

Propriedades biológicas e intrínsecas de um isolado de "*Cowpea aphid-borne mosaic virus*" obtido em Pernambuco e reação de genótipos de caupi

Eneida Soriano ILARRÁZ¹; Gilvan PIO-RIBEIRO²; José Albérico de Araújo LIMA³; Francisco Miguel de ASSIS FILHO⁴; Genira Pereira de ANDRADE⁵; Cristiane Domingos da PAZ⁶

RESUMO - Um isolado viral obtido de caupi (*Vigna unguiculata* subsp. *unguiculata*) em Pernambuco induziu a formação de lesões locais em *Chenopodium amaranticolor* e *C. quinoa*; lesões locais e mosaico em *Cassia obtusifolia*; mosaico em *Macroptilium lathyroides* e *Nicotiana benthamiana* e diferentes sintomas locais e sistêmicos em 53 dos 55 genótipos de caupi estudados. Foram observados valores entre 60 e 65°C para o ponto de inativação térmica; 2 a 3 dias para longevidade *in vitro* e 10⁴ a 10⁵ para o ponto máximo de diluição. *Aphis gossypii* e *Toxoptera citricidus* transmitiram o vírus de caupi para caupi. Não se verificou transmissão por sementes ao se analisar 1200 plantas de caupi, oriundas de sementes de plantas infectadas. Uma preparação purificada apresentou A₂₆₀/A₂₈₀ igual a 1,3 e permitiu estimar, por eletroforese, o peso molecular da capa protéica em 33kDa. Inclusões citoplasmáticas típicas do gênero *Potyvirus* foram observadas aos microscópios ótico e eletrônico. Partículas filamentosas e flexuosas, medindo aproximadamente 760nm foram visualizadas em preparações "leaf dip", vírus purificado e pelo uso da imunoeletromicroscopia. O isolado viral reagiu em ELISA indireto com antissoro contra o "blackeye cowpea mosaic virus", atualmente considerado uma estirpe do "*Bean common mosaic virus*"- BCMV-BI; mostrou-se idêntico a um potyvirus isolado de gergelim no Ceará por dupla difusão em ágar; reagiu com o conjunto de anticorpos policlonal H4 e monoclonal 5H5, específico para o "*Cowpea aphid-borne mosaic virus*" e não com o conjunto H3 e 6C12 para o BCMV-BI, em teste "triple antibody sandwich" ELISA, definindo assim a identidade viral.

Palavras chave: *Potyvirus*, feijão-de-corda, *Vigna unguiculata*

INTRODUÇÃO

Os agentes de doenças são apontados como fatores importantes que limitam a produção do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. subsp. *unguiculata*) no Brasil (Araújo, 1988), incluindo vírus pertencentes a diversos gêneros (Lima & Santos, 1988). O vírus do mosaico do caupi transmitido por afídios, ("*Cowpea aphid-borne mosaic virus*")-CABMV, é considerado como um dos principais patógenos da cultura por sua difusão generalizada e indução de perdas de produção. Este vírus é transmitido por inoculação mecânica, afídeos, enxertia e através de sementes (Bock & Conti, 1974).

Segundo Lima *et al.* (1979), o CABMV é sorologicamente relacionado, mas não idêntico ao vírus do mosaico do caupi blackeye, ("*Blackeye cowpea mosaic virus*") (Purcifil & Gonsalves, 1983), taxonomicamente reconhecido como uma estirpe do vírus do mosaico comum do feijoeiro ("*Bean common mosaic virus*"-BCMV-BI). Ao analisar diferentes isolados de CABMV e BCMV-BI, Dijkstra *et al.* (1987) consideraram ambos como estirpes de um mesmo vírus. Posteriormente, Huguenot *et al.* (1993 e 1994) mostraram diferenças de identidade entre os potyvirus isolados de caupi, distinguindo-se dois subgrupos, correspondentes ao BCMV-BI e CABMV.

No Brasil, já foram isolados cinco potyvirus no caupi, embora ainda perdure controvérsias quanto serem fitovirus distintos ou estirpes virais (Vieira *et al.*, 1987). Neste trabalho foram utilizadas técnicas biológicas, sorológicas e de microscopia ótica e eletrônica, visando identificar e caracterizar um potyvirus obtido de caupi no

Estado de Pernambuco e determinar a reação de genótipos de caupi a este isolado viral.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento, purificação biológica e manutenção do vírus - Amostras foliares de caupi cv. CNCx 252-1E com sintomas virais, procedentes de área experimental da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA, foram inoculadas mecanicamente em *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn., com tampão fosfato de potássio 0,05M, pH 7,0 contendo 0,1% de Na₂SO₃, obtendo-se grande número de lesões locais necróticas e cloróticas. Inóculos preparados com tecidos de lesões individualizadas e aplicados em caupi desenvolveram infecções sistêmicas, permitindo a obtenção de isolados biologicamente puros, dos quais um foi mantido em casa de vegetação, por sucessivas inoculações mecânicas em plantas de caupi e em laboratório, através de tecido dessecado com CaCl₂ e armazenado a 4°C.

Detecção sorológica do vírus - A presença viral em materiais vegetais usados nas diferentes etapas da pesquisa foi verificada através do teste "enzyme-linked immunosorbent assay" - ELISA indireto, utilizando-se antissoro policlonal contra o BCMV-BI, produzido na University of Georgia - UGA, Estados Unidos. Extratos na concentração 1:10 (p/v), obtidos pela maceração de amostras foliares em tampão de extração (carbonato), foram colocados nos poços de placas de microtitulação, as quais, após incubação a 37°C

¹Bolsita de Aperfeiçoamento - CNPq

²Prof. Adjunto - Deptº de Agronomia/UFRPE

³Prof. Adjunto - Deptº de Fitotecnia/UFC

⁴Eng. Agrônomo - Deptº de Agronomia/UFRPE

⁵Bióloga (Apoio Téc. à Pesquisa)- Deptº de Agronomia/UFRPE

⁶Prof. Assistente - Deptº de Tecnol. e Ciências Sociais III/UNEB

por 60 minutos e três lavagens com PBS-Tween, foram tratadas com o antissoro na diluição de 1:1000 (v/v) absorvido em extrato de tecido foliar sadio, preparado na concentração de 1:20 (p/v) com tampão de conjugado (PBS-Tween, PVP-40, ovalbumina e DIECA). Depois de incubadas e lavadas, as placas foram cobertas com um conjugado de fosfatase alcalina com anti-IgG de coelho, obtido de cabra, (GAR-AP) e submetidas aos mesmos procedimentos de incubação e lavagens anteriores. Para o desenvolvimento da reação imunoenzimática, utilizou-se o substrato p-nitrofenil fosfato de sódio (pNPP) a 1mg/mL em tampão de substrato (dietanolamina), a qual foi avaliada com auxílio de um leitor de ELISA, ajustado para o comprimento de onda 405nm, sendo considerados positivos os valores acima de duas vezes a média da absorção dos controles negativos.

Análise das propriedades biológicas

Gama de hospedeiros e reações de genótipos de caupi - Tomando-se como base o calendário de plantio sugerido por Noordam (1973) para inoculação conjunta das diferentes espécies indicadoras, foram utilizadas plantas pertencentes às seguintes famílias: Chenopodiaceae (*C. amaranticolor*, *C. quinoa* Willd. e *C. murale* L.), Cucurbitaceae (*Cucumis pepo* L. cv. Caserta e *Cucumis sativus* L.); Leguminosae (*Arachis hypogaea* L., *C. obtusifolia*, *C. occidentalis* L., *M. lathyroides* Urb. e *V. unguiculata* subsp. *unguiculata*), Solanaceae (*Datura metel*, *D. stramonium* (L.) Mill., *Lycopersicon esculentum* Mill., *Nicotiana benthamiana* Domin., *N. clevelandii* A. Gray, *N. debneyii* Domin., *N. glutinosa* L., *N. rustica* L., *N. tabacum* L. cv. Samsun NN, *Physalis floridana* Rydb. e *P. virginiana* Mill.). Na avaliação de germoplasma de caupi foram testados 55 genótipos. As leituras sintomatológicas foram feitas durante um mês, num intervalo de cinco dias e a ocorrência de infecções local e sistêmica verificada por ELISA indireto.

Transmissão por afídeos - Adultos ápteros, não virulíferos, das espécies *Aphis gossypii* Glov. e *Toxoptera citricidus* Kirk, após jejuar por duas horas, tiveram acesso a plantas de caupi infectadas, por um a dois minutos, e foram transferidos para plantas de caupi sadias (10 plantas/espécie de afídeos/cinco insetos/planta), onde permaneceram por 24h. Para cada espécie de afídeo, utilizou-se controle negativo, constituído de cinco plantas, nas quais foram depositados insetos que tiveram acesso a caupi sadio. Realizaram-se leituras semanais de sintomas e um teste sorológico no final do período.

Transmissão por sementes - Plantas de caupi cvs. CNCx 252-1E e Clay foram inoculadas com o isolado viral e mantidas em casa de vegetação. Das sementes colhidas, obtiveram-se 1000 plantas de CNCx 252-1E e 200 de Clay. Após 28 dias de observação, 180 plantas, escolhidas ao acaso, foram analisadas através do teste ELISA indireto.

Estabilidade em extrato vegetal - Extratos de folhas infectadas de caupi foram utilizados nos testes de inativação térmica (PIT), longevidade *in vitro* (LIV) e ponto máximo de diluição (PMD), de acordo com Noordam (1973). Cada tratamento compreendeu 10 plantas-teste de caupi cv. Clay polvilhadas com Carborundum, as quais foram inoculadas com o respectivo extrato acrescido de Celite a 1% e cada controle negativo consistiu de cinco plantas tratadas com o tampão e abrasivos. A determinação do PIT foi realizada com tubos de ensaio de parede fina, contendo 3mL de extrato e imersos até o nível de 6cm por 10 minutos em banho-maria nas temperaturas 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 e 75°C, sendo, em seguida, resfriados em banho de gelo e seu conteúdo inoculado. Para o LIV, 10 tubos de ensaio, com 5mL de extrato cada, foram tampados, armazenados em condição de laboratório (22 - 26°C) e diariamente, inoculado o conteúdo de um tubo, durante 10 dias. Para o PMD, extratos nas diluições de 10⁻¹ a 10⁻⁵ foram inoculados. Analisaram-se sintomatologicamente as plantas-teste durante um mês e aquelas que não exibiram sintomas foram testadas por ELISA indireto.

Análise das propriedades intrínsecas

Purificação e espectrofotometria Utilizando-se o método de precipitação com polietileno glicol (PEG) e de clarificação com n-butanol, descrito por Lima *et al.* (1979), folhas infectadas de caupi, coletadas aos 18 dias após a inoculação, foram processadas através das seguintes etapas de purificação: extração com tampão fosfato 0,5M pH 7,5 contendo 0,1% de Na₂SO₃ na proporção 1:2 (p/v); clarificação com 8% n-butanol em agitação lenta "overnight" a 4°C e centrifugação a 4.000g por 10 min; precipitação com 8% de PEG, 3% Triton X-100 e NaCl a 0,1M e centrifugação a 10.000g durante 30 minutos; ressuspensão em tampão fosfato 0,05M, pH 8,2, contendo sacarose a 5% e ultracentrifugação a 85.000g por 1h e 40 minutos; ressuspensão em tampão fosfato 0,05M, pH 8,2 e centrifugação em gradiente de densidade a 125.000g por 18h, rotor SW 41T1 com 30% de CsCl. A banda viral localizada a 3cm da base do tubo foi coletada, diluída em tampão fosfato 0,05 M, pH 8,2 e centrifugada a 25.000g por 1h e 40min. O vírus

foi ressuspendido em tampão Tris 0,02M, pH 8,2 e centrifugado a 10.000g por 10 min. O grau de pureza e concentração viral foram avaliados mediante microscopia eletrônica e espectrofotometria, analisando-se o espectro de absorção da preparação viral entre 220 a 300nm.

Eletroforese da proteína capsidial - Utilizou-se gel de poliacrilamida 12% na presença de dodecil sulfato de sódio - SDS-PAGE, num sistema descontínuo de gel concentrador de poliacrilamida 5% em tampão tris-glicina, pH 6,8 com SDS, segundo Lima *et al.* (1993). A amostra protéica foi obtida a partir de 50 μ L de uma preparação viral purificada, ajustada para 1mg/mL, por adição de igual volume de tampão de amostra 2X (Tris-HCL 100mM, pH 6,8; SDS 4% (v/v); 2-mercaptoetanol 4% (v/v); glicerol 20% (v/v); azul de bromofenol 0,2% (p/v), aquecimento a 100°C durante três minutos, resfriamento em água corrente e centrifugação a 3.000g por dois minutos. Alíquotas de 5 μ L, 10 μ L e 15 μ L foram submetidas a eletroforese, desenvolvida à temperatura ambiente sob voltagem constante de 140 W por 2h, juntamente com os seguintes padrões de massa molecular e respectivos valores em kDa: albumina de soro bovino (63), ovalbumina (45), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36), anidrase carbônica (29), tripsinogênio (24) e inibidor da tripsina (20). O gel foi corado em solução de "comasie blue" - SIGMA, metanol 45% e ácido acético glacial 10%, durante 2h e o excesso de corante removido com a solução metanol 30% e ácido acético 7%. O peso molecular da proteína capsidial foi estimado a partir dos dados referentes a migração dos padrões de proteína, transferidos para papel monolog.

Inclusões virais - Para observações citopatológicas ao microscópio ótico, fragmentos da epiderme foliar de caupi cv. Clay foram corados numa mistura de "Luxol" Verde Brilhante e Calcomina Laranja (Christie & Edwardson, 1986). O excesso do corante foi retirado com álcool absoluto e os fragmentos montados em lâminas com euparal. Para o microscópio eletrônico, utilizou-se a metodologia descrita em Souto & Kitajima (1992). Tecido foliar de caupi infectado cv. Campeão foi cortado em pedaços de 1-2mm, colocado em paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2% e tampão cacodilato 0,05M, pH 7,2. Os pedaços de tecidos foram fixados em tetróxido de ósmio, desidratados em série crescentes de acetona e emblocados em meio de Spurr. Os cortes foram efetuados em ultramicrotomo Ultracut E Reichert-Jung Super Nova, contrastados com acetato de uranila e

citrato de chumbo e observados ao microscópio eletrônico JEOL JEM 100.

Partículas virais - Utilizando-se telinhas de cobre previamente cobertas com uma película de formvar-reforçada com carbono diferente métodos e amostras virais foram empregados para a visualização das partículas: preparação purificada - as telinhas foram deixadas por cinco minutos sobre gotas da preparação viral diluída 1:1 (v/v) em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,4, contendo sacarose e NaCl (TSS) e postas a secar à temperatura ambiente; "Leaf dip" - as telinhas após terem sido depositadas por 5 min. em extrato foliar de caupi infectado, obtido na presença de tampão cacodilato, foram postas a secar à temperatura ambiente e a técnica de imunoeletromicroscopia - as telinhas foram colocadas sobre o antissoro homólogo, diluído 1:500 (v/v) em tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,2 (TRIS), incubadas em câmara úmida por 30 minutos, lavadas e depositadas em extrato foliar infectado, preparado com tampão TSS e incubadas por 2h em câmara úmida a 37°C. Após a passagem em 10 gotas de tampão TRIS e lavagem com água destilada, as telinhas foram secadas com papel de filtro. Para decoração das partículas, as telinhas foram tratadas novamente com antissoro antes da coloração. Em todos os casos, as preparações foram coradas negativamente com acetato de uranila 2%.

Sorologia

Produção de antissoro - No Laboratório de Virologia Vegetal da Universidade Federal do Ceará - UFC, um coelho de raça Nova Zelândia com seis meses de idade, recebeu três aplicações intramusculares, num intervalo de sete dias, de 0,6mL de uma emulsão preparada com a solução purificada do vírus e adjuvante incompleto de "Freund" em volumes iguais. Mediante cortes na veia marginal das orelhas do coelho, foram coletados semanalmente, alíquotas de 15-20mL de sangue, postos a coagular em banho-maria a 37°C por 45 min. O antissoro foi clarificado utilizando-se centrifugações a 4.000g e 10.000g, titulado através de dupla difusão em ágar e armazenado à temperatura de -20°C.

Teste de dupla difusão em ágar - A solução viral purificada foi testada sorologicamente com antissoro contra um potyvírus isolado de gergelim (poty-so) no Ceará. Utilizou-se uma placa de Petri com gel contendo ágar noble 0,8%, NaN₃ 1,0% e SDS 0,5%. O orifício central foi preenchido com antissoro e os da periferia com antígenos, tratados com SDS, um com a solução do vírus purificado e os outros com o

extrato de folhas infectadas com poty-so. A placa foi mantida em câmara úmida por 48h.

Testes imunoenzimáticos - Amostras de solução viral purificada e de tecido infectado foram testadas por ELISA indireto e pelo "triple antibody sandwich": - TAS-ELISA. No ELISA indireto foi usado o antissoro policlonal homólogo, e os antissoros contra o BCMV-BI, o vírus do mosaico do pepino "*Cucumber mosaic virus*"- CMV e o vírus do mosaico severo do caupi "*Cowpea severe mosaic virus*" - CPSMV obtidos da UGA e UFC, respectivamente. Empregou-se o conjugado GAR-AP e o substrato pNPP. No TAS-ELISA foram utilizados anticorpos policlonais (Ab^R) H_3 e H_4 e monoclonais (mAbs) 6C12 e 5H5 contra o BCMV-BI e o CABMV, respectivamente, produzidos na Agriculture Canada, Vancouver. Os anticorpos H_3 e H_4 atuaram como "armadilhas", e 6C12 e 5H5 como identificadores dos potyvírus. Para o desenvolvimento da reação imunoenzimática, empregou-se um conjugado de anti-IgG de rato, produzido em cabra, e fosfatase alcalina (GAR-AP) e o substrato pNPP. Antes da leitura final, as reações dos testes ELISA indireto e TAS-ELISA foram paralisadas com uma solução de NaOH 3M.

RESULTADOS E DICUSSÃO

Propriedades biológicas

Gama de hospedeiros e reações de genótipos de caupi - Nas diferentes espécies indicadoras foram observados os seguintes sintomas: lesões locais cloróticas (LLC) e lesões locais necróticas (LLN) em *C. amaranticolor* e *C. quinoa*; LLN e mosaico (Mo) em *C. obtusifolia*; Mo em *N. benthamiana* e *M. lathyroides*. As demais espécies não exibiram sintomas e reagiram negativamente em teste ELISA. Estas reações estão de acordo com aquelas mencionadas por Lovisolo & Conti (1978) e Boswell & Gibbs (1983) para o CABMV.

Os genótipos de caupi Tvu 612 e o V-53 Texas Cream 40 não apresentaram suscetibilidade. Nos demais observaram-se: clareamento das nervuras (CN) LLC, e Mo, em Boca de Moça, Boca Preta, California Blackeye, Campeão, Clay, CNC 0434, CNCx 372-4E/P, Lampião, Roxo Chumbo, Seridó, 136-006, 249-73G, 698-130F, 6000-1, 21007-A, 21009-A, 21010-A, 101000-1, L-21013-A; Mo em Alagoano, Baiano, Bengala, Boca de Ouro, Branquinho, Careta, CNCx 252-1E, Curu, Epace 10, Knuckle Purple Hull, Mississipi Silver, Novato, Rosinha, Sempre Verde e 36-05E; amarelecimento das folhas primárias (AMP), bolhosidade (B) e Mo em CNCx 105-06F, 158-

019G, 165-1G, 189-03G, 44-1E, 367-1E, 377-1E, 686-145G e 249-307F; LLC, CN, AMP, Mo em CNCx 249-68E, 249-62G, 249-308F, 149-09G e 149-06; CN e Mo em L-1044-1-1 e 21000-0080-1; LLC, LLN, CN e Mo em Manteiga e TVU 401; CN, Mo e B em CNCx 139-003.

Transmissão por afídeos e por sementes - A capacidade de transmissão do vírus pelos afídeos *A. gossypii* e *T. citricidus* foi comprovada através dos sintomas típicos de infecção observados em cerca de 80% de plantas inoculadas. Os resultados obtidos sobre a transmissão do vírus: de forma não persistente por afídeos são compatíveis com os apresentados por Bock & Conti, (1974).

Sob as condições em que o trabalho foi desenvolvido, não foi observada transmissão através de sementes das duas cultivares testadas. O fato do isolado de CABMV não ter sido transmitido através de sementes está perfeitamente de acordo com os dados apresentados por Purcifil & Gonçalves(1985), que se situa entre 0 a 3%. No Ceará, os baixos índices de transmissão do CABMV por semente de caupi têm sido, possivelmente, influenciado pela temperatura elevada durante o cultivo das plantas infectadas (Lima & Santos, 1988),

Estabilidade em extrato vegetal - O ponto de inativação térmica do vírus em extrato foliar de caupi ficou entre 55-65°C; o ponto máximo de diluição 10^{-4} - 10^{-5} e a longevidade *in vitro* 2-3 dias. A estabilidade do isolado viral encontra-se dentro dos padrões do gênero *Potyvirus*.

Propriedades Intrínsecas

Análise da preparação purificada - A presença do vírus na preparação purificada foi confirmada através de teste sorológico de dupla difusão em ágar, teste de infectividade em caupi cv. CNC 0434, e análise espectrofotométrica e microscopia eletrônica. A espectrofotometria revelou uma curva de absorção ultravioleta característica dos potyvírus, com pico no comprimento de onda 260nm e razão A_{260}/A_{280} de aproximadamente 1,3 (Figura 1). Considerando o coeficiente de extinção de valor de 2,4 (Lima *et al.*, 1979) estimou-se a concentração do vírus na preparação purificada em aproximadamente 1,0mg/mL e um rendimento de 1,63mg/100g de tecido de planta infectada.

Peso molecular da proteína do capsídio viral O valor foi estimado em 33kDa, o que está de acordo com as informações referentes aos potyvírus.

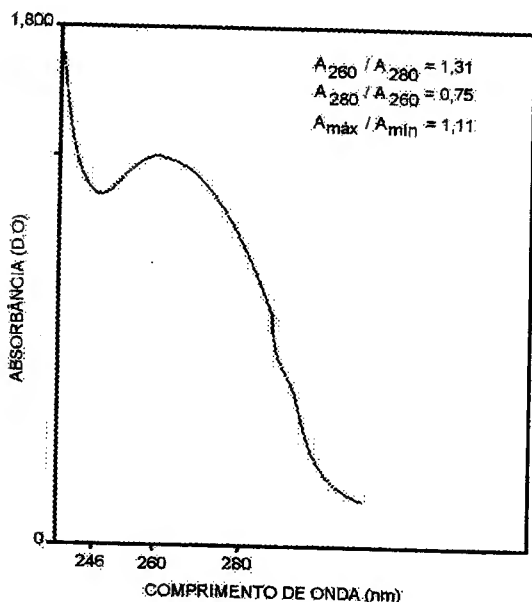


Figura 1 - Espectro de absorção ultra-violeta de preparação purificada do CABMV, purificado a partir do caupi.

Observações microscópicas - Foram detectadas inclusões citoplasmáticas cilíndricas e em forma de cata-vento, através dos microscópios ótico e eletrônico, respectivamente. Partículas virais alongadas e flexíveis com aproximadamente 760 nm de comprimento médio foram visualizadas ao microscópio eletrônico, através dos diferentes procedimentos utilizados. As estruturas observadas são típicas dos membros do gênero *Potyvirus* (Figura 2).

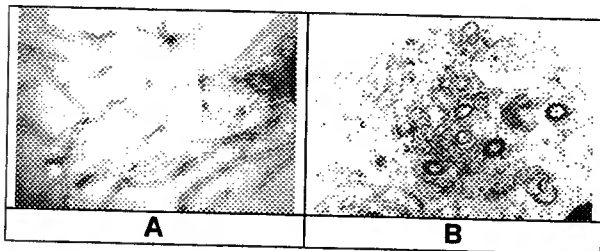


Figura 2 - A: Micrografia eletrônica de secção ultrafina de células do parênquima do mesófilo de caupi infectado pela CABMV, mostrando inclusões lamelares. B: Partículas alongadas do tipo *Potyvirus* em uma preparação purificada do CABMV, contrastada com acetato de uranila a 2%.

Análises sorológicas - Nos testes de dupla difusão em ágar o resultado mostrou que o isolado estudado é sorologicamente idêntico a um potyvírus obtido de gergelim (*Sesamum indicum* L.), que infecta caupi (Lima, *et al.*, 1991). No teste ELISA indireto, a amostra reagiu com o antissoro homólogo e o antissoro contra o BCMV-BI. Os valores obtidos no leitor de ELISA foram: 0,78 para o controle negativo e 1,37 para a amostra. O resultado permitiu concluir que o material estava infectado apenas por um vírus pertencente aos potyvirus e que é relacionado sorologicamente com o BCMV-BI.

No procedimento TAS-ELISA, envolvendo testes com anticorpos policlonais e monoclonais contra o BCMV-BI e o CABMV, as amostras apresentaram resultados nitidamente positivos para o conjunto de anticorpos contra o CABMV, decrescendo com a diluição do antígeno. Estes resultados permitiram a identificação do vírus como CABMV.

ABSTRACT

Biological and intrinsic properties of an "cowpea aphid-borne mosaic virus" isolate from Pernambuco State, and cowpea genotype reaction

A virus isolate from cowpea (*Vigna unguiculata* subsp. *unguiculata*) obtained from Pernambuco was characterized. In tests of host range and cowpea germplasm, the virus induced local lesions on *Chenopodium amaranticolor* and *C. quinoa*; local lesions and mosaic on *Cassia obtusifolia*; mosaic on *Macroptilium lathyroides* and *Nicotiana benthamiana*; and different local and systemic symptoms on 53 out of 55 cowpea genotypes. The infectivity in crude sap showed values between 60-65°C for the thermal inactivation point, 2 - 3 days for the longevity *in vitro* and 10^{-4} - 10^{-5} for the dilution end point. *Aphis gossypii* and *Toxoptera citricidus* were capable to transmit the virus from cowpea to cowpea plants. Seed transmission in cowpea was not detected by testing 1200 plants originated from seeds of infected plants. A virus purified preparation showed a ratio A_{260}/A_{280} of 1, 3, and permitted to estimate the M. W. of the coat protein as 33 kDa by electrophoresis. Cytoplasmatic inclusions typical to the Genus *Potyvirus* were detected in infected cowpea cells by optical and electronical microscopies. Electron microscopy, using purified virus preparation and infected plant extract by leaf dip and serologically specific electron microscopy, with and without decoration, showed elongate, flexuous particles with a average length of 760 nm. The cowpea virus isolate from Pernambuco reacted positively in indirect enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA with an antiserum from Georgia - USA against blackeye cowpea mosaic virus, now referred as a strain of *Bean common mosaic virus* - BCMV-BI; showed reaction of identity with an isolate of a sesame potyvirus from Ceará in agar double-diffusion test; and presented strong reaction with the set H4 polyclonal and 5H5 monoclonal antibodies specific for *Cowpea aphid-borne mosaic virus* - CABMV and no detectable reaction with the set H3 and 6C12 for BCMV-BI in triple antibody sandwich-ELISA, defining the virus identity.

Key words: Cowpea, *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, *Vigna unguiculata*

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Paulo Miranda da Empresa IPA pela coleta do material foliar infectado pelo potyvírus, e aos professores Izairas Pereira Padovan e Renato de Oliveira Resende dos laboratórios de Imunopatologia Keiso Asami - LIKA-UFPE, Pernambuco e de Virologia Vegetal da Universidade de Brasília, Distrito Federal, pelos trabalhos de microscopia eletrônica realizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ARAÚJO, J.P.P. Melhoramento do caupi no Brasil. In: ARAÚJO, J.P.P.; WATT, E.E. *O caupi no Brasil*. Brasília: IITA/EMBRAPA, 1988. p. 251-283.
- 2 BOCK, K.R.; CONTI, M. Cowpea aphid-borne mosaic virus N^o 134. In: *Descriptions of plant viruses*. Surrey: Commonw. Mycol. Inst., Assoc. Appl. Biol. Kew, 1974. 4p.

- 3
BOSWEL, K.L.; GIBBS, A.J. **Viruses of legumes: descriptions and key from virus identification and data exchange.** Camberra:Australia National University, 1983. 139p.
- 4
CHRISTIE, R.G.; EDWARDSON, J.R. Light microscopy techniques for detection of plant virus inclusions. **Plant Disease**, St. Paul, p. 273-279, 1986.
- 5
DIJKSTRA, J. et al. Identification of blackeye cowpea mosaic virus from germplasm of yard-long bean and from soybean, and the relationship between blackeye cowpea mosaic virus and cowpea aphid-borne mosaic virus. **Neth. Journal of Plant Pathology**, v.93, p.115-133, 1987.
- 6
HUGUENOT, C., FURNEAUX, M.T.; HAMILTON, R.I. Capsid protein properties of cowpea aphid-borne mosaic virus confirm the existence of two major subgroups of aphid-transmitted, legume-infecting potyviruses. **Journal of General Virology**, London, v.75, p.3555-3560, 1994.
- 7
HUGUENOT, C. et al. Evidence that cowpea aphid-borne mosaic potyvirus and blackeye are two different Potyviruses. **Journal of General Virology**, London, v.74, p.335-340, 1993.
- 8
LIMA, J.A.A.; ARARIPE, D.F.A.; GONÇALVES, M.F.B. Purificação, Produção de anti-soro específico e análise da proteína capsidial de um isolado de 'cowpea aphid-borne mosaic potyvirus'. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, p.338, 1993.
- 9
LIMA, J.A.A.; PURCIFULL, D.E.; HIEBERT, E. Purification, Partial Characterization and Serology of Blackeye Cowpea Mosaic Virus. **Phytopathology**, v.69, p.1252-1258, 1979.
- 10
LIMA, J.A.A.; SANTOS, A.A. Vírus que infectam o caupi no Brasil. In: ARAÚJO, J.P.P.; WATT, E.E. **O caupi no Brasil.** Brasília: IITA/EMBRAPA, 1988, p. 503-545.
- 11
LIMA, J.A.A.; SILVEIRA, L.F.S.; SANTOS, C.O.G. Infecção natural em gergelim ocasionada por um potyvirus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.16, p.60-62, 1991.
- 12
LOVISOLO, O.; CONTI, M. Identification of an aphid-transmitted mosaic virus. **Neth. Journal of Plant Pathology**, v.72, p.265-269, 1978.
- 13
NOORDAM, D. **Identification of plant viroses; methods; experiments.** Wageningen:Centre for agriculture publishing and documentation (PUDOC), 1973.
- 14
PURCIFULL, D.; GONSALVES, D. Blackeye cowpea mosaic virus N^o 302 In: **Descriptions of plant viruses.** Surrey:Commonw. Mycol. Inst. Assc. Appl. Biol. Kew, 1985. 3p.
- 15
SOUTO, E.R.; KITAJIMA, E.W. Purificação do vírus das manchas amarelas da Cassia, eletroforese de proteína e sorologia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.72, p.292-301, 1992.
- 16
VIEIRA, N.E.; RIOS, G.P.; WATT, E.E. Transmissibilidade de um isolado de vírus do caupi transmitido por afídeo "cowpea aphid-borne mosaic virus" pelas sementes. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DO CAUPI 2., 1987, Brasília. **Resumos...** Brasília: Embrapa-SPI, 1987.