showed a titer of 1:16 for the virus, and a degree of specificity and a level of purify adequated to be used in double immune diffusion tests.

## 1 - INTRODUÇÃO

Siratros, *Macroptilium atropurpureum* (DC) Urb. (antes *Phaseolus atropurpureus* D.C.), pertence à subfamília **Papilionoidae** da família **Leguminosae**. É uma espécie forrageira originária do México onde foi desenvolvida por um pesquisador australiano, Dr. E. M. Hutton, através de cruzamentos recíprocos entre duas variedades. Atualmente, o seu cultivo estende-se desde o sul do Texas (USA) à Argentina, dispersando-se, provavelmente, por todos os países tropicais e subtropicais da América Latina (KRETSCHMER, 1972). Trata-se de uma leguminosa perene, estolonífera, de raízes profundas, muito rústica, que se adapta às condições de clima tropical e subtropical, com precipitações de 700 a 1.800 mm anuais. Proporciona forragem de bom valor nutritivo e excelente palatabilidade, com rendimento em torno de 40 toneladas de massa verde por hectare e um teor de 16,5 % de proteína bruta na matéria seca (PUPO, 1980). O rendimento anual por hectare, em forma de feno, em condições de fertilização adequada é de cerca de 8t (PEDREIRA, 1972). Todavia, o siratro, a exemplo das plantas cultivadas está sujeito à incidência de doenças, as quais, em maior ou menor grau, na dependência das condições de patogenicidade e ambiente, podem comprometer o seu rendimento. Dentre os patógenos causadores de doenças em plantas incluem-se os vírus, cuja infecção pode reduzir severamente a produção. A ocorrência de viroses em culturas de subsistência concorre para agravar o problema da fome em várias partes do mundo, especialmente nos países desenvolvidos ou em desenvolvimento (KURSTAK, 1981). As perdas resultantes da ação de vírus diferem, grandemente, entre e dentro de diferentes países e regiões (MATTHEWS, 1991).

De todos os grupos de vírus existentes, os potyvirus constituem o mais numeroso, liderando, também, em quantidade de vírus de importância econômica (EDWARDSON & CHRISTIE, 1991). Os potyvirus infetam, assiduamente, uma larga gama de plantas hospedeiras e existem na natureza na forma de estirpes ou patótipos que se distinguem por propriedades biológicas diversas, tais como, gama de plantas hospedeiras e severidade da doença (MATTHEWS, 1991).

Entre as várias famílias botânicas infetadas por potyvirus, destacam-se as leguminosas. No Brasil, várias leguminosas de importância econômica, como o feijão comum, *Phaseolus vulgaris* L., a soja, *Glycine max* (L.) Merr. e o caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., são infetadas por vírus deste grupo. Como exemplo, para cada uma dessas leguminosas, no Brasil, merecem ser mencionados: o vírus do mosaico comum do feijoeiro ("bean common mosaic virus", BCMV), (COSTA, 1972), o vírus do mosaico da soja ("soybean mosaic virus", SoyMV), (COSTA et al., 1970) e o vírus do mosaico do caupi transmitido por pulgão ("cowpea aphid-borne mosaic virus", CpAMV), (LIMA et al., 1979), todos de marcante importância econômica.

A correta identificação e completa caracterização de um vírus que, em condições de campo, seja encontrado causando doença em determinada planta é essencial para que se possa encontrar medidas de controle adequadas para o mesmo (WALKEY, 1985). Muitos métodos são largamente explorados nos processos de identificação e caracterização dos vírus, tais como, propriedades morfológicas, físicas, biológicas e imunológicas (LIMA, 1979). Esta afirmação vem a propósito de um potyvirus que, recentemente, foi encontrado causando infecção sistêmica em plantas de

siratro, cultivadas no campus da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza, Estado do Ceará, Brasil, (MARQUES & LIMA, 1992.)

Neste trabalho de pesquisa procede-se ao estudo de caracterização deste novo potyvirus, mediante processos de purificação, produção de anti-soro específico e estudo de suas propriedades físicas, químicas, biológicas, sorológicas e de transmissibilidade.

## 2 - REVISÃO DE LITERATURA

A família **Leguminosae** é uma das maiores dentre as que pertencem às dicotiledôneas, abrangendo mais de 750 gêneros, distribuídos em mais de 18.000 espécies espalhadas em todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais. São plantas de hábito e porte muito variados. Muitas delas vivem simbioticamente com bactérias do gênero *Rhizobium*, presentes em nódulos radiculares e capazes de fixar o nitrogênio do ar atmosférico. A tradicional divisão da família **Leguminosae** em três subfamílias, **Mimosoideae**, **Caesalpinoideae** e **Papilionoideae**, é clara e universalmente aceita, não obstante algumas controvérsias quanto ao status taxonômico (ALLEN & ALLEN, 1981).

As leguminosas forrageiras são componentes importantes das pastagens, inclusive fenadas e em silagens, uma vez que são capazes de aumentar a digestibilidade e produção de forragem, promoverem a fixação de nitrogênio e contribuir para a conservação do solo. Esta capacidade das leguminosas forrageiras de fixarem o nitrogênio do ar, mediante simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium*, é um fator importante de fertilização do solo, na medida em que representa uma forma biológica de incorporação de quantidades apreciáveis de nitrogênio ao solo (VICENZI, 1986). O alto custo dos fertilizantes, especialmente os nitrogenados, tem despertado o interesse de agrostologistas pelo desenvolvimento de pastagens baseadas em leguminosas para os trópicos (LENNÉ & SONODA, 1990).

O siratro, *M. atropurpureum*, nodula bem naturalmente, possuindo, portanto, boa capacidade de enriquecer o solo com nitrogênio (PEDREIRA, 1972). Com

efeito, experimentos desenvolvidos na Austrália demonstraram ser o siratro capaz de incorporar ao solo mais de 125 Kg de nitrogênio/ha/ano segundo Bogdan (1977), apud VICENZI (1986).

As pastagens, quando bem manejadas, exercem apreciáveis efeitos sobre o solo, protegendo-o contra a erosão e, até mesmo, podendo recuperar glebas já degradadas. Várias plantas forrageiras estão demonstrando capacidade de romper camadas compactadas do solo, realizando verdadeira subsolagem biológica, conforme os resultados observados por DALLA ROSA et al. (1984), os quais verificaram que o desmódio, *Desmodium* sp (Desv.), o siratro e a alfafa, *Medicago sativa* L., conseguiram superar a resistência de solos bem compactados, chegando o siratro a exibir raízes a 2,20 m de profundidade. A propósito, as raízes das plantas forrageiras exercem grande influência sobre a textura do solo, sobretudo como produtoras de húmus, além de funcionarem como agente granulador das partículas minerais. A ênfase aos aspectos de conservação e recuperação do solo justifica-se pela situação em que se encontra a maioria das principais áreas de cultivo do Brasil (VICENZI, 1986).

O siratro, segundo PEDREIRA (1972), é uma planta de sistema radicular bastante ramificado, que se aprofunda muito no solo. Possui colmos pubescentes, trepadores e prostrados, além de septantes e estoloníferos, quando no chão. As folhas são compostas de três folíolos, cuja face superior, verde escura, apresenta leve pubescência e, na inferior, de tonalidade prateada, há uma pubescência mais acentuada. A inflorescência é em racimo. A corola é vermelho-púrpura, apresentando a quilha róseo-escura e torcida em espiral. As vagens são cilíndricas e deiscentes, com sementes escuras, ovóides e achatadas, maiores que as de soja perene, *Glycine clandestina* Wendl., e menores que as de centrosema, *Centrosema* spp. (Benth.). A produção de

sementes se verifica num período muito longo, criando, de certo modo, problema de colheita.

Pela facilidade e rapidez de desenvolvimento, o siratro combina bem com a maioria das gramíneas, formando uma boa consorciação. Por ser trepador e de rápido desenvolvimento inicial, pode ser consorciado mesmo com as gramíneas mais agressivas. Desenvolve-se bem na maioria dos solos, tolera baixos teores de alumínio e níveis reduzidos de cálcio, respondendo com eficiência à adubação fosfatada, embora os métodos de plantio e os níveis de adubação devam ser estudados individualmente (SANTOS FILHO, 1974). O siratro é bem aceito pelos animais domésticos e resiste, plenamente, ao pastejo, contínuo ou rotativo. A longevidade das plantas na pastagem é de 3 a 4 anos e são repostas, continuamente, por novas plantas, formadas a partir dos estolhos, bem como da germinação das sementes que caem espontaneamente ao solo (PEDREIRA, 1972).

O siratro mostra-se menos exigente que a soja perene e mais exigente que o *Stylosanthes gracilis* Taub. Ensaio comparativos de produtividade entre siratro e soja perene foram realizados no Instituto Agrônomo de Campinas, São Paulo, Brasil, durante seis anos, e os resultados revelaram que a produção de massa verde do siratro foi superior (TIBAU, 1976).

O siratro foi introduzido no Brasil por volta de 1964 (PEDREIRA, 1972). No Ceará, a introdução deu-se em 8 de setembro de 1964, a partir de material oriundo de Nova Odessa, São Paulo, pelo Professor Obed Jerônimo Viana, conforme documenta a ficha, de número 249, que se encontra no Arquivo do Setor de Forragicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará (Obed J. Viana, comunicação pessoal).

Entre as significantes limitações à produtividade das leguminosas forrageiras, está incluída a suscetibilidade à doenças. Segundo LENNÉ & SONODA (1990), a Ferrugem causada por *Uromyces appendiculatus* Fries, reduziu, substancialmente, a produção de forragem, a digestibilidade e a produção de sementes de siratro, na Austrália. A Queima das Folhas causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* Kuhn, doença que afeta culturas tropicais, como o feijão comum, *P. vulgaris*, o caupi, *V. unguiculata*, a soja, *G. max*, e o feijão mungo, *Vigna mungo* (L.) Hepper, também afeta severamente *Macroptilium* spp.

HUTTON (1962) relata a ocorrência de Mildio afetando o siratro, no "Agricultural Research Center", Fort Pierce, na Flórida, USA. Segundo KRETSCHMER (1972), em condições climáticas favoráveis, o desenvolvimento da Ferrugem constitui-se num sério problema, induzindo o desfolhamento das plantas. Sob condições de crescimento denso e alta umidade, uma outra enfermidade fúngica que também provoca queda de folhas, causada por *R. solani*, foi observada por Van Rensburg (1967), apud KRETSCHMER (1972) na África, e por SONODA (1976), na Flórida. Além da Queima das Folhas, induzida por *R. solani*, também são relatadas, infetando siratro e outras espécies congêneres, na Flórida, a Ferrugem, o Oídio (*Oidium* sp.) e, a Cercosporiose (*Cercospora* sp.) (SONODA, 1976). PUPO (1977) assegura que a queda de folhas induzida por espécies de *Rhizoctonia*, em condições de alta temperatura e umidade, não se constitui um sério problema para o siratro, pois as plantas logo rebrotam. Em oposto, SONODA (1980) afirma que a alta incidência de queima foliar induzida por *R. solani*, na maioria dos plantios de siratro na Flórida, onde realizou experimentos, pode provocar uma redução na produção total de forragem de até 67%. A

Queima das Folhas, tem sido, também, relatada na Austrália e em vários países da América do Sul (SONODA, 1980).

Experimentos desenvolvidos por MINTON (1967), com cinco diferentes espécies de nematóides fitoparasitas, mostraram que o siratro não foi severamente afetado por nenhum deles.

Sintomas de virose em siratro foram observados na Índia, em 1967, e relatados por MOSES & NARIANI (1975). Em 1975, um vírus similar - à época, não identificado - foi detectado produzindo sintomas de mosqueado e distorção foliar em plantas de siratro cultivadas no "Agricultural Research Center", na Flórida (SONODA, 1976). Segundo Hutton, em comunicação pessoal feita a SONODA (1977a), este vírus não foi observado na Austrália, onde são encontrados, infetando naturalmente o siratro, o vírus do mosaico amarelo do feijoeiro ("bean yellow mosaic virus", BYMV) e o vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro ("passionfruit woodiness virus", PWV). Trabalhos desenvolvidos com o objetivo de determinar os efeitos produzidos pelo vírus detectado na Flórida sobre a produção e qualidade da forragem, constataram que o mesmo não afetou o conteúdo de proteína e a digestibilidade da matéria orgânica, mas reduziu, drasticamente, a produção de matéria seca de sementes, evidenciando, assim, a necessidade do desenvolvimento de estudos com vista ao seu controle (SONODA, 1977a, 1977b). Este vírus foi identificado, posteriormente, como sendo uma estirpe do vírus do mosaico comum do feijoeiro ("bean common mosaic virus", BCMV), (LIMA et al., 1977).

Os potyvirus representam o grupo de vírus mais numeroso, abrangendo um total de 47 membros e de 65 possíveis membros (EDWARDSON & CHRISTIE, 1991). De acordo com HOLLINGS & BRUNT (1981), os potyvirus apresentam partículas

alongadas e filamentosas, medindo 11 x 680-900 nm, constituídas de 5% de ácido nucleico do tipo RNA, de hélice simples, de peso molecular aproximadamente igual a 3.500 k e com 95% de proteína, cuja subunidade tem peso molecular igual a 32-34 k. O coeficiente de sedimentação da partícula varia de 150 a 160 S. A maioria dos potyvirus é transmitida mecanicamente e disseminada na natureza por afídeos, de forma não persistente. Muitos são, também, transmitidos por sementes e/ou outros propágulos vegetais (EDWARDSON & CHRISTIE, 1991). Todos os potyvirus induzem, nas células de suas plantas hospedeiras, a formação de inclusões citoplasmáticas, constituídas de proteína de peso molecular aproximadamente igual a 70 k, a qual não é sorologicamente relacionada com a proteína capsidial (PURCIFULL et al., 1973; LIMA et al., 1979; EDWARDSON & CHRISTIE, 1986). As inclusões citoplasmáticas representam importante característica dos potyvirus (HOLLINGS & BRUNT, 1981). Tais inclusões são denominadas de "inclusões em catavento", visto que, ao serem examinadas ao microscópio eletrônico, apresentam-se em forma de catavento compostos de espirais e agregados-laminados retos e curvos, presos a um cilindro central. Com base nas variações morfológicas apresentadas pelos "cataventos", os potyvirus foram agrupados, por EDWARDSON & CHRISTIE (1986) em 4 subdivisões.

Os potyvirus apresentam, com algumas exceções, as seguintes características de estabilidade em seiva: ponto de inativação térmica entre 55 a 56°C, longevidade "in vitro" de 2 a 4 dias e ponto máximo de diluição da ordem de  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  (HOLLINGS & BRUNT, 1981).

Os potyvirus têm sido relatados como capazes de infetar 2026 espécies vegetais, distribuídas em 556 gêneros de 81 distintas famílias botânicas (EDWARDSON & CHRISTIE, 1991). Entre os vírus considerados como responsáveis por importantes

efeitos sobre as leguminosas forrageiras, EDWARDSON & CHRISTIE (1986) relacionam 12 potyvirus, entre os quais o BCMV e o vírus do mosaico do caupi transmitido por pulgão ("cowpea aphid-borne mosaic virus", CpAMV), com capacidade de infetar o siratro.

PROVVIDENTI & BRAVERMAN (1976) citam o siratro como fonte de resistência ao BCMV. Eles observaram que nenhuma das plantas inoculadas foi sistemicamente infetada pelo mencionado vírus. Porém, dois dos três isolados utilizados, foram recuperados a partir de folhas inoculadas que não apresentavam sintomas. Uma estirpe de BCMV, designada como BCMV-R, isolada a partir de *Rynchosia minima* (L.) DC., foi constatada em siratro por MEINERS et al. (1978), causando infecção latente. Um potyvirus estreitamente relacionado com o BCMV, encontrado nos Estados do Ceará e do Rio Grande do Norte, infetando naturalmente a cunhã, *Clitoria ternatea* L., importante leguminosa forrageira, foi citado por FLORINDO (1983), como capaz de causar infecção sistêmica em siratro.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - Fonte de Vírus e Purificação Biológica

O potyvirus motivo deste estudo foi isolado de plantas de siratro exibindo mosaico, estabelecidas no Campo Experimental de Forrageiras do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza. Extrato obtido a partir da maceração de folhas dessas plantas, foi inoculado mecanicamente, em plantas sadias de siratro, mantidas em casa-de-vegetação. As plantas que expressaram sintomas semelhantes àqueles observados em condições de campo foram, então, utilizadas como fonte inicial do vírus em estudo. Visando sua purificação biológica, o vírus foi mecanicamente inoculado em folhas de *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn, que respondeu às infecções com reações de hipersensibilidade, exibindo sintomas de lesões necróticas localizadas, a partir das quais efetuou-se o seu reisolamento em siratro, mediante o método de lesão única, conforme metodologia descrita por WALKEY (1985).

Nas inoculações mecânicas, os inóculos foram preparados mediante a maceração de tecido foliar infetado pelo vírus, na presença de solução tampão de fosfato de potássio 0,05M, pH 7,5, na proporção de 1 g de tecido para 2 ml de solução. O extrato obtido foi submetido à filtração em gaze dupla e à parte líquida, coletada em becher, foi adicionada pequena quantidade do abrasivo "carborundum". Em seguida, procederam-se as inoculações, friccionando-se pedaços de gaze embebidos na solução de inóculos nas superfícies adaxiais das folhas.

### 3.2 - Gama Parcial de Plantas Hospedeiras do Vírus

Plantas-teste pertencentes a 23 espécies vegetais de oito famílias botânicas foram inoculadas mecanicamente, com o vírus em estudo, no sentido de determinar-se a sua gama parcial de plantas hospedeiras. As plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação, usando-se três vasos, contendo cada um destes, três a quatro plantas de cada espécie, sendo um vaso - com igual número de plantas - mantido sem inoculação, para servir como testemunha. Foram inoculadas com o vírus as seguintes espécies vegetais: *Canavalia ensiformes* (L.) DC; *Cassia occidentalis* L.; *C. tora* L.; *Centrosema brasiliamum* (L.) Benth; *C. pascuorum* Mart; *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn; *C. quinoa* Willd; *Clitoria ternatea* L.; *Crotalaria incana* L.; *Cucumis melo* L.; *Galactia striata* (Jacq.) Urb; *Glycine max* (L.) Merr.; *Gomphrena globosa* L.; *Hibiscus esculentus* L.; *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb; *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth; *Nicotiana benthamiana* Domin.; *Phaseolus lunatus* L. cvs. '15', '20', '27' e '30'; *Phaseolus vulgaris* L. cvs. 'Carioca', 'Engopa 202', 'ESAL 508', 'Gorgotuba', 'IPA-3', 'IPA-6', 'Lajes', 'Mineiro Precoce', 'Mulatão Ramador' e 'Rico 23-SP'; *Phyllanthus acidus* Skeels; *Sesamum orientale* L.; *Vigna mungo* (L.) Hepper e *V. unguiculata* (L.) Walp cvs. 'Campeão', 'CE-69', 'CE-86', 'CE-208', 'CE-315', 'CE-372', 'CE-490', 'CE-491', 'CNC-0434', 'Cowpea 535', 'João Paulo II', 'Otilia', 'Macaibo', 'Pitiuba', 'Potomac', 'Setentão', 'TVu 390', 'TVu 456' e 'TVu 2896'. Plantas inoculadas e testemunhas foram mantidas em casa-de-vegetação, durante 40 dias, visando-se determinar a infecção viral mediante o aparecimento de sintomas e a efetuação de testes sorológicos.

### 3.3 - Efeitos Citopáticos em Plantas Infetadas

Plantas infetadas, exibindo os sintomas característicos do vírus, foram submetidas a exames citopatológicos através de estudos ao microscópio ótico, visando-se detectar a presença de inclusões, como forma complementar de diagnose e caracterização do vírus em estudo. De acordo com a técnica descrita por CHRISTIE & EDWARDSON (1977), camadas de células da epiderme foliar foram retiradas e coradas com uma combinação de calcomina laranja e luxol verde brilhante, por um período de 5 a 10 min, após o que o excesso de corante foi removido do material foliar pela imersão em álcool absoluto a 95%. Em seguida, procederam-se à montagem em lâmina microscópica com "euparal" e ao exame ao microscópio ótico.

### 3.4 - Estabilidade do Vírus em Seiva

Como forma de obter-se uma indicação da estabilidade do vírus e sua concentração, três testes foram executados com seiva bruta extraída de plantas de siratro infetadas com o vírus e, como planta-teste, uma hospedeira de lesão necrótica local, no caso *C. amaranticolor*, de acordo com os processos descritos por NOORDAN (1973). O ponto de inativação térmica (PIT), utilizado para definir a temperatura sob a qual o vírus é inativado, foi determinado pela submissão do vírus a diferentes temperaturas, em "banho-maria", ao longo de 10 min. Amostras obtidas pela maceração de folhas de plantas de siratro infetadas pelo vírus, diluídas no dobro do seu peso em água destilada, foram submetidas às temperaturas de 45, 50, 55, 60, 65, 70 e 75°C, durante 10 min, após o que foram resfriadas em gelo e inoculadas, mecanicamente, nas folhas das plantas-teste. A longevidade do vírus "in vitro" (LIV) foi determinada estocando-se extrato

foliar de plantas de siratro infetadas pelo vírus, em condições de laboratório (24-28°C), por períodos de 0, 24, 48 e 72 h e, em seguida, inoculando-os em diferentes folhas de *C. amaranticolor*. O ponto máximo de diluição (PMD) foi determinado diluindo-se, em água destilada, a seiva bruta extraída de plantas de siratro com sintomas de vírus, para  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  e, em seguida, inoculando-se cada diluição em duas folhas de *C. amaranticolor*.

As três propriedades (PIT, LIV e PMD) do vírus foram, finalmente, avaliadas em função do aparecimento de lesões necróticas nas folhas de *C. amaranticolor* inoculadas.

### 3.5 - Transmissibilidade do Vírus por Pulgão

Testes de transmissão do vírus de plantas de siratro infetadas para plantas sadias foram realizados por meio do afídeo *Aphis craccivora* Koch (identificado pelo Prof. Dr. José Higino Ribeiro dos Santos, Universidade Federal do Ceará). Usaram-se quatro plantas-teste e, para cada planta, utilizaram-se três pulgões, os quais após um período de jejum de aproximadamente uma hora, foram colocados para se alimentar, nas plantas infetadas, durante 30 a 60 seg e, em seguida, transferidos para as plantas sadias e aí mantidos por 24 h. As plantas inoculadas pelos pulgões foram mantidas em condições de casa-de-vegetação (26-31°C) por um período mínimo de 20 dias, na expectativa do aparecimento de sintomas típicos induzidos pelo vírus e, neste caso, procedeu-se à confirmação feita mediante sorologia, com anti-soro específico para o vírus.

### 3.6 - Transmissibilidade do Vírus por Sementes

Um total de 738 sementes produzidas por plantas de siratro, experimentalmente inoculadas com o vírus, foram semeadas em bandejas de madeira, distribuídas em lotes de aproximadamente 200 sementes por bandeja. As plantas resultantes eram diariamente observadas e aquelas que apresentaram suspeita de sintomas de natureza viral, bem como 10% das não suspeitas, foram testadas sorologicamente.

### 3.7 - Purificação do Vírus

O vírus foi multiplicado em plantas de *N. benthamiana* e suas folhas, então sistemicamente infetadas, foram coletadas 25 dias após a inoculação mecânica e utilizadas no processo de purificação. Todas as etapas deste processo foram realizadas sob temperaturas de 4 a 6°C. As centrifugações de baixa rotação foram efetuadas na centrífuga SORVALL, modelo RC-5B, e as centrifugações acima de 50.000g, o foram em ultracentrífuga BECKMAN, modelo L7-55, no Laboratório de Virologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza. No processo de extração viral utilizou-se o tampão de fosfato de potássio 0,5M, pH 7,5, contendo 1,0% de sulfito de sódio. O tampão de ressuspensão usado foi o de fosfato de potássio 0,02M, pH 8,2, acrescido de 0,1% de 2-mercaptoetanol.

As folhas foram maceradas em liquidificador comum, juntamente com o tampão de extração, na proporção de 1:2 (p/v). Em seguida, o extrato obtido foi filtrado em gaze dupla. À parte líquida adicionaram-se 50% de clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) e 50% de tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ). Esta mistura foi homogeneizada em liquidificador de aço,

por 2 min e, em seguida, submetida a uma baixa centrifugação de 3.000g, durante 10 min. Ao sobrenadante clarificado, então obtido, foram adicionados 8% de polietileno glicol (PEG, PM = 6.000), e a mistura contendo o vírus foi agitada durante uma hora, sendo, em seguida, centrifugada a 8.000g, por 10 min. O precipitado foi ressuscitado em 50 ml de tampão, acrescido de 1% de triton X-100, e deixado em agitação durante 30 min. Em seguida, efetuou-se uma centrifugação de 12.000g, por 10 min, e ao sobrenadante coletado, uma ultracentrifugação de 85.000g, durante 90 min. O precipitado foi ressuscitado em 5ml de tampão e submetido à centrifugação em gradiente de CsCl ( $d = 1,28$ ), preparado no tampão de ressuspensão, a 120.000g, durante 17 h. A banda viral, localizada a, aproximadamente, 2,5 cm do fundo do tubo, foi coletada, diluída em tampão de ressuspensão e submetida a um ciclo de centrifugações diferenciais, com uma ultracentrifugação final de 85.000g, durante 90 min, para efeito de precipitação e concentração das partículas virais, as quais foram ressuscitadas em tampão de fosfato de potássio 0,02M, pH 8,2. Todas as preparações virais obtidas foram analisadas ao espectrofotômetro de luz ultra-violeta VARIAN, modelo DMS-70, usando-se uma faixa de comprimento de onda variando de 220 a 340 nm, visando-se avaliar seus graus de pureza e estimar as concentrações virais. Para o cálculo da concentração de vírus, utilizou-se o coeficiente de extinção ( $E = 2,8$ ), obtido por STACE-SMITH & TREMAINE (1970) para o vírus Y da batatinha ("potato virus Y", PVY), justo o vírus padrão do grupo potyvirus. Todas as preparações virais foram testadas sorologicamente e, também, quanto à infectividade, mediante a inoculação em plantas sadias de siratro.

### 3.8 - Eletroforese da Proteína Capsidial do Vírus

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) foi efetuada de acordo com o método desenvolvido por LAEMMLI (1980). A polimerização ocorreu à temperatura ambiente. Ao vírus purificado, mantido em solução de fosfato de potássio 0,02M, pH 8,2, na concentração de, aproximadamente, 1mg de vírus por ml de solução, foram adicionados 2% de SDS. Aliquotas de 5 $\mu$ l, 10 $\mu$ l e 15 $\mu$ l da solução viral foram depositadas nas cavidades da placa de gel e a eletroforese foi desenvolvida à temperatura ambiente, com corrente constante e igual a 10 mA, por placa de gel, durante, aproximadamente, 4h. As proteínas albumina bovina (PM = 66k), albumina de ovo (PM = 45k), gliceraldeído-3-fosfato (PM = 36k), anidrase carbônica (PM = 29k), tripsinogênio (PM = 24k) e inibidor de tripsina (PM = 20k) foram utilizadas como padrões para estimar o valor do peso molecular da proteína capsidial do vírus. Após a eletroforese as bandas de proteínas foram localizadas através da coloração da placa de gel, em solução corante, constituída de "Coomosie" Azul Brilhante G a 0,25%, em metanol a 50% e ácido acético glacial. A remoção do excesso de corante foi feita pela imersão da placa em solução de ácido acético a 10%.

O peso molecular do capsídeo do vírus foi estimado, mediante representação num gráfico, no eixo dos "Y", dos pesos moleculares das proteínas padrões e, no eixo dos "X", das distâncias percorridas após o término da eletroforese. No mesmo gráfico, marcou-se, também, a distância percorrida pela proteína do vírus e conforme a sua posição na reta padrão, estimou-se o peso molecular, segundo sua correspondência no eixo "Y".

### 3.9 - Produção de Anti-soro Específico para o Vírus

Na produção de anti-soro policlonal específico para o vírus em estudo, foi utilizado um coelho da raça Nova Zelândia Branca, de 6 meses de idade. Inicialmente, foi coletada uma amostra de sangue do animal para obtenção de soro normal. A preparação purificada do vírus, com uma concentração de 1mg de nucleoproteína por ml da solução, foi emulsificada com igual volume do Adjuvante Incompleto de Freund e inoculada nas patas traseiras e na coxa do animal, na quantidade de, aproximadamente, 2,0ml da solução contendo o vírus, distribuídos em 4 aplicações. A primeira coleta de sangue foi feita 25 dias após a primeira imunização do animal e, posteriormente, com frequência semanal, mediante cortes efetuados na veia marginal da orelha do coelho imunizado. As amostras de sangue então coletadas foram colocadas para coagular em "banho-maria", a 37-39 C, durante 60min. Após a remoção do coágulo formado, o soro foi submetido a uma centrifugação de 3.000g, por 10min, na centrífuga JANETZKI, modelo T32c e o soro coletado, foi novamente centrifugado a 10.000g, por 10min, na centrífuga SORVALL, modelo RC-5B, para a sua clarificação. O anti-soro, assim obtido, foi acondicionado em recipiente de vidro, etiquetado e armazenado em "freezer". O título do anti-soro foi determinado em teste de dupla difusão em agar, diluindo-se o anti-soro em soro normal nas seguintes proporções: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64.

### 3.10 - Relacionamento Sorológico com outros Potyvirus

Com o anti-soro obtido para o vírus em estudo, foram realizados testes de dupla difusão em agar, objetivando-se determinar seu relacionamento sorológico com os seguintes potyvirus: vírus do mosaico comum do feijoeiro ("bean common mosaic

virus", BCMV), isolado de *Vigna mungo*; vírus do mosaico do caupi "blackeye" ("blackeye cowpea mosaic virus", BICMV); vírus do mosaico da clitoria ("clitoria mosaic virus", CIMV); vírus do mosaico do caupi transmitido por pulgão ("cowpea aphid-borne mosaic virus", CpAMV), isolados obtidos de caupi nas seguintes localidades: Aracoiaba (CpAMV-AR), Mauriti (CpAMV-MA), Morada Nova (CpAMV-MN), Pentecoste (CpAMV-PT), Piauí (CpAMV-PI), Quixadá (CpAMV-QX) e Rio Grande do Norte (CpAMV-RN); vírus da mancha anelar do mamoeiro, estirpe papaya ("papaya ringspot virus-P", PRSV-P); vírus da mancha anelar do mamoeiro, estirpe melancia ("papaya ringspot virus-W", PRSV-W); vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro ("passionfruit woodness virus", PWV) e os potyvirus não caracterizados isolados de : *Canavalia ensiformis* (POTY-CE), *Cassia occidentalis* (POTY-CO), *Clitoria ternatea* (VMCI), *Glycine max* (POTY-Soja), e *Sesamum orientale* (POTY-SO).

Nos testes de dupla difusão em agar foram utilizados anti-soros concentrados e diluídos com soro normal, na proporção de 1:2, colocados no orifício central. Os orifícios da periferia foram preenchidos com o antígeno homólogo e com os antígenos heterólogos (potyvirus com os quais se pretendia pesquisar a existência de relacionamento sorológico), mediante a observação de esporões.

## 4 - RESULTADOS

### 4.1 - Purificação Biológica e Gama Parcial de Plantas Hospedeiras do Vírus

O vírus isolado de plantas de siratro, estabelecidas no Campo Experimental de Forrageiras do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza, quando inoculado, mecanicamente, em plantas de *C. amaranticolor*, em regime de casa-de-vegetação, produziu lesões necróticas locais. A partir de uma única lesão, o vírus foi reisolado em siratro e ocasionou o aparecimento de sintomas de infecção sistêmica (FIGURA 1).

No estudo da gama parcial de hospedeiras, o vírus foi capaz de infetar sete das 23 espécies vegetais, artificialmente inoculadas, sendo cinco delas pertencentes a família **Leguminosae**. O vírus produziu infecção sistêmica nas seguintes espécies vegetais: *C. occidentalis*; *G. max*; *M. lathyroides*; *M. caesalpiniaefolia*; *N. benthamiana* e *V. unguiculata* (TABELA 1). Dos 18 cultivares de *V. unguiculata* testados, nove ('CE-372', 'CE-490', 'CE-491', 'CNC-0434', 'Macaibo', 'Potomac', 'TVu 390', 'TVu 456' e 'TVu 2896') foram infetados pelo vírus e somente quatro destes exibiram sintomas mais severos, tais como bolhosidade, deformação foliar e comprometimento no desenvolvimento da planta (TABELA 1). A espécie vegetal *N. benthamiana*, além dos sintomas de mosaico e deformação foliar, apresentou anéis cloróticos concêntricos, nas folhas inoculadas (FIGURA 2).



FIGURA 1: Folhas de siratro, *Macroptilium atropurpureum*, exibindo sintomas ocasionados pelo potyvirus em estudo.

TABELA 1- Reações sintomatológicas e resultados sorológicos de espécies vegetais e cultivares inoculadas com o potyvirus isolado de *Macroptilium atropurpureum*.

ESPÉCIES VEGETAIS -CULTIVARES	REAÇÕES SINTOMATOLÓGICAS*		RESULTADOS SOROLÓGICOS**
	LOCAIS	SISTÊMICAS	
<i>Canavalia ensiformis</i>	-	-	Nt
<i>Cassia occidentalis</i>	-	ML	(+)
<i>C. tora</i>	-	-	(-)
<i>Centrosema brasilianum</i>	-	-	(-)
<i>C. pascuorum</i>	-	-	(-)
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LNe	-	Nt
<i>C. quinoa</i>	-	-	Nt
<i>Clitoria ternatea</i>	-	-	(-)
<i>Crotalaria incana</i>	-	M	(+)
<i>Cucumis melo</i>	-	-	(-)
<i>Galactia striata</i>	-	-	(-)
<i>Glycine max</i>	-	ML	(+)
<i>Gomphrena globosa</i>	-	-	Nt
<i>Hibiscus esculentus</i>	-	-	(-)
<i>Macroptilium lathyroides</i>	-	ML	(+)
<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i>	-	-	(-)
<i>Nicotiana benthamiana</i>	-	M, DF	(+)
<i>Phaseolus lunatus</i>			
'15'	-	-	(-)
'20'	-	-	(-)

TABELA 1 - CONTINUAÇÃO

ESPÉCIES VEGETAIS -CULTIVARES	REAÇÕES SINTOMATOLÓGICAS*		RESULTADOS SOROLÓGICOS**
	LOCAIS	SISTÊMICAS	
'27'	-	-	(-)
'30'	-	-	(-)
<i>P. vulgaris</i>			
'Carioca'	-	-	(-)
'Engopa 202'	-	-	(-)
'ESAL 508'	-	-	(-)
'Gorgotuba'	-	-	(-)
'IPA-3'	-	-	(-)
'IPA-6'	-	-	(-)
'Lajes'	-	-	(-)
'Mineiro Precoce'	-	-	(-)
'Mulatão Ramador'	-	-	(-)
'Rico 23-SP'	-	-	(-)
<i>Phyllanthus acidus</i>	-	-	Nt
<i>Sesamum orientale</i>	-	-	(-)
<i>Vigna mungo</i>	-	-	(-)
<i>V. unguiculata</i>			
'Campeão'	-	-	(-)
'CE-69'	-	-	(-)
'CE-86'	-	-	(-)
'CE-208'	-	-	(-)
'CE-315'	-	-	(-)

TABELA 1 - CONTINUAÇÃO

ESPÉCIES VEGETAIS -CULTIVARES	REAÇÕES SINTOMATOLÓGICAS*		RESULTADOS SOROLÓGICOS**
	LOCAIS	SISTÊMICAS	
'CE-372'	-	ML	(+)
'CE-490'	-	M	(+)
'CE-491'	-	RD, M	(+)
'CNC-0434'	-	ML	(+)
'Cowpea 535'	-	-	(-)
'Otilia'	-	-	(-)
'Macaibo'	-	ML	(+)
'Pitiúba'	-	-	(-)
'Potomac'	-	ML	(+)
'Setentão'	-	-	(-)
'TVu 390'	-	ML	(+)
'TVu 456'	-	M	(+)
'TVu 2896'	-	M, B	(+)

\* B = Bolhosidade; DF = Deformação Foliar; LNe = Lesões Necróticas; M = Mosaico; ML = Mosaico Leve; RD = Redução no Desenvolvimento e - = Sem Sintomas.

\*\* (+) = Reação sorológica em teste de dupla difusão em agar; (-) = Ausência de reação; Nt = Não testada.

#### 4.2 - Efeitos Citopáticos e Estabilidade do Vírus em Seiva

Através de observações efetuadas ao microscópio ótico, inclusões citoplasmáticas de natureza proteica, semelhantes às descritas para os potyvirus, foram visualizadas em células da epiderme de plantas de *V. unguiculata* 'TVu 2896' (FIGURA 3) e *N. benthamiana* (FIGURA 2).

Os resultados dos estudos sobre a estabilidade do vírus em seiva revelaram que o mesmo possui um PIT situado entre 50 a 55° C, uma vez que nas folhas de *C. amaranticolor* inoculadas com o extrato foliar submetido a temperaturas acima de 50°C não houve formação de nenhuma lesão necrótica. Após um período de 12 h, em condições de laboratório, o vírus contido em seiva bruta de plantas infetadas tornou-se não infetivo, uma vez que nenhuma lesão necrótica foi formada em folhas de *C. amaranticolor* então inoculadas com o respectivo extrato, indicando uma LIV situada entre 8 e 12 h. O PMD do vírus contido no extrato foliar bruto de planta infetada ficou entre  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ . Com efeito, numerosas lesões formaram-se nas folhas inoculadas com o extrato foliar nas diluições de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , menor número de lesões foi observado nas diluições  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  (FIGURA 4), mas nenhum tipo de sintoma foi observado nas folhas inoculadas com o extrato diluído ao nível de  $10^{-6}$ .

#### 4.3 - Transmissibilidade do Vírus por Pulgão e por Sementes.

Plantas-teste de siratro, inoculadas através de pulgões exibiram sintomas característicos do vírus em estudo, evidenciando a sua transmissibilidade por *Aphis craccivora*, de forma não persistente. A infecção foi confirmada mediante a realização de teste de dupla difusão em agar.



FIGURA 2: Sintomas em *Nicotiana benthamiana* induzidos pelo potyvirus isolado de *Macroptilium atropurpureum*.



FIGURA 3: Folhas de *Vigna unguiculata* 'TVu 2896' exibindo sintomas de mosaico e bolhosidade, induzidos pelo potyvirus isolado de *Macroptilium atropurpureum*.



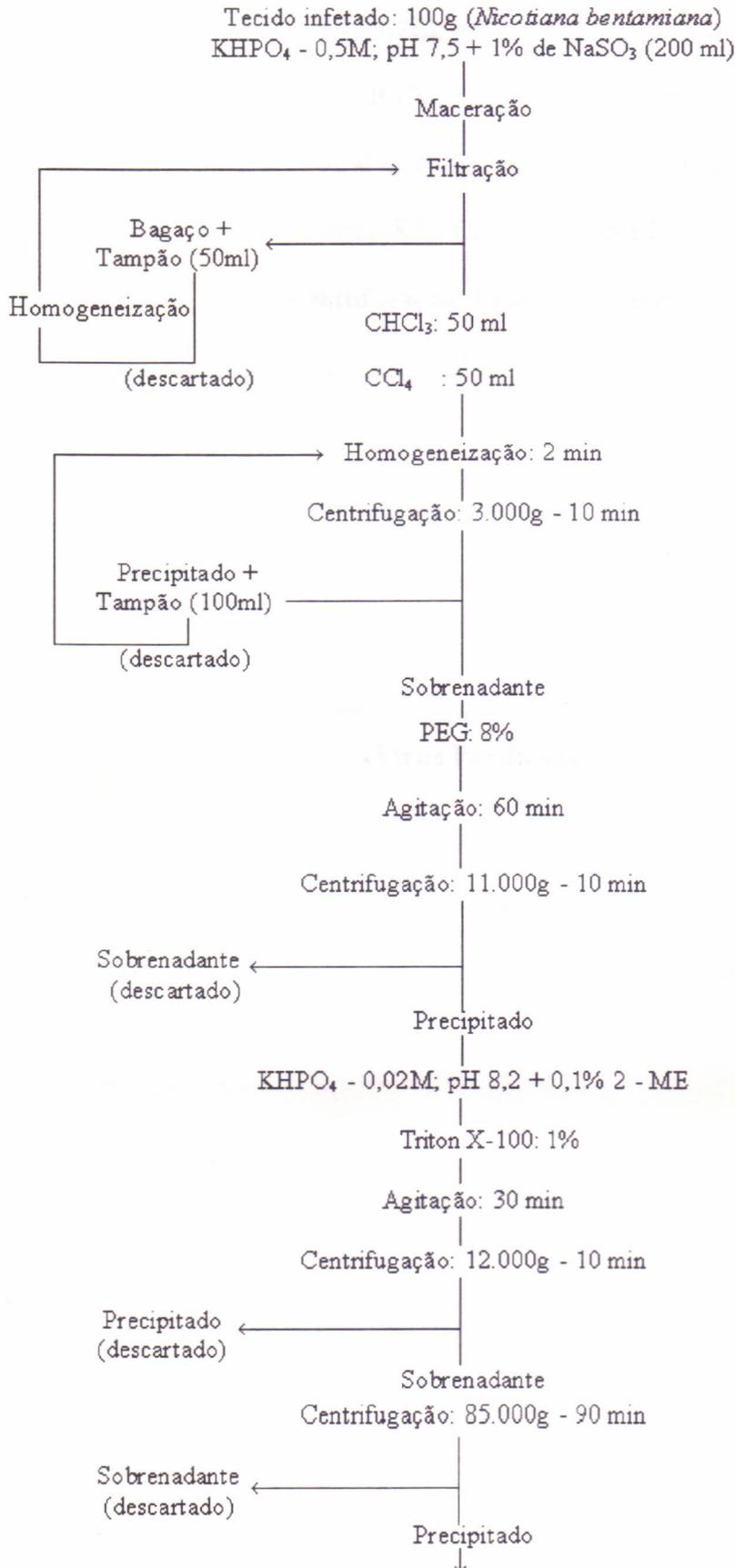
FIGURA 4: Lesões necróticas locais em folhas de *Chenopodium amaranticolor* inoculadas com o potyvirus isolado de *Macroptilium atropurpureum*, quando o extrato foliar extraído de plantas infetadas foi diluído com água destilada para  $10^{-4}$ .

Não se constatou a transmissibilidade do vírus por sementes colhidas de plantas de siratro infetadas, em nenhuma das 738 sementes testadas. Com efeito, as plantas geradas dessas sementes não apresentaram sintomas de infecção viral e os testes sorológicos envolvendo as poucas plantas tidas como suspeitas foram negativos.

#### 4.4 - Purificação do Vírus e Eletroforese da Proteína Capsidial

Após um total de oito tentativas de purificação, constatou-se ser a espécie vegetal *N. benthamiana* uma hospedeira adequada para a propagação do vírus, visando sua purificação. O melhor método de clarificação consistiu no tratamento químico do extrato foliar com uma combinação de clorofórmio e tetracloreto de carbono, seguido de uma baixa centrifugação de 3.000g, por 10 min. O roteiro utilizado, diagramado na FIGURA 5, mostrou-se eficiente e permitiu a obtenção de uma preparação purificada com bom nível de pureza. Avaliadas por meio de espectrofotometria, as preparações virais purificadas, após centrifugação isopícnica, apresentaram espectros de absorção típicos de potyvirus (FIGURA 6), com absorção mínima em 245 nm e máxima em 260 nm. Os valores obtidos para as relações de absorção nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) e de absorção máxima e mínima ( $A_{\text{máx}}/A_{\text{mín}}$ ), foram 1,29 e 1,18, respectivamente, após a correção para a dispersão de luz. A concentração final máxima obtida foi de 19,11 mg de vírus por Kg de tecido infetado. Todas as preparações virais obtidas mostraram-se infetivas quando inoculadas em plantas de siratro.

A análise eletroforética em gel de poliacrilamida contendo SDS, da preparação purificada do vírus mostrou um componente protéico de peso molecular estimado em 36 k e outro menor, com peso molecular estimado em 29 k (FIGURA 7),



Continua

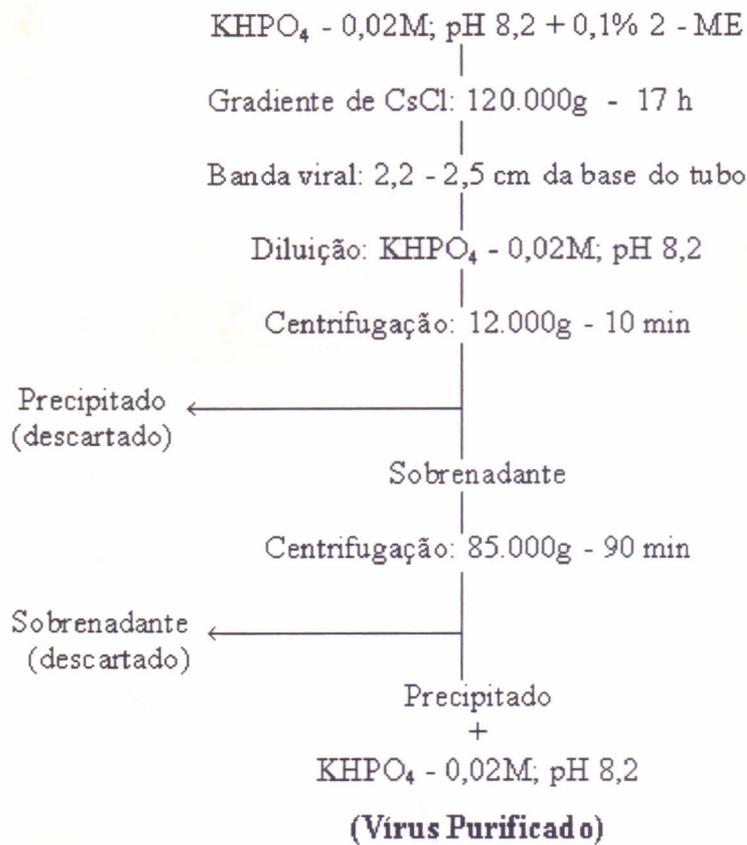


FIGURA 5 - Diagrama do processo usado na purificação do potyvirus isolado de *Macroptilium atropurpureum* multiplicado em *Nicotiana benthamiana*.

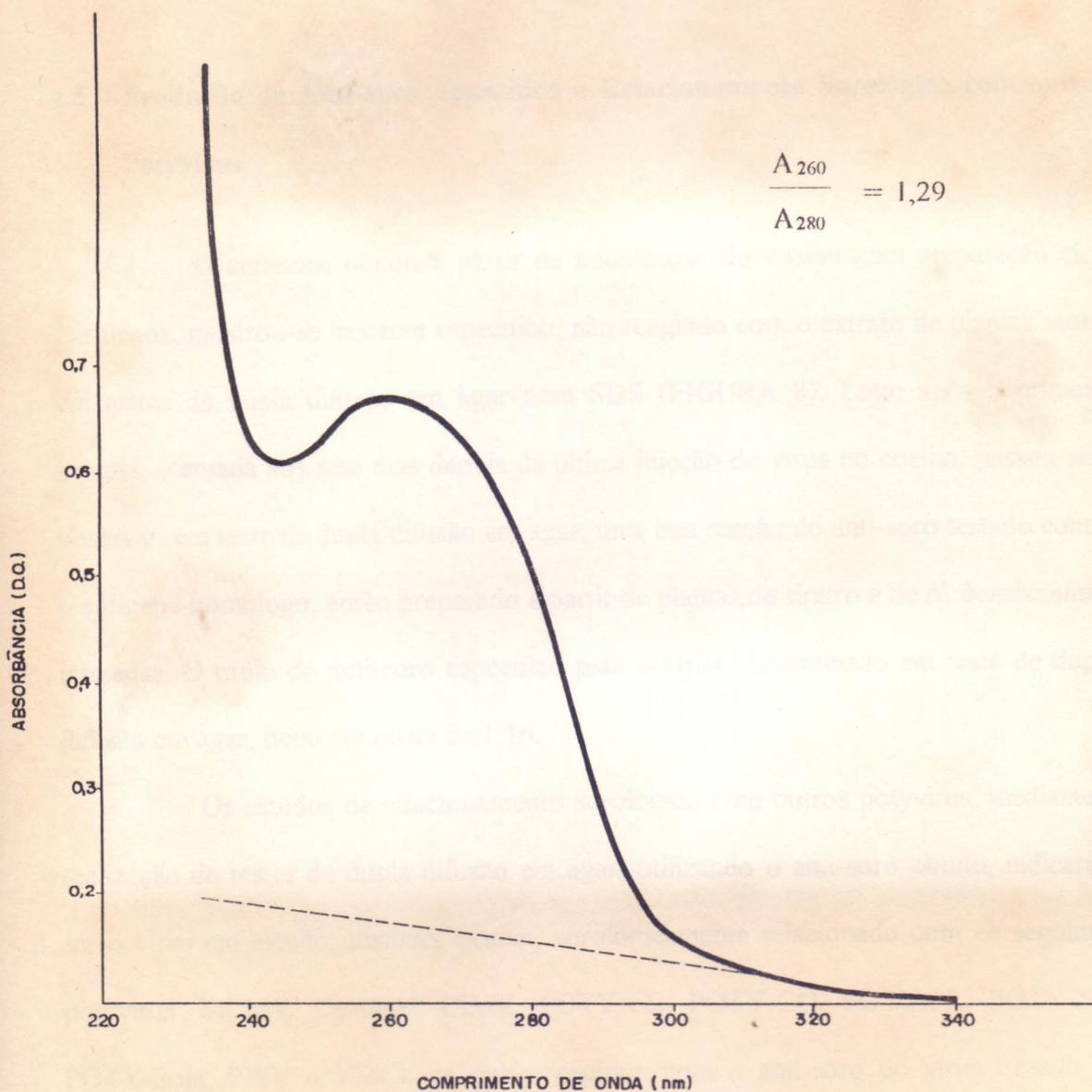


FIGURA 6: Espectro de absorção ultravioleta da preparação purificada do potyvirus isolado de *Macropitilium atropurpureum*.

resultante de uma possível degradação enzimática do componente de 36 k, no decorrer do processo de purificação, contingência a que também se referem HIEBERT & McDONALD (1976) e LIMA et al. (1979).

#### 4.5 - Produção de Anti-soro Específico e Relacionamento Sorológico com outros Potyvirus.

O anti-soro obtido a partir da imunização do coelho com preparação viral purificada, mostrou-se bastante específico, não reagindo com o extrato de plantas sadias em testes de dupla difusão em agar com SDS (FIGURA 8). Logo após a primeira sangria, efetuada aos sete dias depois da última injeção do vírus no coelho, passou-se a observar, em teste de dupla difusão em agar, uma boa reação do anti-soro testado contra o antígeno homólogo, então preparado a partir de plantas de siratro e de *N. benthamiana* infetadas. O título do anti-soro específico para o vírus, determinado em teste de dupla difusão em agar, ficou em torno de 1:16.

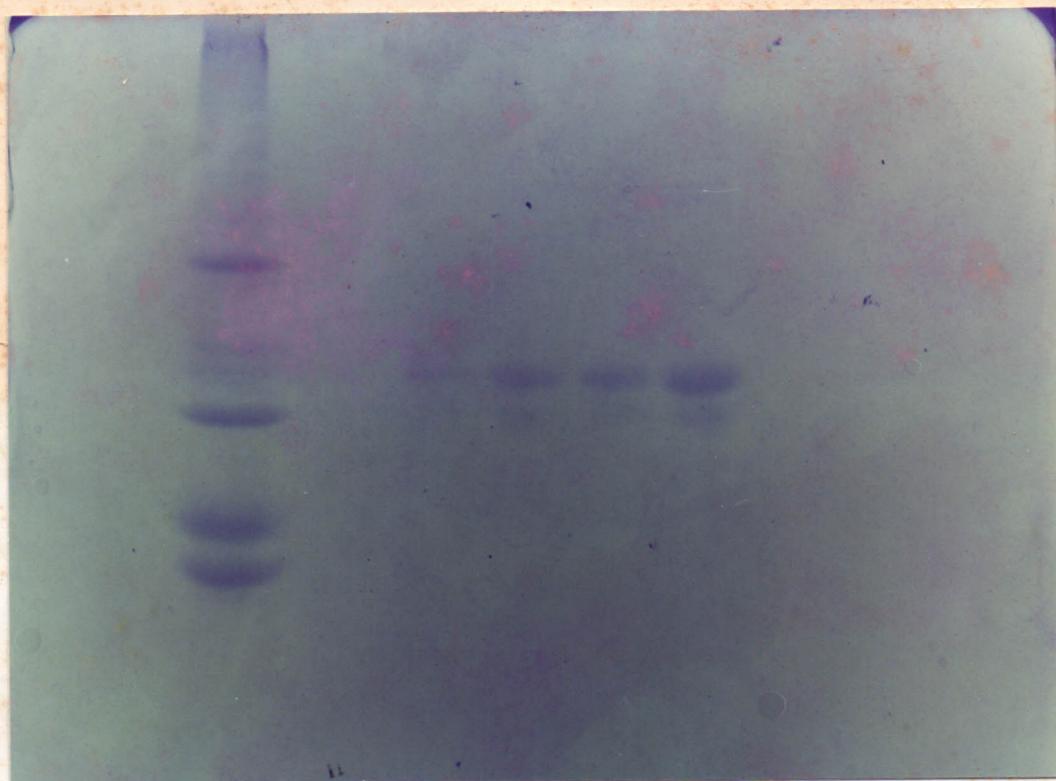
Os estudos de relacionamento sorológico com outros potyvirus, mediante a realização de testes de dupla difusão em agar, utilizando o anti-soro obtido, indicaram ser o vírus em estudo, distinto, porém, sorologicamente relacionado com os seguintes potyvirus: BICMV, CpAMV, CIMV, POTY-CE, POTY-CO, POTY-PL, POTY-SO, POTY-Soja, PWV e VMCI, os quais reagiram com o anti-soro do vírus isolado de siratro, mediante a formação de esporão, resultante do prolongamento da reação homóloga sobre a heteróloga. Nenhuma reação sorológica foi observada nos testes onde foram incluídos os potyvirus: BCMV, PRSV-P e PRSV-W, evidenciando serem estes sorologicamente distintos do potyvirus isolado de siratro (FIGURA 9).

FIGURA 7: Análise da proteína capsidial do potyvirus isolado de *Macroptilium atropurpureum*, em eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS.

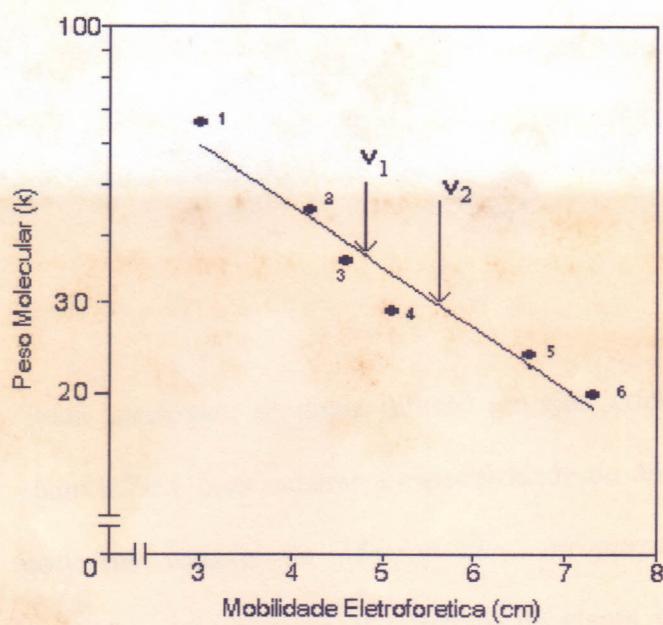
A) Fotografia da placa preparada com a solução viral, em diferentes concentrações e as proteínas padrões.

B) Gráfico da determinação do peso molecular da proteína capsidial do vírus. Os pontos escuros representam, de cima para baixo, as seguintes proteínas padrões: 1- albumina bovina (PM=66kDa), 2- albumina de ovo (PM=45kDa), 3- gliceraldeído-3-fosfato (PM=36kDa), 4- anidrase carbônica (PM=29kDa), 5- tripsinogênio (PM=24kDa) e 6- inibidor de tripsina (PM=20kDa). As setas indicam a posição dos componentes protéicos do vírus, na curva padrão:  $V_1=36\text{kDa}$  e  $V_2=29\text{kDa}$ . O eixo X representa a distância, em cm, percorrida pelas proteínas e o eixo Y, os pesos moleculares ( $\times 10^4$ ).

(A)



(B)



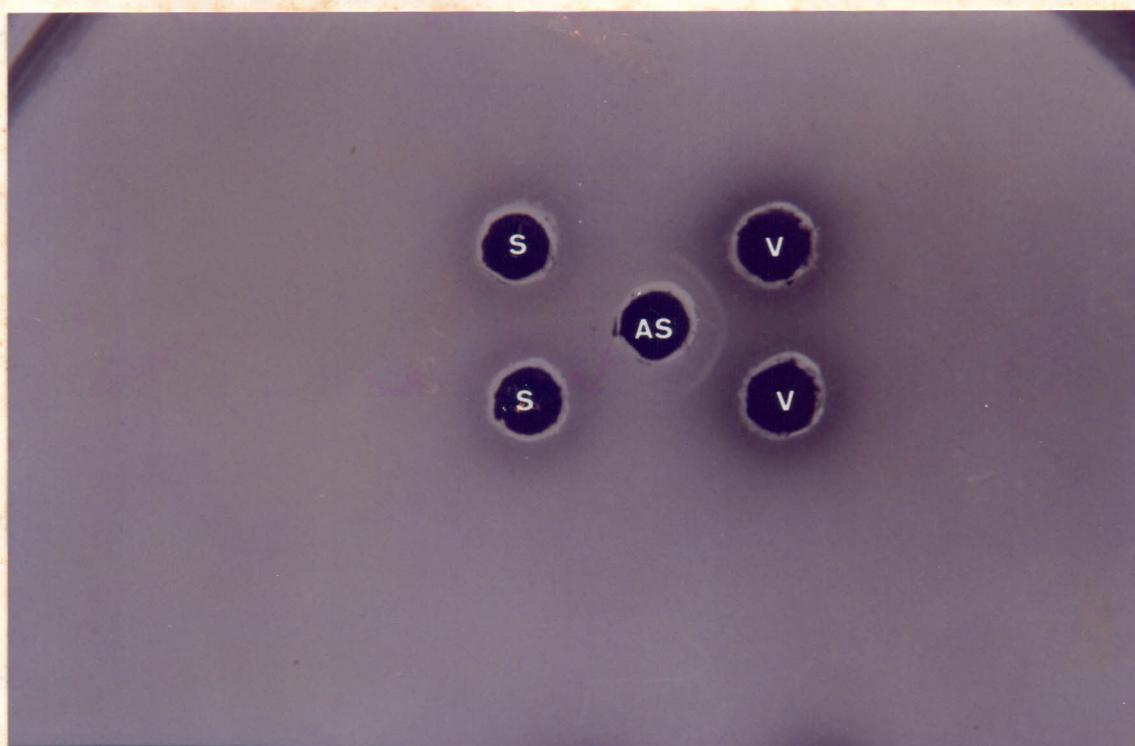


FIGURA 8: Teste sorológico de dupla difusão em agar contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), para mostrar a especificidade do anti-soro produzido para o potyvirus isolado de *Macroptilium atropurpureum*. As - anti-soro produzido para o vírus, V - extrato de planta infetada pelo vírus e S - extrato de planta sadia.

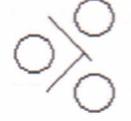
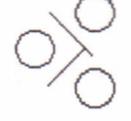
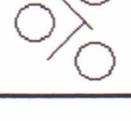
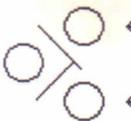
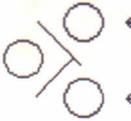
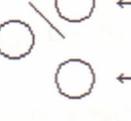
ANTI-SOROS		ANTÍGENOS	ANTI-SOROS		ANTÍGENOS
Poty-siratro	→		←	Poty-siratro	
			←	BCMV	
Poty-siratro	→		←	Poty-siratro	
			←	CpAMV-AR	
Poty-siratro	→		←	Poty-siratro	
			←	CpAMV-MN	
Poty-siratro	→		←	Poty-siratro	
			←	CpAMV-PT	
Poty-siratro	→		←	Poty-siratro	
			←	CpAMV-RN	
Poty-siratro	→		←	Poty-siratro	
			←	Poty-CE	
Poty-siratro	→		←	Poty-siratro	
			←	Poty-SO	
Poty-siratro	→		←	Poty-siratro	
			←	PRSV-P	
Poty-siratro	→		←	Poty-siratro	
			←	PWV	
Poty-siratro	→		←	Poty-siratro	
			←	BICMV	
Poty-siratro	→		←	Poty-siratro	
			←	CpAMV-MA	
Poty-siratro	→		←	Poty-siratro	
			←	CpAMV-PI	
Poty-siratro	→		←	Poty-siratro	
			←	CpAMV-QX	
Poty-siratro	→		←	Poty-siratro	
			←	CIMV	
Poty-siratro	→		←	Poty-siratro	
			←	Poty-CO	
Poty-siratro	→		←	Poty-siratro	
			←	Poty-soja	
Poty-siratro	→		←	Poty-siratro	
			←	PRSV-W	
Poty-siratro	→		←	Poty-siratro	
			←	VMCI	

FIGURA 9 - Resultados de estudos de relacionamento sorológico entre o potyvirus isolado de *Macroptilium atropurpureum* e outros potyvirus.

## 5 - DISCUSSÃO

As características biológicas e sorológicas do vírus isolado de siratro, bem como o tipo de inclusões formadas em células de suas plantas hospedeiras, indicam tratar-se de um novo membro do grupo potyvirus, aqui designado de vírus do mosaico do siratro ("siratro mosaic virus", SrMV).

O SrMV difere, em características biológicas e sorológicas, dos demais vírus até então encontrados infectando naturalmente o siratro e daqueles capazes de infetá-lo em estudos experimentais (MOSES & NARIANI, 1975; PROVVIDENTI & BRAVERMAN, 1976; SONODA, 1976, 1977a, 1977b; MEINERS et al., 1978; LIMA et al., 1977; FLORINDO, 1983; EDWARDSON & CHRISTIE, 1986). O mesmo mostrou-se sorologicamente distinto do BCMV, que possui estirpe capaz de infetar siratro (MEINERS et al., 1978), e ao qual estão estreitamente relacionados os vírus encontrados causando infecção natural em siratro na Índia e na Flórida (MOSES & NARIANI, 1975; SONODA, 1976, 1977a, 1977b; LIMA et al., 1977). Os relacionamentos sorológicos de SrMV com outros potyvirus, detectados mediante a formação de esporão em testes de dupla difusão em agar (FIGURA 9), indicam serem os mesmos distintos, porém sorologicamente relacionados. Tais resultados confirmam, outrossim, a inclusão do SrMV no grupo dos potyvirus. De acordo com PURCIFULL & BATCHELOR (1977) e LIMA (1978), o relacionamento sorológico entre vírus pertencentes ao grupo potyvirus é bastante comum, o que não se verifica entre vírus pertencentes a grupos distintos.

A presença de inclusões citoplasmáticas típicas dos potyvirus, constatada, mediante microscopia ótica, nas células da epiderme de plantas de *V. unguiculata* 'TVu 2896' e *N. benthamiana* infetadas pelo vírus, mostra a importância desta técnica na diagnose de viroses ocasionadas por potyvirus. De acordo com CHRISTIE & EDWARDSON (1986), LIMA et al. (1979) e LIMA (1980), o uso da microscopia ótica se constitui num método eficiente e relativamente barato que pode proporcionar uma rápida diagnose de infecções causadas por potyvirus.

As determinações feitas em relação às propriedades físicas "in vitro" para o SrMV resultaram em dados que são compatíveis com os referidos para o grupo potyvirus (HOLLINGS & BRUNT, 1981; EDWARDSON & CHRISTIE, 1986, 1991). Pequenas alterações nas medidas das propriedades dos vírus podem ser devidas a fatores diversos, tais como mudanças de pH, flutuações de temperatura, inibidores presentes na planta hospedeira utilizada como fonte de vírus e/ou na planta-teste, comprimento do dia, agregação de partículas e níveis de concentração viral (EDWARDSON & CHRISTIE, 1986).

Os resultados do estudo da gama de plantas hospedeiras do SrMV diferem dos apresentados nos trabalhos encontrados sobre ocorrência de vírus em siratro (MOSES & NARIANI, 1975; PROVVIDENTI & BRAVERMAN, 1976; SONODA, 1976, 1977a, 1977b; MEINERS et al., 1978; LIMA et al., 1977; FLORINDO, 1983; EDWARDSON & CHRISTIE, 1986). O vírus relatado por SONODA (1976, 1977a, 1977b) e caracterizado por LIMA et al. (1977), é capaz de causar apenas sintomas locais em *C. ccidentalis* e *G. max*, enquanto SrMV ocasiona sintomas de infecção sistêmica nas referidas espécies. De outra parte, o vírus encontrado infetando siratro, na Índia

(MOSES & NARIANI, 1975) causa infecção em *C. ternatea* e infecção sistêmica em *V. mungo*, as quais não são hospedeiras do SrMV (TABELA 1). Também é distinto do SrMV o potyvirus estudado por FLORINDO (1983) e isolado de *C. ternatea*. Com efeito, embora sendo capaz de causar infecção sistêmica em siratro, pode, também, infectar *C. ensiformis*, *G. globosa*, *P. vulgaris* 'Rico 23-SP' e *V. unguiculata* 'Pitiuba', plantas que não exibiram nenhum sintoma quando inoculadas com o SrMV. Por outro lado, a espécie vegetal *C. occidentalis*, suscetível ao SrMV, não é hospedeira do vírus estudado por FLORINDO (1983).

Os bons graus de pureza e concentração das preparações purificadas, obtidas para o SrMV, servem para confirmar a eficiência do método descrito por LIMA et al. (1979), ora usado com algumas modificações (FIGURA 5). Os insucessos nas tentativas de purificação do vírus, a partir de plantas de siratro e de *V. unguiculata* 'CE-491' e 'TVu 2896', a par das excelentes preparações virais obtidas de *N. benthamiana*, demonstram a necessidade da escolha de um hospedeiro adequado para a propagação do vírus, como fator de fundamental importância para sua purificação (MATTHEWS, 1991). Segundo LIMA (1978), um dos aspectos críticos na purificação de potyvirus para se obter um rendimento máximo é o hospedeiro usado na sua multiplicação. De acordo com WALKEY (1985), o hospedeiro ideal para multiplicação viral, visando sua purificação, deve ser isento de inibidores e outros compostos que possam inativar ou interferir com o vírus durante a purificação e permitir sua multiplicação em altas concentrações. Neste trabalho, as tentativas de purificação, utilizando cultivares de caupi como hospedeiras de multiplicação, produziram um baixo rendimento final, provavelmente devido à baixa concentração do vírus nos tecidos das plantas infetadas.

Utilizando-se siratro, hospedeira original do SrMV, ocorreram inconvenientes relacionados ao ciclo vegetativo da planta, além do fato de as folhas apresentarem tamanho diminuto. Finalmente, *N. benthamiana*, quando infetada pelo vírus, apresentou folhas de bom tamanho exibindo bons sintomas, revelando-se como excelente hospedeira de multiplicação, permitindo a obtenção de uma preparação final purificada com elevada concentração viral, além da vantagem proveniente da facilidade de manuseio do material foliar na etapa inicial de extração do vírus. Diversas espécies de *Nicotiana* têm sido utilizadas, com sucesso, na purificação de vários potyvirus (HIEBERT & McDONALD, 1973; LIMA, 1978; MEISSNER FILHO et al., 1990). LIMA (1978), ao usar *N. benthamiana*, conseguiu excelente resultado na purificação de inclusões de BICMV.

Outro problema que deve ser sempre levado em consideração na purificação de potyvirus está ligado à elevada capacidade de agregação de suas partículas (LIMA, 1978). Segundo CHOI et al. (1977), a purificação de potyvirus torna-se difícil, devido a essa capacidade de agregação de partículas e sua instabilidade durante o processo de purificação. A agregação tem sido um sério problema frequentemente encontrado na purificação de potyvirus (DELGADO-SANCHEZ & GROGAN, 1966; DAMIRDAGH & SHEPERD, 1970; BARNETT & ALPER, 1977; CHOI et al., 1977; LIMA et al., 1979; TAIWO et al., 1982; FUJISAWA et al., 1983; MARINHO & KITAJIMA, 1989). De acordo com MARINHO & KITAJIMA (1989), a agregação de partículas em potyvirus constitui problema, principalmente nas fases iniciais de extração e clarificação do vírus. Conforme FUJISAWA et al. (1983), além da seleção do hospedeiro adequado para a purificação, a escolha do tampão e do método de clarificação são muito importantes na prevenção de perdas e obtenção de um máximo rendimento. Visando

evitar problemas de agregação, usou-se, no presente trabalho, triton X-100, em combinação com PEG, na precipitação do vírus. A precipitação de partículas de potyvirus com PEG, empregada na purificação e concentração do SrMV, tem sido eficazmente aplicada na purificação de muitos vírus, inclusive de potyvirus. Em alguns casos, no entanto, a precipitação com PEG tem acarretado perdas por agregação de partículas, umas com as outras ou com materiais do hospedeiro, o que tem sido solucionado com a combinação de PEG e triton X-100 (CHOI et al., 1977; SEQUEIRA, 1982). Conforme FUJISAWA et al. (1983), o uso de tampão de extração de alta molaridade, aliada a utilização de PEG com triton X-100, solucionou os problemas de agregação deparados na purificação do vírus do mosaico da cenoura ("beet mosaic virus"). A utilização da mistura dos solventes orgânicos clorofórmio e tetracloreto de carbono, para a clarificação de extrato vegetal contendo vírus, foi também adotada com sucesso por diversos autores na purificação de outros potyvirus: BICMV (LIMA, 1978); isolados de PRSV-P (PURCIFULL & HIEBERT, 1979; GONSALVES & ISHII, 1980) e vírus do mosaico amarelo do zucchini ("zucchini yellow mosaic virus") (PURCIFULL et al., 1984; NAMETH et al., 1985).

O rendimento final, obtido na purificação do SrMV, com aproximadamente 19,00 mg de vírus por Kg de tecido infetado, encontra-se dentro da faixa dos valores considerados satisfatórios para os potyvirus (MARINHO & KITAJIMA, 1989).

O peso molecular estimado para a proteína capsidial do SrMV, determinado eletroforeticamente, encontra-se próximo aos valores descritos para os potyvirus: 32-34 k, (HOLLINGS & BRUNT, 1981). As duas bandas de proteínas detectadas, relativas ao capsídeo do SrMV purificado (FIGURA 7) correspondem à unidade química do seu

capsídeo (36 k) e sua possível degradação enzimática, durante o processo de purificação e estocagem em refrigerador. A degradação enzimática da capa proteica é um fenômeno comum entre potyvirus (HIEBERT & McDONALD, 1973, 1976; LIMA, 1978; LIMA et al., 1979). TAIWO et al. (1982) sugerem uma segunda centrifugação em gradiente de cloreto de cézio, antes da estocagem, para evitar ou minimizar a degradação proteolítica da proteína capsidial.

O método "foot pad" de imunização de coelho, adotado na obtenção do anti-soro específico para o SrMV, mostrou-se eficiente, permitindo, inclusive, a economia de antígeno. LIMA (1978) obteve anti-soro para o BICMV com boa concentração de anti-corpo, à custa de pequena quantidade de antígeno, usando o mesmo método. O anti-soro obtido para o SrMV, nas condições em que foram realizados os trabalhos, apresentou um título satisfatório e grau de pureza adequado para teste de dupla difusão em agar. A inexistência de reação do anti-soro com extrato de planta sadia, desde o início da coleta, evidencia a ausência ou baixa concentração de anticorpos para as proteínas da planta. O elevado grau de especificidade do anti-soro serve, outrossim, para confirmar a eficiência do processo de purificação viral.

## 6 - CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados e discutidos no presente trabalho, pode-se evidenciar as seguintes conclusões:

- As características biológicas, citológicas, sorológicas, de transmissibilidade por inseto (afideo), de estabilidade em seiva e peso molecular da proteína capsial do vírus isolado de siratro, *Macrotidium atropurpureum*, indicam ser o mesmo um novo membro do grupo potyvirus, ora descrito com o nome de vírus do mosaico do siratro ("siratro mosaic virus", SrMV);

- A espécie vegetal *Nicotiana benthamiana* mostrou-se excelente para multiplicação e purificação do SrMV;

- O método adotado para a purificação do SrMV mostra-se eficiente e a boa especificidade do anti-soro produzido, evidenciou o bom nível de pureza da preparação viral purificada;

- O SrMV atinge elevadas concentrações tanto em siratro, uma vez que foram desenvolvidos sintomas em plantas-teste com diluições de até  $10^{-5}$ , como em *N. benthamiana* que permitiu a obtenção de uma preparação purificada de bom nível de pureza e concentração.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, O.N. & ALLEN, E.K. **The Leguminosae. A source book of characteristics, uses and nodulation.** 1 ed. Madison, Wisconsin, USA. University of Wisconsin Press, 1981. 812p.
- BARNETT, O.W. & ALPER, M. Characterization of iris fulva virus. **Phytopathology** 67:448-454. 1977.
- CHOI, J.K.; MAEDA, T.; WAKIMOTO, S. An improved method for purification of turnip mosaic virus. **Ann. Phytopath. Soc. Japan** 43: 440-448. 1977.
- CHRISTIE, R.G. & EDWARDSON, J.R. **Light and electron microscopy of plant virus inclusions.** Agric. Exp. Stn., Univ. of Florida, Monogr. Ser. 9. 1977. 150p.
- CHRISTIE, R.G. & EDWARDSON, J.R. Light microscopy techniques for detection of plant virus inclusions. **Plant Disease** 70:273-279. 1986.
- COSTA, A.S. Investigações sobre moléstias do feijoeiro no Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FEIJOEIRO, 1, Campinas-1972. **Anais...** Viçosa, 1972. Vol. 2:30-384.
- COSTA, A.S.; MIYASAKA, S.; KIIHL, R.A.S.; DEMETTÊ, J.D. Moléstias de vírus da soja em São Paulo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DA SOJA, 1, Campinas, 1970.
- DALLA ROSA, A.; CARPENEDO, V.; MIELNICZUK, J. Alfafa, desmodium e siratro na recuperação de solos. **Lavoura Arrozreira** 37:16-17. 1984.
- DAMIRDAGH, I.S. & SHEPERD, R.J. Purification of the tobacco etch and other viruses of the potato Y group. **Phytopathology** 60: 132-142. 1970.

- DELGADO-SANCHEZ, S. & GROGAN, R.C. Purification and properties of potato virus Y. **Phytopathology** **56**:1397-1404. 1966.
- EDWARDSON, J.R. & CHRISTIE, R.G. **The Potyvirus Group**. Agric. Exp. Stn., Univ. of Florida, Monog. Vol. I. Nº 16-I. 1991. 348p.
- EDWARDSON, J.R. & CHRISTIE, R.G. **Viruses Infecting Forage Legumes**, Agric. Exp. Stn., Univ. of Florida, Monog. Vol. II. Nº 14. 1986. 502p.
- FLORINDO, M.I. **Isolamento e caracterização de um potyvirus e avaliação dos danos ocasionados em cunhã, *Clitoria ternatea* L.** Fortaleza, Universidade Federal do Ceará, 1983. 47p. Dissertação, Mestrado).
- FUJISAWA, I.; TSUCHIZAKI, T.; IIZUKA, N. Purification and serology of beet mosaic virus. **Ann. Phytopath. Soc. Japan** **49**:22-31. 1983.
- GONSALVES, D. & ISHII, M. Purification and serology of papaya ringspot virus. **Phytopathology** **70**: 1028-1032. 1980.
- HIEBERT, E. & McDONALD, J.G. Capsid protein heterogeneity in turnip mosaic virus. **Virology** **70**: 144-150. 1976.
- HIEBERT, E. & McDONALD, J.G. Characterization of some proteins associated with viruses in the potato Y group. **Virology** **56**: 349-361. 1973.
- HOLLINGS, M. & BRUNT, A.A. **Potyriviruses**. In: KURSTAK, E., ed. **Handbook of plant virus infections comparative diagnosis**. Elsevier, Amsterdam, 1981. p.731-807.
- HUTTON, E.M. Siratro - a tropical legume bred from *Phaseolus atropurpureus*. **Aust. J. Exp. Agr. Anim. Husb.** **2**: 117-125.1962.

- KRETSCHMER, A.E.Jr. Siratro (*Phaseolus atropurpureus* DC.) a summer-growing perennial pasture legume for central and south Florida. Agric. Exp. Stn., Univ. of Florida, Circular S-214. 1972. 21p.
- KURSTAK, E. **Handbook of plant virus infections comparative diagnosis**. Elsevier, Amsterdam, 1981. 943p.
- LAEMMLI, V.K. Cleavage of structural proteins during the head of Bacteriophage T4. **Nature** **227**: 280-685. 1980.
- LENNÉ, J.M. & SONODA, R.M. Tropical pasture pathology a pioneering and challenging endeavor. **Plant Disease** **74**:945-951. 1990.
- LIMA, J.A.A. **Blackeye cowpea mosaic virus: purification, partial characterization, serology, and immunochemical and cytological techniques for detection of virus infected legume seeds**. Gainesville, Florida, University of Florida, 1978. 154p. (Tese, Doutorado).
- LIMA, J.A.A. Inclusões em catavento induzidas pelos potyvirus. **Fitopatol. bras.** **6**: 219-220. 1980.
- LIMA, J.A.A. Testes sorológicos para identificação de vírus de leguminosas. **Fitopatol. bras.** **4**:215-225. 1979.
- LIMA, J.A.A.; PURCIFULL, D.E.; HIEBERT, E. Purification, partial characterization and serology of blackeye cowpea mosaic virus. **Phytopatology** **69**: 1252-1258. 1979.
- LIMA, J.A.A.; PURCIFULL, D.E.; SONODA, R.M. Some properties of a potyvirus isolated from siratro in Florida. **Proc. Am. Phytopathol. Soc.** **4**: 1977. (Resumo).

- MARINHO, V.L.A. & KITAJIMA, E.W. Um método simplificado de purificação potyvirus. **Fitopatol. bras.** 14:91-93. 1989.
- MARQUES, M.A.L. & LIMA, J.A.A. Purification and partial characterization of a potyvirus isolated from siratro, *Macroptilium atropurpureum* (DC) Urb. IN: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 6, São Lourenço, 1992. **Anais...** São Lourenço, 1992, N° E-35.
- MATTHEWS, R.E.F. **Plant virology**. 3 ed. New York, Academic Press. 1991. 835p.
- MEINERS, J.P.; GILLASPIE, A.G.Jr.; LAWSON, R.H.; SMITH, F.F. Identification and partial characterization of a strain of bean common mosaic virus from *Rhynchosia minima*. **Phytopathology** 68: 283-287. 1978.
- MEISSNER FILHO, P.E.; CUPERTINO, F.P.; VILA, A.C. Purificação e sorologia de dois isolados do vírus Y da batata obtidos de pimentão e de tomate no Distrito Federal. **Fitopatol. bras.** 15:235-237. 1990.
- MINTON, N.A.; FORBES, I.; WELLS, H.D. Susceptibility of potential legumes to *Meloidogyne* species. **Plant Disease** 51:1001-1003. 1967.
- MOSES, G.J. & NARIANI, T.K. A mosaic disease of *Phaseolus atropurpureus*. **Indian Phytopathology** 28: 102-103. 1975.
- NAMETH, S.T.; DODDS, J.A.; PAULUS, A.O.; KISHABA, A. Zucchini yellow mosaic virus associated with diseases of melon and watermelon in southern California desert valleys. **Plant Disease** 69: 785-788. 1985.
- NOORDAM, D. **Identification of plant viruses: methods and experiments**. Cen. Agric. Pub. Doc., Wageningen. 1973. 207p.

- PEDREIRA, J.V.S. Leguminosas forrageiras - o siratro. **Revista dos Criadores** 505: 46-47. 1972.
- PROVVIDENTI, R. & BRAVERMAN, S.W. Seed transmission of bean common mosaic virus in phasey bean. **Phytophology** 66: 1274-1275. 1976.
- PUPO, N.I.H. **Manual de Pastagens e Forrageiras: formação, conservação, utilização**. Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, Campinas. 1980. 343p.
- PUPO, N.I.H. **Pastagens e Forrageiras: pragas, doenças, plantas invasoras e tóxicas, controles**. Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, Campinas. 1977. 311p.
- PURCIFULL, D.E.; ADLERZ, W.C.; SIMONE, G.W.; HIEBERT, E.; CHRISTIE, S.R. Serological relationships and partial characterization of zucchini yellow mosaic virus isolated from squash in Florida. **Plant Disease** 68: 230-233. 1984.
- PURCIFULL, D.E. & BATCHELOR, D.L. **Immunodifusion tests with sodium dodecil sulfate (SDS) - treated plant viruses and plant virus inclusions**. Agric. Exp. St. Bull. Univ. of Florida. Nº 788. 1977. 39p.
- PURCIFULL, D.E.; HIEBERT, E.; McDONALD, J.G. Immunochemical specificity of cytoplasmic inclusions induced by viruses in the potato Y group. **Virology** 55: 275-279. 1973.
- PURCIFULL, D.E. & HIEBERT, E. Serological distinction of watermelon mosaic virus isolates. **Phytophatology** 69: 112-116. 1979.
- SANTOS FILHO, L.F. A versatilidade do siratro permite sua utilização em diversas atividades. **Jornal Agroceres**:31. 1974.

- SEQUEIRA, J.C. Purificação de potyvirus utilizando polietilenoglicol 6000 e triton X-100. Garcia de Orta, **Ser. Est. Agron.** 9:(1-2): 275-278. Lisboa. 1982.
- SONODA, R.M. Effect of a mosaic virus on siratro and other *Macroptilium atropurpureum* (DC.) Urb. accessions. **Soil and Crop Sci. Soc. Flo.Proceedings** 36: 147-149. 1977a.
- SONODA, R.M. Reaction of *Macroptilium atropurpureum* and related species to three diseases in Florida. **Tropical Grasslands** 10:61-63. 1976.
- SONODA, R.M. Reaction of *Macroptilium atropurpureum* (DC) Urb. accessions to a potyvirus. Ft. Pierce ARC Research Report, RL-1977-4. 1977b. 4p.
- SONODA, R.M. Reduction of forage yield of siratro by *Rhizoctonia solani* foliar blight. **Plant Disease** 64: 667. 1980.
- STACE-SMITH, R. & TREMAINE, J.H. Purification and composition of potato virus Y. **Phytopathology** 60: 1785-1789. 1970.
- TAIWO, M.A.; GONSALVES, D.; PROVVIDENTI, R.; THURSTON, H.D. Partial characterization and grouping of isolates of blackeye cowpea mosaic and cowpea aphidborne mosaic viruses. **Phytopathology** 72:590-596. 1982.
- TIBAU, A.O. **Pecuária Intensiva: com uma introdução sobre forrageiras e pastos**. 3 ed. Nobel, São Paulo. 1976.210p.
- VICENZI, M.L. Práticas de manejo de pastagens associadas a lavouras. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 8, Piracicaba. 1986. **Anais...** Piracicaba, 1986. p.1-16.

WALKEY, D.G.A. **Applied plant virology**. 1 ed. William Heinemann Ltd., London,  
1985. 329p.