

PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE “COWPEA MO- SAIC VIRUS” EM *Vigna sinensis* Endl. NO CEARÁ.

J. Albérico A. Lima (*)
Merrit R. Nelson (**)

O feijão-de-corda, *Vigna sinensis* Endl. é uma cultura de subsistência de destacada posição sócio-econômica para o agricultor do Nordeste Brasileiro. Nesta região, entre as várias moléstias que incidem sobre o feijão-de-corda, o “mosaico”, pela assiduidade e severidade com que se vem manifestando, destaca-se como a mais importante.

OLIVEIRA(6), CANER *et al.*(1), COSTA *et al.*(2), OLIVEIRA *et al.*(5) e VITAL *et al.*(8) realizaram detalhados estudos envolvendo o referido mosaico, doença ocasionada por vírus e assinalada em diferentes regiões do Brasil. No Nordeste Brasileiro, o presente trabalho constitui a primeira referência sobre a purificação de um dos seus agentes causais e sua identificação sorológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Purificação do Vírus

O vírus foi purificado através do método de precipitação com polietileno

glicol (PEG) 6 000 (peso molecular), usado por Herbert(3), após precipitação das proteínas da planta com n-butanol.

Folhas de plantas de feijão-de-corda, variedade “pitiúba”, exibindo os sintomas característicos de mosaico, foram colhidas e homogeneizadas em liqüificador com solução tamponada de fosfato 0,1M, de pH=7,0, na proporção de 100g de folhas para 200 ml da solução. O extrato obtido foi filtrado através de gaze dupla e o suco submetido, durante 15 minutos, a uma centrifugação de 10 000 rpm, na centrífuga Janetzki, modelo K-24. Oito por cento de n-butanol foi adicionado à parte líquida, a qual foi agitada por 15 a 20 minutos e, em seguida, submetida a nova centrifugação, a fim de precipitar o coágulo esverdeado formado. Visando a precipitação do vírus, 8% de polietileno glicol 6 000 e 4% de NaCl (peso/volume) foram adicionados à parte líquida que, após agitada durante 40 minutos, foi submetida a nova centrifugação de 10 000 rpm, durante 30 minutos. A parte líquida foi descartada e o precipitado contendo o vírus foi ressuspenso em tampão de fosfato 0,1M, com pH=7,0. Após a clarificação da solução contendo o vírus, através de centrifugação à velocidade de 10 000 rpm, por 10 minutos, as etapas

(*) Professor do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

(**) Professor de Fitopatologia, Universidade do Arizona, Tucson - Arizona, U.S.A.

de precipitação e concentração com PEG e NaCl foram repetidas duas vezes mais.

O vírus, parcialmente purificado em tampão de fosfato, pH=7,0, foi misturado com solução a 4% de ácido fosfotungstênico (PTA), pH=7,0, resultando em uma preparação final do vírus com 2% de PTA. Uma gota da preparação final do vírus foi depositada em película revestida de carbono e observada ao microscópio eletrônico depois de seca. A solução purificada do vírus foi também examinada no espectrofotômetro Beckman, modelo 2.400, testada sorologicamente e inoculada em plantas de feijão-de-corda, variedades "pitiúba" e "seridó" e em *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn.

A concentração do vírus na solução foi determinada usando-se a Densidade Óptica obtida através do comprimento de onda 260 nm e o "coeficiente de extinção" igual a 7,0.

Testes Sorológicos

A solução purificada do vírus e o suco de plantas de feijão-de-corda afetadas pelo mosaico foram testados contra antissoros específicos para os vírus "Southern Bean Mosaic Virus", "Bean Pod Mottle Virus", "Soybean Mosaic Virus", "Cowpea Chlorotic Mottle Virus", "Broadbean Mottle Virus" e "Cowpea Mosaic Virus", todos obtidos das Universidades Norte-Americanas de Purdue, North Caroline e Oregon.

O teste de Ouchterlony⁽⁴⁾ foi usado para todos os tipos de antissoros testados. Placas de plástico de 60x15mm foram preparadas com meio de agar, contendo 1% de Ion Agar nº 2, dissolvido em água destilada, 0,85% de NaCl e 1:1.000 (peso/volume) de azia de sódio, a qual foi adicionada após a esterilização do meio. Pequenos orifícios foram abertos no meio endurecido, com o auxílio de furadores de cortiça, obedecendo a um arranjo hexagonal, constituído de um orifício central com 5 mm de diâmetro, cercado por orifícios externos com 4 mm de diâmetro cada, distanciados de 5 mm daquele.

Cada antissoro foi depositado nos orifícios centrais de duas placas e os

antígenos — solução purificada e suco de plantas contendo o vírus — depositados nos orifícios da periferia do hexágono, alternados com solução tampão de fosfato e suco de plantas sem sintomas, respectivamente. Para o caso do antissoro específico ao vírus "Soybean Mosaic Vírus", os antígenos foram previamente tratados com solução de sódio dodecilsulfato (SDC). Decorrido o período de 24 a 48 horas, as placas foram cuidadosamente examinadas contra a luz, interpretadas e fotografadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A solução purificada apresentou um excelente aspecto, evidenciando a presença do vírus em bom estado de pureza. As inoculações em plantas de feijão-de-corda, *V. sinensis*, variedades "pitiúba" e "seridó" e em *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn., demonstraram alta infectividade do vírus presente na solução. Os primeiros sintomas de mosaico nas variedades de feijão-de-corda e as lesões necróticas localizadas em *C. amaranticolor* apareceram no período de 4-7 dias após as inoculações. A presença do vírus na solução foi comprovada através de exame conduzido ao microscópio eletrônico e do espectro de absorção ao ultravioleta, obtido no espectrofotômetro. O microscópio eletrônico revelou ser o vírus constituído de partículas poliédricas de aproximadamente 30 nm de diâmetro (Fig. 1), enquanto o espectrofotômetro apresentou uma absorção característica de nucleoproteínas, com o máximo de absorção no comprimento de onda 260 nm (Fig. 2). Através da densidade óptica obtida em 260 nm (1,450), a concentração do vírus na solução foi calculada em, aproximadamente, 2,0 mg de vírus por mililitro da solução. Embora Van Kammen⁽⁷⁾ tenha observado que o tratamento com butanol-clorofórmio causa considerável perda de "Cowpea Mosaic Virus", os resultados obtidos indicaram certa eficiência da combinação de álcool butílico e PEG 6.000 na purificação do vírus a partir de plantas de feijão-de-corda, *V. sinensis*.

Nos testes sorológicos conduzidos com solução purificada e suco de plantas infetadas pelo vírus, faixas de precipitação foram observadas somente entre os referidos antígenos e o antisoro específico contra "Cowpea Mosaic Virus" (Figs. 3 e 4). As reações positivas e específicas observadas possibilitaram a rápida identificação do "Cowpea Mosaic Virus".

De outra parte, as características morfológicas observadas ao microscópio eletrônico (Fig. 1) mostraram-se idênticas às descritas para "Cowpea Mosaic Virus" (7), confirmando a identificação sorológica do vírus.

O mesmo vírus foi sorologicamente identificado em São Paulo por Oliveira *et al.* (5), recebendo, no entanto, a denominação de Vírus do Mosaico de Vigna. No Ceará, embora o mosaico represente, desde há muito, a mais séria moléstia da cultura do feijão-de-corda, *V. sinensis*, o presente trabalho constitui a primeira referência sobre a identificação de um dos seus agentes causais — o "Cowpea Mosaic Virus".

SUMMARY

A high yield of purified Cowpea Mosaic Virus suspension with high infectivity was obtained by a combination of butyl alcohol and polyethylene glycol (PEG) 6,000 methods of virus purification. The virus concentration determined spectrophotometrically was of 2 mg of virus per ml of solution.

The purified preparation, as well as crude sap obtained from infected cowpea plants, were checked against six antisera that were each specific for one

of the viruses: Southern Bean Mosaic Virus, Broadbean Mottle Virus, Bean Pod Mottle Virus, Soybean Mosaic Virus, Cowpea Mosaic Virus and Cowpea Chlorotic Mottle Virus. Double immunodiffusion tests were used and a specific and positive reaction was observed only with the Cowpea Mosaic Virus antiserum. The electron micrograph of purified virus solution confirmed the serological identification of the virus. This virus is common on cowpea in several States of Brasil, but not previously reported from Ceará.

BIBLIOGRAFIA

1. CANER, J., K. SILBERSCHMIDT & E. FLORES. 1969 — Ocorrência do vírus do Mosaico da Vigna no Estado de São Paulo. *O Biológico*, 35: 13-16.
2. COSTA, A. S. *et al.* 1969 — Ocorrência do mosaico do feijão macáassar em São Paulo. *Rev. Soc. Brasil. Fitopatologia*, Campinas 3: 56-57.
3. HEBERT, T. T. 1963. Precipitation of plant viruses by polyethylene glycol. *Phytopathology*, 53: 362.
4. OUCHTERLONY, O. 1962 — Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II. *Progr. Allergy*, 6: 30-154.
5. OLIVEIRA, A. R., A. S. COSTA & I. J. B. CAMARGO. 1969 — Purificação e sorologia do vírus do mosaico da Vigna. *Rev. Soc. Brasil. Fitopatologia*, Campinas, 3: 26-28.
6. OLIVEIRA, M. A. 1947 — Contribuição ao estudo dos vírus causadores de mosaico nos feijões macáassar (*Vigna* spp.). Instituto Agronômico do Sul, Pelotas. Bol. Tec. 1: 1-35.
7. VAN KAMMEN, A. 1967 — Purification and properties of the components of cowpea mosaic virus. *Virology*, 31: 633-642.
8. VITAL, A. F. *et al.* — 1972 — Mosaicos em *Vigna sinensis* no Estado de Pernambuco I — Círculo de Hospedeiros e Sintomas do Mosaico "T". *Pesq. Agrop. Nord.*, Recife, 4 (1): 69-79.

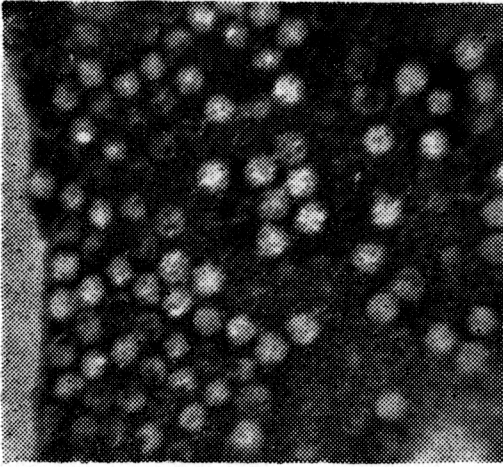


FIG. 1 — Microfotografia com microscópio eletrônico mostrando partículas polédricas de "Cowpea Mosaic Virus" em solução purificada (aumento 200.000 x).

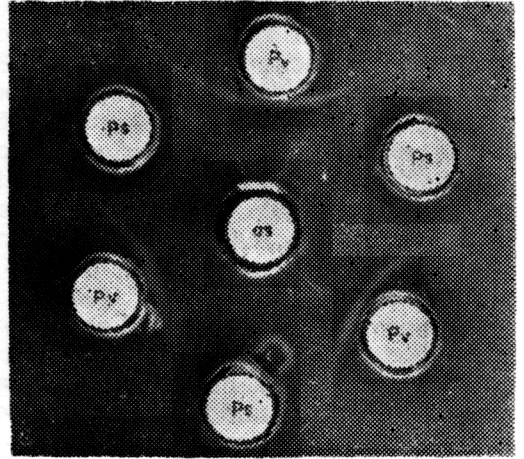


FIG. 3 — Resultado de teste de imunodifusão em agar com suco de plantas de feijão-de-corda com mosaico (Pv) e suco de plantas sem sintomas (Ps) contra antissoro específico para "Cowpea Mosaic Virus" (as).

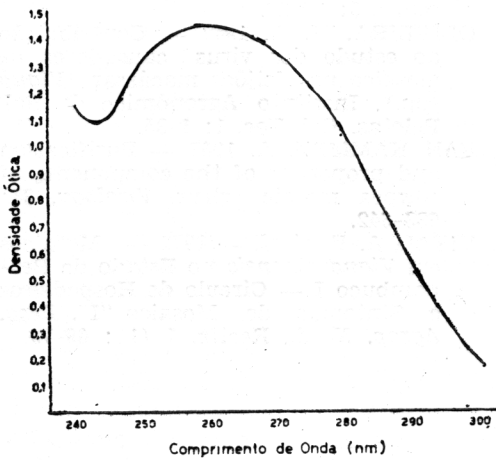


FIG. 2 — Curva de absorção ao ultra-violeta para solução purificada de "Cowpea Mosaic Virus".

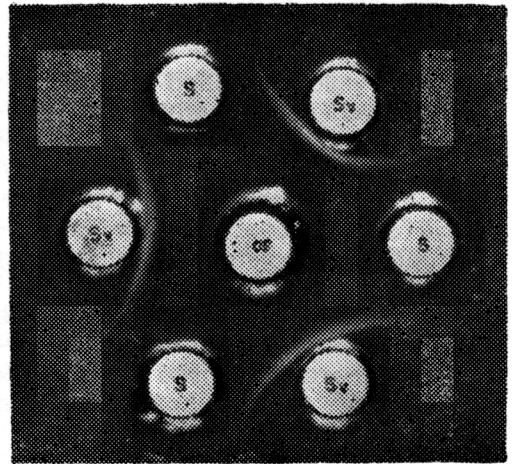


FIG. 4 — Resultado de teste de dupla difusão em agar com solução purificada a partir de plantas de feijão-de-corda com mosaico (Sv) e solução tampão de fosfato (S) contra antissoro específico para "Cowpea Mosaic Virus" (as).