

AUSÊNCIA DE TRANSMISSÃO POR SEMENTES DO VÍRUS DO MOSAICO SEVERO DO CAUPI*

FRANCISCO MIGUEL DE ASSIS FILHO

Aluno de Mestrado em Fitossanidade da UFRPE.

JOSÉ ALBÉRSIO DE ARAÚJO LIMA

Prof. Adjunto do Depto. de Fitotecnia da Univ. Fed. do Ceará (UFC).

GILVAN PIO RIBEIRO

Prof. Adjunto do Depto. de Agronomia da UFRPE.

ROSA DE LIMA RAMOS MARIANO

Prof. Adjunto do Depto. de Agronomia da UFRPE.

Estudou-se a possibilidade de transmissão do vírus do mosaico severo do caupi - CpSMV. "Cowpea Severe Mosaic Comovirus", através de sementes de seis cultivares de *Vigna unguiculata*, obtidas de plantas infectadas artificialmente em condições de campo e de casa-de-vegetação. Foram testadas 12.817 sementes pelos métodos sorológico, infectividade e plantio direto. Para o teste sorológico utilizaram-se macerados de pares de hipocótilos, obtidos a partir de 11.120 sementes das cvs. BR 1-Poty, Carrapicho, Pitiúba, Sempre Verde, Seridó e TVu 2331 germinadas em papel toalha e testadas contra anti-soro específico para CpSMV através de dupla difusão em agar. O teste de infectividade foi realizado com 800 sementes das cvs. Carrapicho e Seridó, produzidas em campo, das quais foram dissecados o tegumento, cotilédones e eixo embrionário. Extrato obtido pela maceração em tampão fosfato de 5 unidades de cada uma das partes, foi inoculado em plântulas de caupi cv. Sempre Verde, em casa-de-vegetação, as quais foram observadas por 20 dias, visando verificar a ocorrência ou não de infecção viral. Para o plantio direto, 1.000 sementes de 'Carrapicho' e 'Seridó', produzidas em campo, foram postas a germinar em vasos plásticos contendo solo esterilizado, e as plantas observadas por 30 dias. Para confirmação dos resultados do plantio direto, testaram-se sorologicamente 10% das plantas contra anti-soro específico para CpSMV. Observou-se a ocorrência de manchas em se-

* Parte da Dissertação apresentada pelo primeiro autor ao Curso de Mestrado em Fitossanidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

mentes de algumas cultivares. A despeito destas alterações no tegumento, não se detectou a presença do vírus em nenhuma semente madura, indicando que o CpSMV não é transmitido através de sementes de caupi.

INTRODUÇÃO

A transmissibilidade através de sementes de caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., do vírus do mosaico severo do caupi-CpSMV ("Cowpea Severe Mosaic Comovirus") assinalada por vários pesquisadores (Shepherd, 1964; Haque e Persad, 1975; Jager, 1979; Boswell e Gibbs, 1983), jamais foi comprovada na América Central (Perez e Cortes - Monllor, 1970; Alconero e Santiago, 1973; Lima, Santos e Silveira 1986). No Brasil, Costa et al. (1969), Vital et al. (1969), Gonçalves (1983), Lima, Gonçalves e Silveira (1983), Santos (1986), Silveira (1987), Lima, Silveira e Oliveira (1989) e Assis Filho et al. (1991) confirmaram a não transmissibilidade do CpSMV através de sementes, já sugerida por Lima e Nelson (1977). A controvérsia a respeito do assunto pode ser explicada pelo fato dos trabalhos com resultados positivos datarem da época em que o CpSMV era considerado estirpe do vírus do mosaico do caupi-CpMV ("Cowpea Mosaic Comovirus"), sendo que este último não ocorre naturalmente ao norte da zona temperada (Fulton e Scott, 1979).

O propósito deste trabalho foi estudar a possibilidade de transmissão de CpSMV por sementes de diferentes cultivares de caupi produzidas em condições de campo e casa-de-vegetação por plantas infectadas artificialmente, através dos métodos sorológico, infectividade e plantio direto.

MATERIAL E MÉTODO

Produção de sementes por Plantas Infectadas Artificialmente

Foram plantadas sementes das cultivares BR 1-Poty, Carrapicho, Pitiúba, Sempre Verde, Seridó e TVu 2331 em condições de campo e casa-de-vegetação. Isolado do vírus, identificado por Pio-Ribeiro et al. (1988), foi obtido do Laboratório de Virologia Vegetal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e multiplicado em caupi cv. California Blackeye. O método e a época de inoculação seguiram metodologia modificada de Lima, Santos e Silveira (1986), consistindo na maceração de tecido foliar sistematicamente infectado, na proporção de 1g para 19ml de tampão fosfato 0,01M pH 7,0 acrescido de 1% de celite. As inoculações foram realizadas nove e dez dias após a semeadura em condições de campo e casa-de-vegetação, respectivamente.

Em área experimental da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agrope-

cuária (IPA), em Serra Talhada-PE, foram plantadas 400 sementes de cada cultivar, em covas espaçadas de 0,80 x 0,40 m, com bordadura física de 2,00 m entre os tratamentos. De cada cultivar, tomou-se três fileiras de 25 covas cada uma e as plantas inoculadas mecanicamente com CpSMV. Igual número de fileiras com nove covas cada uma, constituiu o tratamento testemunha. Semanalmente todos os tratamentos foram pulverizados com monocrotofós para prevenir a ação de vetores de vírus.

Em casa-de-vegetação do Departamento de Agronomia da UFRPE, foram obtidas 120 plantas de cada cultivar, em 40 vasos plásticos contendo solo esterilizado por brometo de metila, sendo 90 destinadas à inoculação do CpSMV e 30 conservadas livres do vírus, constituindo-se no tratamento testemunha.

As sementes beneficiadas de cada tratamento foram analisadas quanto a presença de alterações externas, em seguida postas em sacos plásticos e armazenadas em geladeira.

Sorologia

De cada cultivar tomaram-se 1.000 sementes, sendo, quando possível, a metade exibindo alterações externas. Após desinfestação com hipoclorito de sódio na proporção de 1:9 (v/v) durante 10 min e lavagem em água destilada, grupos de 40 sementes foram colocadas entre duas folhas de papel toalha (Inds. de Papéis Indepen. S/A) formato 20x27cm, previamente umedecidas em água destilada. Estes conjuntos, em forma de cartucho, foram colocados verticalmente em bécher de 500 ml contendo lâmina de 2 cm de água. Bécheres com cinco cartuchos foram incubados em ambiente escuro a aproximadamente 30°C. Como antígenos, foram utilizados extratos de hipocótilos de duas plântulas originárias de sementes produzidas por plantas infectadas pelo CpSMV. Os hipocótilos foram cortados com auxílio de bisturi esterilizado, em seguida macerados na proporção de 1g para 1ml de água destilada. Como controle usou-se num dos orifícios periféricos extrato de tecido foliar infectado juntamente com hipocótilo de plântula sabidamente sadia, macerados na presença de água destilada na proporção de 1:1:2 (m/m/v). Em outro orifício foi utilizado extrato de hipocótilos de duas plântulas sadias.

Placas de Petri plásticas com 9 cm de diâmetro receberam, aproximadamente, 15ml de meio de ágar preparado em água destilada com 0,70% de ágar (Agar Brasileiro Indústria e Comércio Ltda.), 0,85% de cloreto de sódio (Reagen) e 0,05% de azida de sódio (J. T. Baker). Com furador de rolha de 5mm de diâmetro foram feitos sete conjuntos, cada um formado por um orifício central, circundado por seis outros equidistantes daquele e espaçados em 4mm, obedecendo a um arranjo hexagonal. No orifício central colocou-se anti-soro específico para

CpSMV diluição 1:10, e nos externos os antígenos. O anti-soro foi produzido no Laboratório de Virologia Vegetal da Universidade Federal do Ceará (UFCE). As placas de Petri assim preparadas foram incubadas por 96 horas em câmara à aproximadamente 30°C e posteriormente avaliadas.

Infectividade

Grupos formados por cinco sementes de cada uma das cvs. Carrapicho e Seridó foram divididos em tegumento, cotilédones e eixo embrionário e macecados separadamente na presença de tampão fosfato proporção 1:1 (m/v) e celite a 1%. Extrato de cada grupo foi inoculado em plantas jovens de caupi (seis a oito dias da semeadura) cv. Sempre Verde, envasada em solo esterilizado e originadas de sementes produzidas em condições controladas. Adotou-se metodologia de Lima, Santos e Silveira (1986), tendo o período de observação modificado para 20 dias, sob condições de casa-de-vegetação.

Plantio Direto

De cada uma das cvs. Carrapicho e Seridó, tomaram-se ao acaso 500 sementes, produzidas por plantas infectadas artificialmente em condições de campo. Estas sementes foram postas a germinar em vasos plásticos contendo solo esterilizado por brometo de metila. Cada vaso recebeu seis sementes e foram mantidos em casa-de-vegetação por 30 dias, período em que procedeu-se inspeção visual visando detecção de sintoma externo de infecção viral. Ao final deste período 10% do total de 897 plantas, tomados ao acaso, foram testados sorologicamente com anti-soro para CpSMV, através de dupla difusão em ágar.

RESULTADOS

Como provável sintoma de infecção viral, observaram-se em algumas sementes de várias cultivares, manchas estriadas de cor marrom, cuja intensidade variou com a cultivar e o local de produção. As percentagens de sementes com manchas são apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1 - Percentagens de sementes de caupi, *Vigna unguiculata*, com presença de manchas, produzidas em condições de casa-de-vegetação e de campo.

Cultivar	% de sementes com manchas			
	Casa-de-vegetação		Campo	
	I	S	I	S
Br 1-Poty	100	2,2	-1/	-1/
Carrapicho	100	66,7	100	0
Pitiduba	100	3,3	0	0
Sempre Verde	100	71,2	0	0
Seridó	2,7	3,8	7	0,3
TVu 2331	0	0	0	0

I = Colhidas de plantas infectadas pelo CpSMV

S = Colhidas de plantas sadias

1/ Não houve produção.

Os resultados dos testes sorológicos de dupla difusão em ágar, realizados com 11.120 sementes produzidas por caupi infectado artificialmente em condições de campo e casa-de-vegetação, não apresentaram qualquer reação específica entre anti-soro específico para CpSMV e os antígenos formados por pares de hipocótilos. Entre os controles observou-se reação apenas naquele formado por tecido foliar infectado pelo CpSMV + hipocótilo de semente sadia na proporção de 1:1 (m/m).

Das 800 sementes de caupi utilizadas no teste de infectividade com tegumento, cotilédone e eixo embrionário, nenhuma revelou a presença de CpSMV em qualquer das partes. Experimentos preliminares revelaram a eficiência deste teste na proporção de até uma parte de tecido foliar infectado para oito partes de tegumento, cotilédone ou eixo embrionário de sementes produzidas por plantas comprovadamente sadias.

Do total de 897 plantas observadas, nenhuma apresentou sintoma externo de infecção por vírus, pelo método de plantio direto. Destas, 90 foram testadas contra anti-soro específico para CpSMV, através da dupla difusão em ágar, tendo apresentado resultado negativo em sua totalidade.

DISCUSSÃO

Os resultados sorológicos obtidos neste estudo confirmam a não transmissibilidade do CpSMV de sementes de caupi, estando de acordo com observações realizadas por Costa et al. (1969), Vital et al. (1969), Silveira (1987), Lima, Silveira e Oliveira (1989) e Rios e Neves (1989). O teste sorológico de dupla difusão em ágar, introduzido na Virologia Vegetal em 1955 e revisto por vários virologistas (Noordan, 1973) tem sido utilizado com muita frequência na diagnose de viroses, sendo eficiente na detecção de partículas virais em sementes de leguminosas (Lima e Purcifull, 1979, 1980; Silveira, 1987; Lima, Silveira e Oliveira, 1989).

As observações obtidas neste estudo através do método de infectividade de cada constituinte da semente de caupi reforçam a não transmissibilidade do CpSMV, mostrando que em sementes secas não ocorre infecção do tipo não embrionária, em que pese a maior frequência de alteração no aspecto do tegumento naquelas originárias de plantas infectadas. Vários pesquisadores fizeram uso deste método, obtendo resultados válidos (Cheo, 1955; Shepherd, 1964; Ford, 1966; Maury et al., 1987), no entanto alguns ressaltam as suas limitações dada a utilização de inoculação em hospedeiro diferencial, podendo ocorrer partículas virais em concentração tão baixa que se torna indetectável (Medina e Grogan, 1961), o que pode ser superado pelo uso de microscopia eletrônica (Gold et al., 1954) ou outra técnica mais sensível.

Kiraly et al. (1974) afirmam que para testar a transmissão de vírus através de sementes não é necessário nenhum método especial: plântulas desenvolvidas de sementes infectadas podem ser testadas individualmente pela observação de sintomas, exigindo-se para tanto rigoroso controle do ambiente, no sentido de evitar infecção através de outros mecanismos, bem como utilização de 300 a 500 sementes de plantas infectadas. A eficácia deste método foi comprovada em vários estudos desta natureza (Gold et al., 1954; Couch, 1955; Ford, 1966; Gay, 1969; Silveira, 1987; Lima, Silveira e Oliveira, 1989). Assim os dados obtidos nesta etapa auxiliam na conclusão a propósito da não transmissibilidade do CpSMV através de sementes de caupi. Algumas hipóteses tentam explicar a falha de transmissibilidade de vírus por sementes de plantas infectadas, particularmente naquelas em que se observa o vírus na fase imatura e que deixam de existir após processo de maturação e secagem das mesmas (Cheo, 1955; Couch, 1955; Medina e Grogan, 1961; Shepherd, 1964; Fulton, 1964; Ford, 1966; Gay, 1969; Kiraly et al., 1974; Neegaard, 1977; Bos, 1983).

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the possibility of transmission of cowpea severe mosaic

comovirus through of seed of from artificially infected plants of six *Vigna unguiculata* cultivars obtained from infected plants grown field and greenhouse conditions. An amount 12,817 seeds were tested by serologic, infectivity and growing-on methods. The serologic test was made by using a pair of hypocotils obtained from seeds of BR 1-Poty, Carrapicho, Pitiuba, Sempre Verde, Serido, and TVu 2331 cowpea cultivars, germinated on towel-paper. A total of 11,120 seeds were tested with specific antiserum to CpSMV by double immunodiffusion test. The infectivity test was realized with 800 seeds from Carrapicho and Serido cultivars, with were dissected in tegument, cotyledon and embryonic axis. Extract of five unit of each seed-part was inoculated in cowpea seedlings Sempre Verde cultivar. The inoculated plants were maintained under greenhouse conditions and observed during 20 days. For growing-on method 1,000 seeds of Carrapicho and Serido cultivars obtained from artificially infected plants produced under field conditions were sowed in plastic pots containing sterilized soil under greenhouse conditions and the plants were observed for 30 days. One out of ten plants were tested by serology with specific antiserum to CpSMV. Were observed the occurrence of spotted seeds tegument in some cowpea cultivars. Although the tegument alterations, the virus presence was not detected in several mature seeds, indicating the CpSMV is not transmitted through cowpea seed.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALCONERO, R.; SANTIAGO, A. *Phaseolus lathyroides* as a reservoir of cowpea mosaic virus in Puerto Rico. *Phytopathology*, St. Paul, v. 63, n. 1, p. 120-123, Jan. 1973.
- 2 ASSIS FILHO, F. M.; LIMA, J. A. A.; PIO-RIBEIRO, G. et al. Estudo sobre a transmissibilidade do vírus do mosaico severo do caupi através de sementes de diferentes cultivares em condições de campo e de casa-de-vegetação. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE CAUPI, 3., 1991, Fortaleza. *Resumos...* Fortaleza : Universidade Federal do Ceará, 1991. p. 44.
- 3 BOS, L. *Introduction to plant virology*. London : Macmillan Press, 1983. 160 p.
- 4 BOSWELL, K. F.; GIBBS, A. J. *Viruses of legumes: descriptions and key from virus identifications and data exchange*. Camberra : Australian National University, 1983. 139 p.
- 5 CHEO, P. C. Effect of seed maturation on inhibition of Southern bean mosaic virus in bean. *Phytopathology*, St. Paul, v. 45, n. 1, p. 17-21, Jan. 1955.
- 6 COSTA, A. S.; OLIVEIRA, A. R.; KITAJIMA, E. W. et al. Ocorrência do mosaico do feijão macassar em São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia*, Campinas, v. 3, p. 56-57, 1969.
- 7 COUCH, H. B. Studies on seed transmission of lettuce mosaic virus. *Phytopathology*, St. Paul, v. 45, n. 2, p. 63-70, Feb. 1955.
- 8 FORD, R. E. Recovery of pea streak virus from pea seed parts and its transmission by immature seed. *Phytopathology*, St. Paul, v. 56, n. 7, p. 855-859, July, 1966.
- 9 FULTON, J. P.; SCOTT, H. A. A serogrouping concept for legume comovirus. *Phytopathology*, St. Paul, v. 69, n. 4, p. 305-306, Apr. 1979.
- 10 FULTON, R. W. Transmission of plant viruses by grafting, dodder, seed, and mechanical inoculation. In: CORBETT, M. K.; SISLER, H. D. (Ed.) *Plant virology*. Gainesville : University of Florida Press, 1964. p. 39-67.

- 11 GAY, J. D. Effect of seed maturation on the infectivity of cowpea chlorotic mottle virus. *Phytopathology*, St. Paul, v. 59, n. 6, p. 802-804, June, 1969.
- 12 GOLD, A. H.; SUNESON, C. A.; HOUSTON, B. R. et al. Electron microscopy and seed and pollen transmission of rod-shaped particles associated with the false stripe virus disease of barley. *Phytopathology*, St. Paul, v. 44, n. 3, p. 115-117, Mar. 1954.
- 13 GONÇALVES, M. F. B. *Purificação sorológica de duas raças de "cowpea severe mosaic virus" isoladas no Ceará e no Piauí e avaliação de seus efeitos em feijão-de-corda*. Fortaleza, 1983. 57 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Ceará, 1983.
- 14 HAQUE, S. Q.; PERSAD, G. C. Some observations on the seed-transmission of beetles-transmitted cowpea mosaic virus. In: BIRD, J.; MARAMOROSCH, K. (Ed.). *Tropical diseases of legumes*. New York: Academic Press, 1975. p. 119-121.
- 15 JAGER, C. P. *Cowpea severe mosaic virus*. Wales: Commonwealth Micological Institute, 1979. (CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, 209).
- 16 KIRALY, Z.; KLEMENT, Z.; SOLYMOSY, B. et al. *Methods in Plant pathology: with special reference to breeding for disease resistance*. Budapest: Elsevier Scientific, 1974. pt. 1, p. 19-113: Virology.
- 17 LIMA, J. A. A.; NELSON, M. R. Etiology and epidemiology mosaic of cowpea in Ceará, Brasil. *Plant Disease Report*, Beltsville, v. 61, n. 3, p. 864-867, 1977.
- 18 —; PURCIFULL, D. E. Immunochemical and microscopical techniques for detecting blackeye cowpea mosaic and soybean mosaic viruses in hypocotyls of germinated seed. *Phytopathology*, St. Paul, v. 70, n. 2, p. 142-147, Feb. 1980.
- 19 —; —. Técnicas sorológicas de simples difusão em agar e de microscopia eletrônica para identificação de vírus do caupi. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 4, n. 2, p. 299-308, jun. 1979.
- 20 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. Pitiuba. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 8, p. 619, 1983. Resumo.
- 21 —; 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*, Brasília, v. 11, n. 1, p. 151-161, mar. 1986.
- 22 —; SILVEIRA, L. F. S.; OLIVEIRA, J. P. Não transmissibilidade de "cowpea severe mosaic virus" por sementes de *Vigna unguiculata* cvs. Pitiúba e Seridó. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 14, n. 1, p. 50-54, abr. 1989.
- 23 MAURY, Y.; BOSSENEC, J. M.; BAUDAZIN, G. et al. Factors influencing ELISA evaluation of transmission of pea seed-borne mosaic virus in infected pea seed-group size and decortication. *Agronomie*, Versailles, v. 7, p. 225-250, 1987. Abstract.
- 24 MEDINA, A. C.; GROGAN, R. G. Seed transmission of bean mosaic viruses. *Phytopathology*, St. Paul, v. 51, n. 7, p. 452-456, July, 1961.

- 25 NEEGAARD, P. *Seed pathology*. London : Macmillan Press, 1977. v. 1, p. 71-177: Seed-borne viruses.
- 26 NOORDAN, D. *Identification of plant viruses: methods experiments*. Wageningen : Center for Agricultural Publishing and Documentation, 1973. 206 p.
- 27 PEREZ, J. E.; CORTES-MONLLOR, A. A mosaic virus cowpea from Puerto Rico. *Plant Disease Report*, Beltsville, v. 54, n. 3, p. 212-216, 1970.
- 28 PIO-RIBEIRO, G.; LIMA, J. A. A.; ROCHA, M. C. S. et al. Isolados de vírus obtidos de caupi (*Vigna unguiculata*) em Pernambuco. *Filopatologia Brasileira*, Brasília, v. 13, n. 2, p. 139, 1988. Resumo.
- 29 RIOS, G. P.; NEVES, B. P. das. Dispersão do vírus do mosaico severo do caupi. *Filopatologia Brasileira*, Brasília, v. 14, n. 1, p. 20-25, abr. 1989.
- 30 SANTOS, A. S. dos. Transmissão de vírus através de sementes de caupi (*Vigna unguiculata*) no Estado do Piauí. *Filopatologia Brasileira*, Brasília, v. 11, n. 2, p. 287, jun. 1986. Resumo, 11.
- 31 SHEPHERD, R. J. Properties of a mosaic virus of cowpea and its relationship to the bean pod mottle virus. *Phytopathology*, St. Paul, v. 54, p. 466-473, 1964.
- 32 SILVEIRA, L. F. S. *Estudo sobre a transmissibilidade de virus por sementes de feijão-de-corda, Vigna unguiculata (L.) Walp. e de leguminosas nativas da região Nordeste*. Fortaleza, 1987. 56 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Ceará, 1987.
- 33 VITAL, A. F.; LORETO, T. J. G.; LIMA, J. A. et al. Mosaicos dos feijões macassar - *Vigna unguiculata* em Pernambuco. *Revista Brasileira de Filopatologia*, Brasília, v. 3, n. 14, p. 43-44, 1969.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Eduardo Henrique de Albuquerque Maranhão, pesquisador do Instituto de Pesquisa Agropecuária (IPA), pela colaboração nos trabalhos de campo.

Recebido para publicação em 15 de julho de 1992