

Contribuição para o estudo do Virus do Mosaico da Soja (*)

por

F. A. T. DE VASCONCELOS

Engenheiro Agrônomo

1. Introdução

O estudo dos Virus das Leguminosas necessita de maior cooperação internacional de maneira a poder fazer-se o inventário mundial, para o que se torna necessário o isolamento e caracterização dos vírus encontrados nas diversas regiões do globo a fim de poderem ser comparados.

No que diz respeito à Soja (*Glycine soja* (L.) Sieb. & Zucc.) há diversos vírus que podem causar enfermidades, quer por inoculações experimentais quer por infecções naturais no campo, estando provada para alguns a sua transmissibilidade à semente.

Nos campos de cultura de Soja, onde colhemos material só encontramos o *Virus do Mosaico da Soja* (Soybean mosaic virus, GARDNER & KENDRIK 1921).

As perdas de produção atribuídas a este vírus oscilam entre 30 e 75 % (KENDRIK & GARDNER, 1924). Se se considerar os valores que têm sido dados como percentagens de transmissão pela semente, ou seja, 13 % (GARDNER & KENDRIK, 1921), 10 a 25 % (KENDRICK & GARDNER, 1924), 40 % (HEINZE & KÖHLER, 1940) e 2 a 75 % (CONOVER, 1948), ainda mais evidente se torna a gravidade que representa para a cultura da soja.

(*) Trabalho concluído em Dezembro de 1961 e apresentado no Instituto Superior de Agronomia como Relatório Final do Curso de Engenheiro Agrônomo em 18 de Julho de 1962.

Todos os trabalhos que se conhecem sobre o Vírus do Mosaico da Soja focam, além destes pontos, a sintomatologia que origina, formas de transmissão e propriedades físicas do Vírus. No que diz respeito à produção de anti-soro e à observação de partículas ao Microscópio Electrónico, apenas conhecemos vagas referências que não envolvem purificação do vírus.

No presente trabalho efectuou-se a purificação do vírus a fim de preparar anti-soros específicos para aplicação em diagnóstico, tentou-se a transmissão mecânica do vírus a outras plantas onde também pudesse causar infecção sistémica, procurou-se ver a maior ou menor facilidade de transmissão por diversas espécies de afídeos já anteriormente ensaiadas ou não, fez-se um estudo pormenorizado da transmissão pela semente a fim de verificar se se notava qualquer relação entre o vírus e a localização da semente na vagem ou entre o vírus e a inserção da vagem no caule, determinou-se a percentagem de transmissão pela semente em algumas cultivares e pretendeu-se ainda, no que diz respeito a ensaios tendentes a dominar o vírus na cultura da soja, por um lado seleccionar cultivares resistentes observando o seu comportamento em relação à inoculação mecânica e por afídeos, por outro lado determinar a possível eficiência dos tratamentos térmicos aplicados às sementes para as libertar do vírus.

2. Revisão bibliográfica

O Mosaico da Soja considera-se citado pela primeira vez por CLINTON (1916) em Connecticut sob o nome de clorose ou enrugamento, o qual descreve pormenorizadamente os vários sintomas foliares. Encontrou a doença nas cultivares Medium Green, Wilson, Swan, Kentucky, Wing's, Mikado e Hollybrook e verificou que esta última era a mais susceptível. Também observou clorose mas sem enrugamento nas cultivares O'Kute, Itosan e Manhattan.

Em 1921, GARDNER & KENDRICK em West La Fayette, Indiana (U. S. A.), encontraram uma doença de mosaico típico num campo de soja «Hollybrook» e descreveram a sintomatologia. Observaram que as plantas doentes com mosaico permaneciam mais tempo verdes havendo assim um atraso na maturação e verificaram que a doença se transmitia pela semente, numa percentagem de 13 %.

Foram estes autores os primeiros que fizeram transmissões experimentais, provando assim tratar-se de uma virose, atribuindo ao agente causador a designação de Soybean Mosaic Virus. Obtiveram

para período de incubação, na soja, 13 dias mas não conseguiram transmitir o vírus a *Phaseolus vulgaris* L. e a *Vigna* sp. A existência de Jassídeos (Leafhoppers) na cultura de soja levaram os autores a tentar a transmissão com estes insectos, mas infrutiferamente.

KENDRICK & GARDNER em 1924 comunicam o resultado dos novos estudos que fizeram. Continuaram a não conseguir transmitir o Vírus do Mosaico da Soja a outras plantas além da soja, embora tivessem inoculado seis cultivares de *Phaseolus vulgaris* L., sete espécies do género *Phaseolus*, duas espécies do género *Dolichos*, *Pisum sativum* L. e *Vigna* sp. Encontraram no campo a doença em 25 cultivares considerando como mais susceptíveis «Midwest», «Haberlant» e «Black Eyebrow», e notaram que «Soysota» e «Virginia», mostraram uma tendência a escapar à infecção sob as condições de campo. Ainda os mesmos autores verificaram diferenças na transmissão pela semente de diferentes cultivares. Assim o vírus transmitiu-se em maior percentagem através das sementes da «Midwest», «Haberlandt», «Black Eyebrow», «A. K.» e «Arlington», do que através das sementes da «Feldun», «Manchu», «Lexington» e «Dunfield». Diferenças marcadas ocorreram em diversos anos nas percentagens de mosaico dentro da mesma cultivar. Não encontraram qualquer relação quanto à transmissão do Vírus do Mosaico da Soja e a localização da semente nas vagens doentes ou a época de infecção da planta.

DICKSON em 1924 faz referência pela primeira vez à presença do Mosaico da Soja em Quebec, no Canadá.

MURATA em 1925 registou a existência do Mosaico da Soja no Japão.

Em 1931, BAUDYS verificou na Checoslováquia a ocorrência duma doença que atacava a soja, caracterizada por uma forma severa de mosaico em que as plantas ficavam ananizadas, com várias deformações, manchamento das folhas, esterilidade, registando-se a morte prematura das plantas afectadas.

HANSFORD em 1934 descreveu uma doença severa de mosaico que atacava a soja no Uganda. As plantas apresentavam-se definhadas, com a folhagem espessa, enrugada e enrolada, mas sem qualquer diminuição na produção.

Verifica-se portanto que até 1935 todos os trabalhos referentes ao Mosaico da Soja nos diversos países se baseiam exclusivamente na sintomatologia e transmissão da doença pela semente ou por inoculação mecânica, com excepção duma tentativa infrutífera de transmissão por vectores biológicos.

Deve-se a PIERCE em 1935 o primeiro estudo das propriedades físicas do vírus. Ao fazer a identificação dalguns vírus que atacavam Leguminosas, baseada na sintomatologia em diversas espécies inclui o Vírus do Mosaico da Soja, que considerou específico à soja. Determinou para temperatura letal do Vírus do Mosaico da Soja, 58° C e para limite de longevidade «in vitro» 3 dias.

De 1935 a 1940 os trabalhos publicados voltam de novo a limitar-se à citação do aparecimento do Mosaico da Soja, caracterizando-o simplesmente a partir da sintomatologia.

Assim SĂVULESCU et al. em 1935 mencionaram a presença do Mosaico da Soja na Roménia. Em 1939 LINHEL, citou a existência do Mosaico da Soja na Suécia, onde a cultura se iniciava nessa altura. YU, no mesmo ano, englobou o Mosaico da Soja na lista de doenças importantes que ocorreram na província de SHANTUNG na China.

É em 1940 que surge na Alemanha da autoria de HEINZE & KÖHLER um estudo muito pormenorizado do Vírus do Mosaico da Soja em que se descreve pela primeira vez a transmissão por afídeos. Ensaíram oito espécies encontradas em campos de soja: *Doralis frangulae* Koch. (= *Aphis gossypii* Glover), *Doralis rhamnii* Boyer (= *Aphis nasturtii* Kalt.), *Doralis fabae* Scop. (= *Aphis fabae* Scop.), *Macrosiphon solanifolii* Ashm. (= *Macrosiphum euphorbiae* Thomas), *Aulacorthum pseudosolani* Theob. (= *Aulacorthum solani* Kalt.), *Myzus ornatus* Laing, *Myzodes persicae* Sulz. (= *Myzus persicae* Sulz.) e *Neomyzus circumflexus* Buckton. Todos se comportaram como vectores mas obtiveram os melhores resultados, quase 100 % de transmissão, com as espécies *Aulacorthum pseudosolani* e *Myzodes persicae*.

Os mesmos autores conseguiram ainda por inoculação mecânica passar o vírus pela primeira vez a feijão, *Phaseolus vulgaris* L. «Wachsdattel» em que os sintomas consistiam em necroses das nervuras nas folhas inoculadas. Recuperaram o vírus por inoculação mecânica retrógrada em soja, mas apenas a partir das folhas inoculadas. Obtiveram igualmente o vírus de *Vicia sativa* L. por inoculação retrógrada, mas também só a partir das folhas inoculadas.

No que diz respeito às propriedades físicas além do ponto térmico de inactivação e longevidade já anteriormente ensaiadas (PIERCE, 1935), fazem a determinação do limite de diluição e obtém 1:10 000. Verificaram também a transmissão pela semente e obtiveram 100 % de infecção em soja, por inoculação mecânica com auxílio de um abra-

sivo (carborundo). Atribuem às cultivares de sementes negras um pouco mais de tolerância.

A partir de então e até 1957, além duma simples referência devida a GRANCINI (1941), da existência do Vírus na Itália, há apenas o trabalho de CONOVER publicado em 1948, nos Estados Unidos, e em que apresenta um novo vector — *Macrosiphum pisi* Kalt. (= *Acyrtosiphon pisum* Harris). CONOVER confirma também a transmissão por *Myzus persicae* mas não a conseguiu com *Thrips tabaci* Lind. No que diz respeito a transmissão mecânica, verificou que o Vírus do Mosaico da Soja se comportou como específico à soja, pois só nesta planta obteve infecções sistêmicas e conseguiu recuperar o vírus, 23 a 27 dias após a inoculação, de três cultivares de feijão, *Phaseolus vulgaris* L. «Burpee's Stringless», «Stringless Green Pod», e «Stringless Green Refugee», mas apenas das folhas inoculadas. Observou igualmente a transmissão do Vírus do Mosaico da Soja pela semente da soja, e determinou as propriedades físicas do vírus. Notou também a influência da temperatura na manifestação de sintomas.

MATTHEWS (1957) no seu livro *Plant Virus Serology* inclui o Vírus do Mosaico da Soja, sozinho, no Grupo 13 da Tabela de Grupos Serológicos de Vírus, mas indica ter sido obtido o soro a partir de extracto de folhas frescas de sojas infectadas, conforme comunicação pessoal que lhe foi dada por WATSON.

A primeira indicação de aplicação de Microscopia Electrónica é-nos dada em 1959 por BRANDES & WETTER. Ao classificarem os vírus das plantas com base na morfologia das partículas englobaram o Vírus do Mosaico da Soja no Grupo 11 ou seja no de partículas com 750 m μ . De notar que as observações foram feitas em preparações obtidas pelo método de contacto de BRANDES (1957) e com metalização.

Não há portanto em todos estes trabalhos referência à purificação do Vírus.

No que diz respeito à nomenclatura do Vírus do Mosaico da Soja não queremos deixar de nos referir a KÖHLER et al. (1954) que apresenta como sinónimos Soybean crinkling, Soybean chlorosis, Soybean virus 1 PIERCE, Soja cirus 1 (GARDINER & KENDRICK) SMITH e Soybean Mosaic Virus. É esta última a designação citada em Review of Applied Mycology 35, Suppl., August 1957 e hoje mais correntemente seguida.

Quando já tínhamos terminado o nosso trabalho tivemos conhecimento que QUANTZ (1961-2) tinha conseguido transmissão do Vírus

do Mosaico da Soja a 13 novos hospedeiros. O autor verificou ainda o efeito da temperatura no número de lesões locais, sendo a mais favorável, 26° C. Determinou igualmente as propriedades físicas do vírus tendo obtido 62° C para temperatura letal, 1:1 000 para limite de diluição e 24 horas como longevidade «in vitro». No respeitante à observação de partículas ao Microscópio Electrónico dá indicação de bastonetes flexíveis com 748 m μ de comprimento médio.

3. Material e métodos

Durante o Verão de 1959 colheram-se no campo de cultura de soja (*Glycine soja* (L.) Sieb. et Zucc.) da E. A. N. em Oeiras, amostras de diversas cultivares que apresentavam mosaico: Harbinsoy, Medium Yellow, Wase n.º 2, Avoyelles, Biloxi, Rikuu 10, Mandarin, Manchuria, Hollybrook, e de cultivares que apresentavam conjuntamente com mosaico, distorção foliar: Ootootan, Pecking e Hispida.

A partir desse material fizeram-se inoculações mecânicas em plântulas das mesmas cultivares de soja mantidas em estufa ao abrigo de insectos, mas não se obtiveram infecções de Avoyelles, Biloxi, Mandarin e Hollybrook sendo especialmente severos os sintomas nas Pecking, Ootootan, Harbinsoy, Medium Yellow, Hispida, Wase n.º 2 e Manchuria. O facto dos sete isolamentos se comportarem em ensaios que se seguiram de forma semelhante do ponto de vista sintomatológico, fez com que o estudo recaísse apenas sobre o isolamento proveniente de «Hispida» que se manteve no decorrer do trabalho na cultivar Blackhawk por inoculações mecânicas sucessivas.

As plântulas de soja inocularam-se, no estado de folhas primárias e delineando-se os primórdios foliares seguintes. Para obviar a qualquer erro proveniente da transmissão do Vírus pela semente, antes de qualquer ensaio de inoculação em soja, eliminavam-se as plântulas com sintomas ou com qualquer anomalia.

Como método de inoculação mecânica usámos a modificação da técnica de RAWLINS & TOMPKINS (1936) devida a COSTA (1944).

Na pesquisa de novos hospedeiros, inoculamos plantas de 31 espécies pertencentes às famílias das Quenopodiáceas, Amarantáceas, Leguminosas, Solanáceas, Cucurbitáceas e Compostas. As Cucurbitáceas, inoculavam-se quando a primeira folha ainda não estava completamente desenvolvida, as Leguminosas inoculavam-se nas folhas primárias e em mais um ou dois pares de folhas e as restantes famí-

lias apenas quando apresentavam já o quarto par de folhas desenvolvidas.

Os ensaios de transmissão com afídeos fez-se a partir de exemplares colhidos e mantidos em diversas espécies de plantas (Quadro I).

QUADRO I

AFÍDEOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE TRANSMISSÃO E PLANTAS EM QUE FORAM COLHIDOS E MULTIPLICADOS

Espécie	Colheita em	Multiplificação em
<i>Myzus persicae</i> Sulz.	<i>Solanum tuberosum</i> L.	<i>Brassica chinensis</i> L.
<i>Myzus ornatus</i> Laing	<i>Chrysanthemum</i> sp.	<i>Datura tatula</i> L.
<i>Acyrtosiphon pisum</i> Harris	<i>Vicia faba</i> L.	<i>Vicia faba</i> L.
<i>Aulacorthum solani</i> Kalt.	<i>Solanum tuberosum</i> L.	<i>Solanum tuberosum</i> L.
<i>Neomyzus circumflexus</i> Buckton	<i>Trifolium</i> sp.	<i>Datura tatula</i> L.
<i>Megoura viciae</i> Buckton	<i>Lathyrus</i> sp.	<i>Vicia faba</i> L.
<i>Dactynotus sonchi</i> L.	<i>Sonchus</i> sp.	<i>Sonchus</i> sp.
<i>Macrosiphum euphorbiae</i> Thomas	<i>Solanum tuberosum</i> L.	<i>Solanum tuberosum</i> L.
<i>Macrosiphum rosae</i> L.	<i>Rosa</i> sp.	<i>Rosa</i> sp.
<i>Aphis craccivora</i> Koch	<i>Vicia faba</i> L.	<i>Vicia faba</i> L.
<i>Aphis fabae</i> Scop.	<i>Vicia faba</i> L.	<i>Vicia faba</i> L.
<i>Aphis gossypii</i> Glover	<i>Gossypium</i> sp.	<i>Gossypium</i> sp.
<i>Aphis nasturtii</i> Kalt.	<i>Solanum tuberosum</i> L.	<i>Datura tatula</i> L.

Das espécies indicadas isolaram-se na estufa colônias isentas de vírus de *Myzus persicae*, *Acyrtosiphon pisum* e *Aphis craccivora* a partir de ninfas colhidas, no momento de vivificação, de adultos ápteros. As restantes espécies colhidas no campo, eram mantidas igualmente em cultura no insectário em plantas nas quais julgamos que o Vírus do Mosaico da Soja não se multiplica e em que não se tivesse verificado quaisquer sintomas provenientes de outros vírus.

Usou-se, tanto para hospedeiro infectante como colonizado, a soja. Ensaiou-se geralmente a cultivar Blackhawk,

Utilizaram-se grupos de afídeos em número variável, conforme a espécie, e alimentaram-se em folhas infectadas com mosaico, manti-

das em placas de Petri, durante os períodos estabelecidos para cada ensaio.

Os afídeos eram seguidamente transferidos para plantas sãs, protegidas contra contaminações fortuitas por chaminés de candeeiro, plantas que depois se fumigavam para matar os afídeos e se conservavam na estufa em observação. Segundo ILHARCO (comunicação por escrito) as espécies *Megoura viciae* e *Myzus ornatus* são indicadas pela primeira vez para Portugal. *Aphis craccivora* nunca foi citado para Portugal, pelo seu verdadeiro nome ou por algum dos seus sinónimos, no entanto, foi possivelmente, já várias vezes encontrado e citado erradamente por qualquer outro nome. Daqui não considerarmos nova para Portugal.

Os resultados positivos foram confirmados por inoculação mecânica retrógrada em soja, excepto nos ensaios com *Myzus ornatus*, *Neomyzus circumflexus*, *Aphis gossypii* e *Aphis nasturtii* em que se efectuou a pesquisa do Vírus serologicamente pelo método de difusão em agar. Em todos os ensaios usaram-se como testemunhas, plantas mantidas nas mesmas condições.

Em ensaios de transmissão com cochonilhas usou-se apenas *Pseudococcus citri* Risso, que se obteve a partir duma cultura conservada em insectário, em tubérculos de batateira abrolhados e mantidos na obscuridade, num cristalizador com musgo.

O estudo da sintomatologia e da selecção de cultivares resistentes ao vírus efectuou-se em 77 cultivares provenientes do Departamento de Forragens da Estação Agronómica Nacional, do Jardim do Ultramar, algumas da Companhia União Fabril, outras do Canadá e uma de Marrocos.

Os restantes métodos utilizados serão descritos à medida que forem citados.

4. Observações e ensaios realizados

4.1. Identificação do vírus

O primeiro problema que se deparou foi o de saber se as viroses da soja encontradas no campo, eram devidas a infecção simples ou mista, para, neste último caso, fazer a separação dos respectivos vírus.

Entre os vírus que apresentam estirpes que já foram encontradas a infectar a soja no campo, citam-se o Vírus do Mosaico da Soja (GARDNER & KENDRICK, 1921), o Vírus do Mosaico Amarelo do

Feijoeiro (CONOVER, 1948), o Vírus do Marmoreado da Vagem do Feijoeiro (SKOTLAND, 1958), o Vírus do Ponteado amarelo do Feijoeiro (WALTERS, 1958), o Vírus do Mosaico da Luzerna (ALLINGTON et al., 1960) e o Vírus do Crestamento do Gomo da Soja (ALLINGTON, 1946). Outros há porém capazes de infectá-la experimentalmente como: o Vírus Deformante do Tomateiro (BLENCOWE & CALDWELL, 1949), o Vírus das Estrias da Ervilha (ZAUMEYER, 1938), o Vírus das Estrias da Ervilha de Nova Zelândia (CHAMBERLAIN, 1939), o Vírus das Estrias da Ervilha de Wisconsin (HAGEDORN & WALKER, 1949), o Vírus das Estrias do Tabaco (JOHNSON, 1936), o Vírus dos Nós Vermelhos do Feijoeiro (THOMAS & ZAUMEYER, 1950), o Vírus da Acronecrose do *Cyamopsis psoraloides* (COOPER, 1949), o Vírus da Acronecrose do Feijoeiro (LE BEAU, 1947), o Vírus da Mancha Anelar do Tomateiro (SAMSON & IMLE, 1942), o Vírus do Marmoreado da Faveira (BAWDEN et al. 1951), o Vírus do Marmoreado do Trevo dos prados (SINHA, 1960), o Vírus do Mosaico Proliferante da Ervilha (PIERCE, 1935), o Vírus do Mosaico do Trevo Branco (BANCROFT et al. 1960), o Vírus do Mosaico do *Trifolium subterraneum* (AITKEN & GRIEVE, 1943), o Vírus da Necrose do Tabaco (SMITH & BALD, 1935) o Vírus do Mosaico das Cucurbitáceas (DOOLITTLE, 1920), o Vírus do Mosaico Meridional do Feijoeiro (ZAUMEYER & HARTER, 1943), o Vírus da Mancha Amarela do Feijoeiro (THOMAS, 1951), o Vírus das Manchas Amarelas do Trevo Branco (KREITLOW et al. 1949), o Vírus do Mosaico do Pimentão de Cheiro (BERKELEY, 1947) e o Vírus da Necrose das Nervuras do Feijoeiro (ZAUMEYER & PATINO, 1960). Na nomenclatura dos vírus seguiu-se a apresentada no suplemento da *Rev. appl. Mycol.* 35, 1957.

Para fazer a identificação inocularam-se as seguintes espécies: *Glycine soja* (L.) Sieb. et Zucc. «Blackhawk», *Phaseolus vulgaris* L. «Bountiful», *Pisum sativum* L. «Mansholt's Pluk», *Trifolium pratense* L., *Nicotiana tabacum* L. «White Burley» e *Cucumis sativus* L., consideradas segundo Bos et al. 1960 diferenciadores para os Vírus citados. Ao fim dum mês verificou-se a infecção sistêmica só em plantas de soja não apresentando as outras plantas inoculadas aparência de virose. Para eliminar a possibilidade de se poder tratar de plantas porta-vírus sem sintomas, fizeram-se inoculações retrógradas para soja «Blackhawk», não se tendo obtido nenhuma infecção.

Os primeiros ensaios sugeriram-nos, portanto, estar simplesmente em presença do Vírus do Mosaico da Soja, visto ser dos Vírus

indicados o único que das 6 espécies diferenciadoras infecta apenas soja. No estudo das características do vírus feito no decurso do presente trabalho confirmou-se esta identificação.

4.2. Transmissão do vírus

4.2.1. Transmissão por inoculação mecânica

Conseguiu-se transmitir o vírus a *Glycine Soja* (L.) Sieb, et Zucc., *Canavalia ensiformis* D. C., *Mucuna utilis* Wallich, *Mucuna deeringina* (Bort.) Holl. e *Vicia narbonensis* L. O método de inoculação utilizado foi o usual mas a que se adicionou tampão de fosfato [a solução tampão de fosfato pH 7.0 obteve-se pela mistura de soluções de fosfato mono-potássico ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$) e fosfato dissódico ($\text{PO}_4\text{HNa}_2\text{2H}_2\text{O}$) na proporção de 280 cc. da primeira solução para 720 cc. da segunda)] para a obtenção de extracto. Das espécies de plantas indicadas, *Vicia narbonensis* mostrou igualmente sintomas quando se inoculou com extracto a que se não adicionou tampão de fosfato. O sujeitar-se as plantas a um período prévio de obscuridade de 24 horas antes de serem inoculadas mecânicamente não trouxe qualquer vantagem.

Inocularam-se também *Beta vulgaris* L., *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn., *Chenopodium anthelminthicum* L., *Gomphrena globosa* L., *Arachis hypogaea* L., *Cicer arietinum* L., *Crotalaria juncea* L., *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub., *Dolichos lablab* L., *Dolichos lablab* L. forma *purpurea* P. Cout., *Dolichos lubia* Forsk., *Dolichos ornatus* Wall., *Glycine javanica* L., *Hedysarum coronarium* L., *Lathyrus cicera* L., *Lathyrus clymenum* L., *Lathyrus odoratus* L., *Lespedeza cuneata* G. Don., *Lupinus albus* L., *Medicago orbicularis* (L.) All., *Medicago sativa* L., *Melilotus segetalis* (Brot.) Sér., *Ornithopus sativus* Brot., *Phaseolus angularis* (Willd.) W. F. Wight, *Phaseolus aureus* Roxb., *Phaseolus caffer* Haberle, *Phaseolus hystericus* Dur., *Phaseolus lunatus* L., *Phaseolus multiflorus* Willd., *Phaseolus mungo* L., *Phaseolus vulgaris* L., «Bountiful», «Brecklaveské», «Genfer Markt», «Saxa», «Stringless Green Pod», «Stringless Red Valentine», «Top Crop», «Wachs Reinland», *Pisum arvense* L., *Pisum sativum* L., «Mansholt's Pluk», «Telephone», *Psoralea bituminosa* L., *Trifolium hybridum* L., *Trifolium incarnatum* L., *Trifolium pratense* L., *Trifolium repens* L., *Trifolium resupinatum* L., *Trigonella foenum-graecum* L., *Vicia cornigera* Chaub., *Vicia ervillia* (L.) Willd., *Vicia faba* L.,

Vicia lathyroides L., *Vicia monanthos* Retz., *Vicia pannonica* Cr. *Vicia sativa* L. *Vicia tetrasperma* (L.) Moench., *Vicia villosa* Roth. *Vigna catjang* (Burm.) Walp., *Vigna sesquipedalis* (L.) W. F. Wight, *Vigna sinensis* L. «Victor», «Whippoorwill», *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Capsicum annuum* L. *Datura metel* L., *Datura tatula* L., *Lycopersicum esculentum* Miller, *Nicotiana glutinosa* L., *Nicotiana rustica* L., *Nicotiana tabacum* L., «Samsun», «White Burley», *Petunia hybrida* Hort., *Physalis floridana* Rydb., *Solanum nigrum* L., *Cucumis sativus* L. e *Zinnia elegans* Jacq. as quais não mostraram ser hospedeiras para o vírus em estudo. Todos os resultados foram confirmados por inocuações retrógradas para soja «Blackhawk». Confirmou-se portanto que o Vírus do Mosaico da Soja pode multiplicar-se e causar sintomas noutras plantas além de *Glycine soja* como também indica Quantz (1961-62) no seu recente trabalho.

4.2.2. Transmissão por insectos

Além de se pretender conhecer os insectos que são capazes de transmitir o vírus procurou-se avaliar também a relativa facilidade de transmissão. No presente trabalho tentou-se avaliar o papel de 13 espécies de afídeos e uma espécie de cochonilha na dispersão do vírus, determinando os tempos de infecção e de transmissão (BOS et al. 1959).

Transmissão por afídeos. Como quase todos os ensaios duraram várias horas não nos foi possível verificar eficazmente a imobilização dos afídeos ou seja o momento em que estavam a principiar a alimentar-se; no entanto para a espécie *Myzus persicae* Sulz. como os tempos variaram entre 5 a 60 minutos, todos os passos dos afídeos foram seguidos por observação à lupa tendo-se anotado a ocasião em que se imobilizaram, e tentamos a determinação dos tempos mínimos de infecção e de transmissão.

Myzus persicae Sulz. — Como esta espécie é particularmente eficiente na transmissão de vírus, era de esperar que também transmitisse o Vírus do Mosaico da Soja, como aliás já tinham verificado HEINZE & KÖHLER (1940). Por isso foi escolhida para ensaios mais minuciosos de transmissão.

Para determinação dos tempos de infecção os afídeos foram colocados numa placa de Petri, a esfomear durante 2 horas, após o que se deram períodos de alimentação no hospedeiro infectante de 60, 50, 40, 30, 15 e 5 minutos para determinar os tempos de infecção

para este afídeo. Em seguida mantiveram-se nas plantas sãs em grupos de 10 por planta durante 60 minutos em todos os ensaios, os quais conduziram sempre a 100 % de infecções.

Na *determinação dos tempos de transmissão* os passos iniciais no respeitante ao esfomeamento dos grupos de afídeos foram idênticos ao caso anterior. Findo esse tempo foram dados períodos de alimentação no hospedeiro infectante constantes e iguais a 30 minutos para determinar o tempo mínimo de transmissão e aumentarmos sucessivamente a permanência nos hospedeiros sãos, 5, 15 e 30 minutos. Obteve-se igualmente 100 % de infecções em todos os ensaios. Nos ensaios com outras espécies o método seguido é idêntico ao do *Myzus persicae* Sulz., variando unicamente o número de afídeos por planta e o tempo de esfomeamento. Os resultados obtidos estão expressos no Quadro II.

QUADRO II

	Período de esfomeamento	Número de afídeos por planta	Permanência no hospedeiro infectante	Permanência nas plantas sãs	Plantas infectadas/plantas ensaiadas
<i>Myzus persicae</i> Sulz. ...			60 min.	60 min.	5/5
			50	60	5/5
			40	60	5/5
			30	60	5/5
			15	60	5/5
			5	60	5/5
			30	5	5/5
			30	15	5/5
<i>Myzus ornatus</i> Laing ...	2 h	15	72 h	24 h	1/5
			72	48	3/5
<i>Aulacorthum solani</i> Theob.	2 h	5 a 10	3	4	0/10
			4	4	5/10
			24	24	5/5
			4	3	0/5
<i>Acyrtosiphon pisum</i> Harris	2 h	10 a 12	24	4	0/10
			24	8	5/10
			24	24	3/5
			24	48	8/8
			24	72	1/5
			4	48	2/5

QUADRO II (Continuação)

	Período de esfomeamento	Número de afídeos por planta	Permanência no hospedeiro infectante	Permanência nas plantas sãs	Plantas infectadas/plantas ensaiadas
<i>Neomyzus circumflexus</i> Buckt.	2 h	10	48	24	0/5
			48	48	2/3
			76	96	2/2
<i>Megoura viciae</i> Buckt ...	2 h	10	24	< 21	0/2
			24	< 48	3/7
<i>Dactynotus sonchi</i> L. ...	4 h	7 a 9	4	< 24	0/9
			24	< 24	7/10
			48	< 24	3/3
<i>Macrosiphum euphorbiae</i> Thomas	4 h	10 a 12	24 h	24 h	5/5
			48	29	2/5
			48	50	2/5
			72	72	1/8
<i>Macrosiphum rosae</i> L. ...	4 h	6 a 10	24	< 24	1/5
			48	< 24	1/3
<i>Aphis craccivora</i> Koch.	2 h	12	24	4	0/5
			24	24	2/5
			24	48	8/10
			4	48	2/5
<i>Aphis fabae</i> Scop.	2 h	10	4	72	1/5
			16	72	2/5
			24	72	6/10
			24	24	0/5
			24	48	2/5
<i>Aphis gossypii</i> Glover ...	3 h	10	48	72	3/5
			72	72	1/2
			72	120	3/10
<i>Aphis nasturtii</i> Kalt. ...	3 h	10	76	96	5/5

Transmissão por *Pseudococcus citri* Risso. Fizeram-se dois ensaios em que se mantiveram as cochonilhas sobre folhas de soja infectadas, destacadas e colocadas em câmara húmida, onde se alimentaram durante 5 dias, findo os quais se transferiram para plantas sãs, aí permanecendo 7 ou 14 dias. Utilizou-se no ensaio grupos de 10 cochonilhas por planta. Quer no primeiro dia de alimentação no hos-

pedreiro infectante, quer no primeiro dia de permanência nas plantas sãs, mantiveram-se as cochonilhas na obscuridade para que se imobilizem e principiem a alimentar-se. No final do período de permanência nas plantas sãs, retiraram-se todas as cochonilhas, fumigando as plantas em seguida.

4.2.3. *Transmissão por enxertia*

Pretendíamos verificar se as cultivares que nos ensaios se comportaram como resistentes à inoculação mecânica se comportavam da mesma forma com a enxertia, e assim verificar se havia imunidade.

A técnica da enxertia foi a de encosto seguido por SHAPOVALOV (1935). Num ensaio preliminar usámos a cultivar Blackhawk susceptível para verificar se a técnica era adequada. Efectuámos 27 enxertias de encosto de plantas de soja da cultivar Blackhawk infectadas, em plantas de soja sãs da mesma cultivar. Dentro dum período de incubação de 6 a 14 dias, todas as enxertias conduziram ao aparecimento dos sintomas típicos do Vírus do Mosaico da Soja. Ao observarem-se as zonas de enxertia notou-se haver 15 bem ligadas, 10 mal ligadas e 2 em que não tinha havido ligação. Isto prova que basta o simples contacto entre as plantas, sãs e doentes, para que se transmita o vírus.

Em seguida utilizou-se este mesmo método com cultivares resistentes à inoculação mecânica como «Bicolor de Calai», «Large Seeded Tokyo» e tolerantes: «Haberland» «Hollybrook», «Kingwa», «Creole», «Hahto», «Mammoth Yellow» e «Oakland». Procurou-se fazer enxertias dessas cultivares sãs com a cultivar «Biloxi» infectada. No entanto, o número de enxertias não foi suficiente para se poderem tirar conclusões, embora ensaios serológicos a partir de extractos de folhas das diferentes cultivares, tenham confirmado a presença do vírus. Com a cultivar Mukden que se tinha comportado como resistente à inoculação mecânica, não foi possível efectuar qualquer enxertia.

Como consequência destes ensaios não podemos considerar como resistência absoluta ou imunidade, a resistência apresentada pelas cultivares Bicolor de Calai e Large Seeded Tokyo.

4.2.4. *Transmissão por semente*

Nos ensaios efectuados procurou-se determinar a percentagem de transmissão do Vírus do Mosaico da Soja pela semente da Soja e, ao mesmo tempo, determinar se havia alguma relação entre o Vírus e a localização das sementes nos *loci* das vagens ou das vagens

ao longo do caule das plantas. Assim, no Verão de 1960, marcaram-se no campo de soja 100 plantas, que nos pareciam estar infectadas com vírus. Para maior segurança fez-se a inoculação mecânica do extracto de cada uma dessas plantas a *Glycine soja* Sieb. et Zucc. «Blackhawk», *Phaseolus vulgaris* L. «Bountiful», e *Nicotiana tabacum* L. «Samsun». Das 100 inoculações efectuadas, 85 conduziram a infecções sistémicas só em soja, e 15 não conduziram a qualquer infecção nas plantas indicadas. Partiu-se portanto de 85 plantas que se supunha estarem infectadas com o Vírus do Mosaico de Soja mas apenas se pôde estudar o comportamento das sementes de 62, visto 23 plantas terem sido acidentalmente destruídas no campo. Destas 62 plantas marcámos o número de vagens em cada nó e o nó da planta, a partir da base para o topo. Registou-se a existência de ramo lateral no nó, o número de vagens no ramo lateral, numerando igualmente os nós de baixo para cima. Marcou-se ainda a posição da semente na vagem.

Assim, 2389 sementes provenientes de 1515 vagens foram colhidas de 62 plantas com mosaico e semeadas na estufa, de Dezembro de 1960 a Julho de 1961. Uma vez nascidas as plântulas, tomou-se nota da presença ou ausência de mosaico. Novamente após o aparecimento do primeiro trifolíolo examinou-se todas as plântulas, e as que não mostravam sintomas de mosaico eram eliminadas. Observa-se do ensaio, que parece não haver uniformidade na distribuição do vírus pelas sementes das várias vagens, bem como nestas em relação aos nós do caule. Assim, vagens da mesma planta podem apresentar-se ou não com vírus. Também pode suceder que as sementes de uma vagem possam estar todas infectadas, enquanto noutra vagem haja só uma ou mesmo nenhuma infectada.

Observando (Quadro III) o número de sementes formado por locus, o número total de plantas e as que apresentam mosaico, nota-se por exemplo que as vagens apresentavam raramente 4 sementes pelo que se obtiveram apenas 11 sementes dos loci 4, dos quais só 7 deram origem a plântulas. Em nenhuma se pôde detectar o vírus, o que não admira dada a baixa percentagem de infecções que se obteve para todos os outros casos. Com efeito os valores mais altos obtidos dizem respeito aos loci 2 das cultivares Yōgetu e Harold, respectivamente com 26 plântulas com mosaico em 127 plântulas obtidas (20 %) e com 21 em 121 (17 %), sendo nesta última cultivar muito semelhantes os valores obtidos para os loci 1 e 3. Em quase todos os outros casos a percentagem de transmissão é inferior a 10 % para qualquer dos loci.

Se considerarmos as percentagens de transmissão em relação ao

número de plântulas formadas por cada cultivar (Quadro IV) notam-se os valores mais altos para as mesmas cultivares Harold e Yögetu com 15,6 e 15,7 % respectivamente, o valor mínimo para a cultivar Wabask, 4,2 %. Para o número total de sementes formadas (2389) a percentagem de transmissão foi de 8,3 % em relação às plântulas obtidas.

QUADRO III
TRANSMISSÃO PELA SEMENTE EM DIVERSAS CULTIVARES

Cultivares	Plantas	Vagens	Sementes	Plântulas		Porcentagem de infecção
				Total	c/ mosaico	
Glasman	8	81	136	104	6	5,7
Harold	10	361	467	300	47	15,6
Pecking	26	487	661	625	39	6,2
Wabask	8	387	787	641	26	4,2
Yögetu	10	199	338	274	43	15,7

QUADRO IV
TRANSMISSÃO E LOCALIZAÇÃO DA SEMENTE

Cultivar e N.º de plantas	N.º de vagens	Locis	Sementes	Plântulas		Porcentagem de infecção
				Total	c/ mosaico	
Glasman 8	81	1	52	39	0	0
		2	73	58	6	10
		3	11	7	0	0
		4	0	0	0	0
Harold 10	361	1	198	127	18	14
		2	188	121	21	17
		3	76	50	8	16
		4	5	2	0	0
Pecking 26	487	1	230	213	15	7
		2	347	332	19	5
		3	84	80	5	6
		4	0	0	0	0
Wabask 8	387	1	225	184	3	1
		2	293	239	11	4
		3	263	213	12	5
		4	6	5	0	0
Yögetu 10	199	1	141	116	15	12
		2	163	127	26	20
		3	34	31	2	6
		4	0	0	0	0

Para a confirmação da presença do Vírus do Mosaico da Soja nas plântulas provenientes das sementes, utilizou-se a reacção serológica em lâmina. Em face dos primeiros ensaios terem conduzido a resultados negativos, nos ensaios seguintes preferimos as provas de infeciosidade.

4.3. Sintomatologia em diversos hospedeiros

Glycine soja (L.) Sieb. et Zucc. — Eliminaram-se como sempre todas as plantas com deformação ou com sintomas provenientes da semente e inocularam-se em seguida pelo processo habitual. O período de incubação variou entre 5 a 14 dias.

Escolheu-se para descrição dos sintomas a cultivar Blackhawk. O primeiro sintoma do Vírus, é o aparecimento de clorose das nervuras secundárias das folhas trifoliadas, seguindo-se marmoreado.

São visíveis mosaicos e por vezes verificam-se rugosidades em toda a folha. As margens das folhas enrolam-se frequentemente ao longo da nervura principal. Observou-se que, nalgumas folhas, aparece ocasionalmente clorose parcial ou mesmo total. Verificou-se, nas áreas amareladas, pontuações cor de ferrugem. A acompanhar os sintomas de ondulado da margem, aparecem manchas de um verde mais escuro ao longo das nervuras principal e secundárias ou seja, marginado das nervuras. Por vezes há deformação foliar que leva à redução da superfície da folha e notam-se necroses nas nervuras dos trifolíolos. Nas folhas inoculadas aparece também por vezes necroses nas nervuras. O aparecimento de mosaico bolhoso observou-se em estufa na cultivar KURA e no campo, na cultivar PECKING (Fig. 1). As cultivares infectadas apresentam redução no seu crescimento. Devemos destacar a cultivar EARD BIRD em que se observou um nanismo muito acentuado.

Na estufa poucas cultivares formam sementes quando infectadas. As vagens nascidas de plantas doentes podem ter o aspecto e o número de sementes normais, estar lateralmente enroladas ou torcidas e terem pubescência menos nítida, ou até mesmo não apresentarem sementes. Contudo a variação da sintomatologia está dependente da cultivar utilizada.

Canavalia ensiformis D. C. — Após a inoculação mecânica, notam-se mosaicos nos trifolíolos e distorção ao longo da nervura principal. O período de incubação foi de 21 dias.

Mucuna deeringiana (Bort.) Holl. — O primeiro sintoma é o aparecimento de pontos cloróticos disseminados pelos trifolíolos se-

guido por clorose das nervuras que não acompanham o crescimento do limbo. Este encurtamento das nervuras leva à deformação do limbo ondulando-se as margens. Quando se substituiu a solução tampão de molaridade 0.1 M pela molaridade 0.05 M, observou-se além dos sintomas já indicados mosaico rugoso. — Os sintomas manifestaram-se dentro de um período de incubação de 6 a 13 dias.

Mucuna utilis Wallich — Os sintomas nesta planta são semelhantes aos da espécie anterior tendo aparecido no entanto anéis necróticos (Fig. 2) no primeiro trifolíolo quando se utilizou na inoculação extracto obtido com adição da solução tampão 0.05 M. Mais tarde aparece clorose total do limbo e verifica-se a morte subsequente do mesmo. O período de incubação variou de 6 a 14 dias.

Vicia narbonensis L. — Como primeiro sintoma observou-se o enrolamento da margem das folhas. Notou-se em seguida cloroses dos limbos que levam à morte das folhas. Também se verificou folhas com mosaico difuso. Quando se inoculou sem adição de solução tampão, a clorose do limbo nunca se observou. Os sintomas foram observados após um período de incubação de 11 a 21 dias.

4.4. Propriedades físicas do vírus

Os ensaios de limite de diluição e de temperatura letal efectuados em Outubro de 1961 não puderam ser realizados na cultivar Blackhawk por não haver semente, tendo-se utilizado a cultivar Laredo, que se mostrou também susceptível. O período de incubação foi de 6 a 14 dias não havendo diferenças sensíveis no tipo de sintomas nas plantas inoculadas. Em todos os ensaios efectuados, em relação às propriedades físicas do vírus «inoculou-se» com água um grupo de plantas num total de 103 servindo de testemunha e distribuídas da seguinte maneira: limite de diluição 37, temperatura letal 35, longevidade «in vitro» 21, e em que nunca apareceram sintomas.

No limite de diluição os diversos ensaios foram efectuados de Maio de 1960 a Outubro de 1961 em que se utilizou uma escala de diluições de 1:10 a 1:20 000. O extracto obtido a partir de folhas de soja com sintomas de mosaico foi passado através de gaze.

Na determinação da temperatura letal, como o extracto obtido a partir de folhas de soja é reduzido, diluiu-se em todos os ensaios a 1:2 com água destilada. Em cada tubo colocou-se 1 cm³ de extracto contendo o vírus, levando-se em seguida os tubos a um banho-maria num ultratermostato NB — 59 548, ficando estes mergulhados abaixo

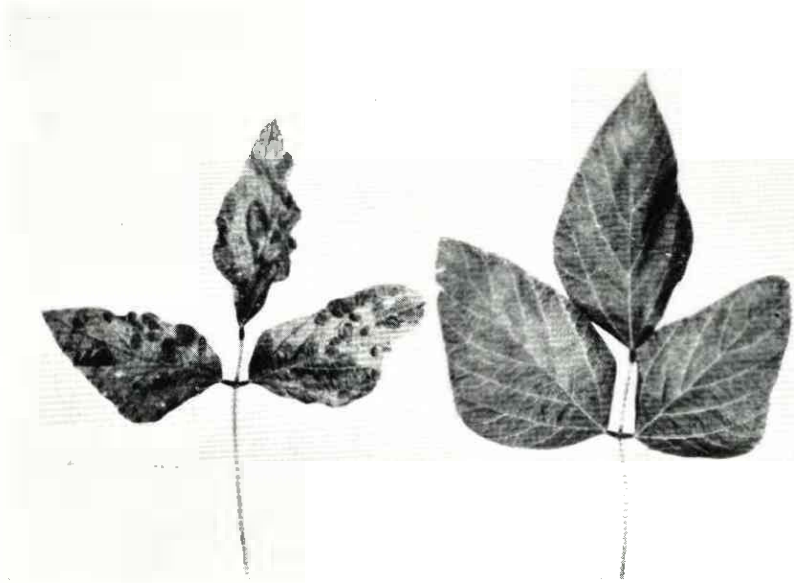


Fig. 1 — Soja «Pecking», folha com mosaico bolhoso devido a infecção natural no campo (à esquerda) e folha sã (à direita)



Fig. 2 — Anéis necróticos em *Mucuna utilis* Wallich causados pelo Virus do Mosaico da Soja

do nível da água. Os tubos mantiveram-se no banho-maria durante 10 minutos para cada temperatura ensaiada. Findo o ensaio os tubos foram mergulhados em água fria e, logo que o extracto arrefeceu, inoculou-se em plantas de soja. Os sucessivos ensaios realizaram-se de Setembro de 1960 a Outubro de 1961, usando intervalos de temperatura de 1° a 5° C.

A *longevidade do vírus «in vitro»* determinou-se mantendo simplesmente o extracto das plantas contendo o vírus à temperatura ambiente, em tubos de ensaio tapados e ensaiando-se a infecciosidade do vírus ao fim de períodos cada vez mais longos. Os ensaios efectuados de Setembro de 1960 a Janeiro de 1961, incidiram numa escala de 0 a 5 dias.

No Quadro V indica-se o resumo geral dos ensaios e a percentagem de infecção obtida, para cada propriedade.

QUADRO V
DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DILUIÇÃO

Inóculo	Resultado das inoculações	
	Total	% de infecção
Extracto não diluído	44/51 (*)	86.2
» diluído a 1:10	31/51	60.8
» » a 1:100	27/51	52.9
» » a 1:1 000	20/51	39.2
Extracto diluído a 1:2 000	5/29	17.2
» » a 1:3 000	0/5	0.0
» » a 1:4 000	0/5	0.0
» » a 1:5 000	0/40	0.0
» » a 1:10 000	0/22	0.0
» » a 1:20 000	0/6	0.0

(*) Plantas infectadas / Plantas inoculadas.

DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA LETAL

Inóculo	Tratamento	Resultado das inoculações	
		Total	% de infecção
Extracto	50 °C 10 min.	26/40 (*)	65.0
»	53 °C » »	3/5	60.0
»	54 °C » »	3/5	60.0
»	55 °C » »	5/45	11.1
»	56 °C » »	1/5	20.0
»	57 °C » »	1/5	20.0

QUADRO V (Continuação)

DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA LETAL

Inóculo	Tratamento	Resultado das inoculações	
		Total	% de infecção
<i>Extracto</i>	58 °C 10 min.	0/29	0,0
»	60 °C » »	0/40	0,0
»	62 °C » »	0/5	0,0
»	64 °C » »	0/11	0,0
»	65 °C » »	0/5	0,0
»	66 °C » »	0/11	0,0
»	68 °C » »	0/11	0,0
»	70 °C » »	0/5	0,0
»	não tratado	42/45	93,3

(*) Plantas infectadas / Plantas inoculadas.

DETERMINAÇÃO DA LONGEVIDADE «IN VITRO»

Longevidade dos extractos	Resultados das inoculações	
	Total	% de infecção
0	28/31 (*)	90,3
1 dia	14/31	45,2
2 dias	8/31	25,8
3 dias	1/31	3,2
4 dias	0/31	0,0
5 dias	0/5	0,0

(*) Plantas infectadas / Plantas inoculadas.

4.5. Ensaio de purificação do vírus

Como a purificação do vírus do Mosaico da Soja ainda não tinha sido efectuada, e tendo dado bons resultados, na purificação de diversos vírus das Leguminosas e da Batateira, a marcha seguida por WETTER (1960) na Alemanha, também procurámos na nossa primeira tentativa conduzir o isolamento de maneira semelhante. Assim seis semanas após a inoculação, colheram-se as folhas de plantas de soja da cultivar Blackhawk com mosaico retirando-lhe os pecíolos. Adicionou-se tampão de fosfato na proporção de 2 ml por grama de tecido folear, homogenizando-se num desintegrador eléctrico e adicionou-se ácido ascórbico e sulfito de sódio de maneira que a concentração de cada um dos reagentes no volume total fosse de 0,2 %. Estes compostos actuam como antioxidantes, permitindo que o vírus mantenha mais facilmente as suas características de infecciosidade ao

longo de toda a marcha. Ao volume de extracto, afim de eliminar os pigmentos clorofilinos, adicionou-se igual volume de éter etílico conservado a 4° C para que a temperatura da mistura se mantivesse baixa. Os volumes de extracto e do éter foram misturados por agitação durante 5 minutos e separados em 3 camadas por centrifugação durante 15 minutos a 3 000 r. p. m. A camada superior é constituída pelo éter contendo os pigmentos clorofilinos. A camada inferior é uma fase aquosa que deve conter em suspensão o vírus. A camada intermédia separando as camadas do éter e da suspensão do vírus, bem como o sedimento que fica no fundo do tubo da centrífuga contém componentes celulares. Num funil de decantação mantém-se a fase aquosa e elimina-se o éter. Adicionou-se em seguida igual volume de tetracloreto de carbono com o fim de eliminar substâncias lipóides. Agitou-se o volume total durante 5 minutos e centrifugou-se igualmente a 3 000 r. p. m. durante 15 minutos, separando-se o volume total em 3 camadas. A camada sobrenadante é a fase aquosa que deve conter em suspensão o vírus. A camada inferior é constituída por tetracloreto de carbono e por algum éter remanescente. A separar estas duas camadas encontra-se uma camada intermédia de aspecto gelatinoso constituída por substâncias lipóides. A camada aquosa mantém-se e é separada da camada do tetracloreto de carbono que se elimina num funil de decantação. Para remover partículas estranhas submeteu-se a suspensão do vírus a nova centrifugação de 6 000 r.p.m. durante 10 minutos. O sobrenadante centrifugou-se a 39 000 r. p. m. durante uma hora e meia. O vírus sedimentou e ressuspendeu-se num homogenizador em tampão de fosfato 0.1 M - pH 7.0.

Como o vírus ressuspense no tampão se encontrasse um pouco turvo devido às impurezas que sedimentam conjuntamente com o vírus, centrifugou-se a ressuspensão a 2 500 r. p. m. durante 10 minutos. O sobrenadante deve conter o vírus parcialmente purificado (Quadro VI).

Para verificar se a marcha era adequada e tinha conduzido ao isolamento do vírus, retirou-se em todas as fases 1 cm³ para ensaios de infecciosidade, inoculando mecânicamente com carborundo um grupo de 6 plantas de soja «Blackhawk» as quais conduziram a resultados positivos em todos os passos.

Só é possível observar por meio da reacção serológica a presença do vírus na fase 9 quando se encontra parcialmente purificado. A determinação do título feito pela reacção em lâmina, em estufa a 30° C com 80 % de humidade, durante 1 hora, deu-nos o valor de 1:64.

As colunas de sacarose para o «rate zonal centrifugation» foram feitas pela técnica de BRAKKE (1958 a e b) como a seguir se indica: 100, 200, 300 e 400 g de sacarose foram dissolvidos num litro de H₂O e dispostos em camada em tubos de centrifuga de nitrocelulose com 4, 7, 7 e 7ml. Todas as colunas foram conservadas a 4° C e feitas um dia antes de serem usadas. Colocou-se 1 ml da suspensão do vírus no cimo duma coluna de soluções de sacarose e igualmente 1 cm³ de PO₄HK — 0.05 m pH 7.8 nos outros dois tubos. Centrifugou-se a 20 000 r. p. m. durante duas horas no rotor SW 25.1 da Ultracentrifuga SPINGO - model L nas condições habituais. No final da centrifugação eram visíveis duas zonas no tubo contendo o vírus, localizadas a primeira a partir de 1,5 cm do topo da coluna com 0,3 cm de espessura e a segunda com 0,2 cm de espessura localizada a partir de 1,9 cm do topo da coluna, não se encontrando qualquer zona nos outros tubos. Retiraram-se separadamente as duas camadas, centrifugando em seguida a 39 000 r. p. m. durante uma hora e meia. Ambos conduziram à formação dum núcleo de aspecto gelatinoso. Ressuspenderam-se separadamente em PO₄HK₂ 0.05 M — pH 7.8, determinando-se o título do vírus nas duas soluções, que no primeiro caso foi de 1/8 e no segundo de 1/16.

4.6. Características morfológicas das partículas. Observações ao Microscópio Electrónico

Quando se obteve o vírus parcialmente purificado enviou-se a suspensão do vírus ao Laboratório de Microscopia Electrónica calouste Gulbenkian para se procurar observar a existência de partículas e assim podermos confirmar que a marcha da purificação tinha conduzido ao isolamento do vírus. A técnica foi a de BRENNER & HORN (1959) e nas amostras preparadas o Microscópio Electrónico R. C. A. EMU 3C revelou pequeno número de partículas em forma de bastonete flexível insuficientes para determinação das dimensões. Para este fim enviou-se ao «Institut für Landwirtschaftliche Virusforschung» de Braunschweig — Alemanha, folhas de soja da cultivar Blackhawk com sintomas de mosaico, em que o DR. J. BRANDES gentilmente determinou a presença de bastonetes flexíveis com 744 m μ de comprimento médio, o que os situa no grupo 11 ou seja no de partículas com 750 m μ (BRANDES & WETTER, 1959).

QUADRO VI

Homogenizar 50 g de folhas frescas em 100 cm³ de tampão de fosfato 0,1 M pH 7.0 num desintegrador eléctrico
Filtrar por gaze de «nylon»

1) Extracto filtrado (1 Vol.) + Acido ascórbico 0,2 % Sulfito de sódio 0,2 % Eter etílico conservado a 4 °C (1 Vol.)	Resíduos eliminados
2) Agitar 5 minutos Centrifugar 3000 r. p. m. — 15 min.	
3) Líquido subnadante (1 Vol.) + Tetracloroeto de carbono conservado a 4 °C (1 Vol.)	Éter e sedimentos eliminados
4) Agitar 5 minutos Centrifugar 3000 r. p. m. — 15 min.	
5) Líquido sobrenadante Centrifugar 6000 r. p. m. — 10 min.	Tetracloroeto de carbono e sedimentos eliminados
6) Líquido sobrenadante Centrifugar 39 000 r. p. m. — 1,50 h	Tetracloroeto de carbono e sedimentos eliminados
Sedimentos	Sobrenadante eliminado 7)
Ressuspender em tampão de fosfato 0.1 M — pH 7.0 Centrifugar 2500 r. p. m. — 10 min.	
9) Líquido sobrenadante Vírus parcialmente purificado	Sedimento eliminado 8)

4.7. Serologia do vírus

Procurou-se obter um anti-soro e ensaiaram-se diversos métodos de determinação de títulos a fim de averiguar em que casos se deve preferir cada um dos métodos ensaiados.

Após a obtenção do Vírus do Mosaico da Soja parcialmente purificado e tendo-o ressuspenso no tampão de fosfato, emulsiou-se 1.5 cm³ da suspensão com igual volume de Bacto-Adjuvante Difco, completo e injectou-se num coelho por via intra-muscular 2 cm³ desta emulsão (1 cm³ em cada coxa). Passados dez dias efectuou-se uma segunda injeção constituída por suspensão de vírus parcialmente purificado emulsionado com igual volume de Bacto — Adjuvante Difco, incompleto. Os coelhos foram esfomeados durante 4 horas antes das sangrias, que se efectuaram 8 e 10 dias a seguir à primeira injeção e nas primeira, segunda, terceira, sexta e décima primeira semanas após a segunda injeção.

O sangue manteve-se à temperatura ambiente e ao fim de 3 horas retirou-se o soro e centrifugou-se a 2 500 r. p. m. durante 10 minutos.

Para conservação do soro adicionou-se uma solução aquosa dum antisséptico — Cialite — (Höchst Ag) a 1:50 na proporção de 0,1 cm³ por cada 10 cm³ de soro e mantêm-se em frigorífico em ampolas de vidro, fechadas à lâmpada.

Como técnicas usou-se a reacção em lâmina (DUNIN & POPOVA, 1937), a reacção em placa (VAN SLOGTEREN, 1954-a) e ainda a difusão em agar (OUCHTERLONY, 1948).

Nos ensaios efectuados em lâminas colocámos uma gota de anti-soro para o Vírus do Mosaico da Soja, em cada extremidade e adicionámos respectivamente uma gota de extracto de folhas de soja com sintomas de mosaico, previamente centrifugado entre 5 000 e 6 000 r. p. m. durante 10 minutos, e extracto de folhas sãs, centrifugado nas mesmas condições. Cada gota é agitada com o auxílio de varetas de vidro e deixa-se em incubação a 24° C ou 30° C numa estufa com 80 % de humidade, durante 40 ou 60 minutos. A reacção de precipitação é então observada num microscópio com condensador a seco de fundo escuro (ocular ×8, objectiva ×10, Microscópio Zeiss).

Nos ensaios de microreacção serológica sob parafina líquida usaram-se placas de Petri cobertas com Morvital ou Silicone indiferentemente. As gotas de extracto de sojas sãs e com o Vírus do Mosaico da Soja previamente centrifugadas a 5 000 r. p. m. durante 10 minutos, e do antisoro específico, foram colocadas nas placas com o auxílio de micropipetas de Pasteur. Para facilitar a colocação das gotas utilizou-se um quadriculado de 8×8 mm. Incubou-se a 37° C durante 2 horas.

Nos ensaios de difusão em agar em placa de Petri, usou-se como meio para as reacções de difusão Agar Difco a 1 % em soro fisiológico e ajustou-se o pH para 7.0 com OHNa normal com o auxílio do papel indicador MERCK. Juntou-se à solução do agar uma solução de Cialite, a 1:50 na proporção de 1 cm³ por cada 100 cm³ da solução de Agar Difco. Utilizaram-se 10 cm³ de meio por cada placa de Petri e usaram-se os cortantes de FEINBERG (FEINBERG, 1958).

4.7.1. *Determinação do título do soro* — No soro obtido na primeira sangria, depois da primeira injeção no coelho e após se ter separado o soro do coágulo e centrifugado a 2 500 r. p. m. durante 10 minutos, para remoção dos glóbulos remanescentes, determinou-se o título do soro.

Ensaaiaram-se períodos de incubação de 40, 60 e 90 minutos à temperatura de 24° C e verificou-se ser o período de 60 minutos o mais apropriado para a determinação do título, que para este caso foi de 1:128. Voltou a repetir-se a determinação do título no soro colhido após a primeira injeção ou seja no dia em que se deu a segunda injeção para servir de termo de comparação com outros soros obtidos posteriormente. Procedeu-se da mesma forma chegando-se novamente a um título de 1:128. Determinou-se o título dos soros obtidos após a segunda injeção para observar a reacção do animal à introdução duma segunda dose de antigénio verificando-se inalterabilidade no título do soro do coelho até à morte deste ou seja 11 semanas após a segunda injeção.

Utilizou-se para antigénio o extracto de folhas de soja com vírus, ou vírus parcialmente purificado (Fig. 3). Paralelamente e como testemunha utilizaram-se extracto de folhas sãs e soro fisiológico, não se tendo observado qualquer reacção, nestas condições.

Na determinação do título dos soros obtidos a partir de cobaias inoculadas por via intramuscular, intradérmica e intraperitoneal, só esta última conduziu à formação de anticorpos para o Vírus do Mosaico da Soja tendo o soro o título de 1:32, mais baixo portanto do que o obtido em coelho.

Na determinação do título do soro pelo método da microreacção sob parafina líquida obteve-se igualmente para título o mesmo valor que o obtido em lâmina ou seja 1:128.

4.7.2. *Determinação do título do vírus em extracto* — Partiu-se de extracto de folhas de soja com sintomas de mosaico e cen-

trifugou-se a 6 000 r. p. m. durante 10 minutos. Utilizou-se antisoro diluído a 1:10 e nas testemunhas soro fisiológico. Fizeram-se diversos ensaios em lâmina, em que se obteve como título o valor máximo de 1:32 e o mínimo de 1:8. Na determinação do título, pelo método de microreacção sob parafina líquida verificou-se que o valor do título oscilava entre 1:16 e 1:32.

Para determinação do título do vírus no extracto de folhas de soja pela técnica de difusão usaram-se cortantes de FEINBERG, que permitem a colocação do anti-soro numa cavidade central e a colocação das diluições do antigénio em 4 ou 6 cavidades circundantes. Colocou-se o anti-soro 24 horas antes do antigénio. Passadas 24 horas após a colocação deste último nota-se a formação de linhas de precipitação, próximo das cavidades correspondentes às diluições do antigénio. Este ensaio não permitiu determinar o título do vírus em extracto pois a última diluição utilizada ou seja 1:8 ainda formou linha de precipitação. No ensaio seguinte usaram-se diluições até 1:32. Igualmente não se pode determinar o valor do título uma vez que na última diluição ou seja 1:32 ainda houve precipitação.

Procurou-se igualmente determinar pelo método de difusão em agar, se havia relações serológicas entre o Vírus do Mosaico da Soja e outros vírus. Efectuaram-se dois ensaios neste sentido.

No primeiro ensaio, colocou-se o anti-soro específico para o Vírus do Mosaico da Soja na cavidade central, colocando nas 4 cavidades circundantes e segundo o movimento dos ponteiros do relógio os seguintes antigénios: extracto de *Glycine soja* com Vírus do Mosaico da Soja, extracto de *Nicotiana tabacum* com Vírus X, extracto de *Nicotiana glutinosa* com Vírus Y, extracto de *Phaseolus vulgaris* com Vírus do Mosaico do Feijoeiro, previamente centrifugados a 5 000 r. p. m. durante 10 minutos.

O anti-soro e os antigénios foram colocados a difundir na mesma ocasião. Passadas 24 horas era visível uma linha de precipitação em correspondência ao extracto de soja, não se observando qualquer linha de precipitação em relação aos outros extractos (Fig. 4).

No segundo ensaio colocou-se o extracto de folhas de soja com vírus na cavidade central, e nas 4 cavidades circundantes, segundo o movimento dos ponteiros do relógio, os seguintes anti-soros; Soro para o Vírus do Mosaico da Soja não diluído, soro para o Vírus X, soro para o Vírus Y e soro para o Vírus do Mosaico do Feijoeiro os três diluídos a 1:10. Formou-se uma linha de precipitação em correspondência ao soro para o Vírus do Mosaico da Soja, não se tendo

observado qualquer linha de precipitação em correspondência aos outros soros, parecendo portanto não haver qualquer relação serológica entre estes vírus.

4.8. Domínio do vírus

4.8.1. Tratamentos térmicos à semente

Dada a transmissibilidade do Vírus do Mosaico da Soja pela semente, havia o maior interesse em ensaiar a possibilidade de por tratamentos térmicos, destruir o vírus na semente, de forma a estudar a aplicabilidade como rotina para obtenção segura de sementes isentas de vírus.

Fez-se um ensaio preliminar com sementes da cultivar Pecking proveniente de plantas com sintomas de mosaico submetendo-as a temperaturas entre 37° e 70° C durante 10 minutos. As sementes eram colocadas num frasco com água e mergulhadas no Ultratermostato NB - 59 548, tendo-se verificado que temperaturas de 65° C conduziam à perda de germinabilidade enquanto que temperaturas de 60° C não conseguiam destruir o vírus (Quadro VII).

QUADRO VII

EFEITO DA IMERSÃO EM AGUA QUENTE DURANTE 10 MINUTOS NA GERMINABILIDADE DA SEMENTE DA CULTIVAR PECKING E NO VIRUS

Temperatura (° C)	Germinação (A)	Mosaico (B)
37°	10/10	1/10
40	10/10	1/10
45	10/10	2/10
50	10/10	2/10
55	9/10	0/9
60	8/10	2/8
65	0/10	0/0
70	0/10	0/0
não tratadas	80/80	11/80

Notas: (A) Plântulas nascidas / Sementes utilizadas.

(B) Plântulas c/ mosaico / Plântulas nascidas.

Em face da temperatura que conduzia à perda da faculdade germinativa ser de 65° C procuramos no ensaio seguinte, submeter as sementes provenientes de plantas infectadas às temperaturas de 55°, 58° e 60° C, com tempos de tratamento de 30 e 60 minutos. O ensaio foi efectuado com as cultivares Pecking e Avoyelles.

O efeito do tratamento na faculdade germinativa da cultivar Pecking foi muito acentuado, reduzindo-a, conforme os casos, a cerca de 50 % e de 75 % em relação às testemunhas. A eficácia deste tratamento na inactivação do vírus não é apreciável uma vez que mesmo a 60° C durante 30 minutos ainda se obteve uma planta infectada entre as oito que nasceram do lote de vinte e cinco de que se partiu (Quadro VIII).

A faculdade geminativa da cultivar Avoyelles mostrou ser ainda muito mais afectada pelo tratamento do que a anterior. Todas as sementes perderam a faculdade germinativa, com uma única excepção verificada no tratamento a 55° C durante 30 minutos. Portanto o tratamento não pode considerar-se eficaz em face das suas consequências na faculdade germinativa e fraco poder na inactivação do vírus.

4.8.2. *Seleção de cultivares*

Devido ao facto de com os tratamentos térmicos não termos conseguido destruir o vírus na semente e haver um grande número de afideos com capacidade de transmissão, é conveniente, do ponto de vista agrícola, conhecer a reacção das cultivares ao vírus em estudo,

QUADRO VIII
EFEITO DA IMERSÃO EM AGUA QUENTE NA GERMINABILIDADE
DA SEMENTE E NO VIRUS

Cultivar	Temperatura (°C)	Duração (minutos)	Germinação (A)	Mosaico (B)
Pecking	55°	30	7/25	0/7
		60	12/25	1/12
	58	30	12/25	1/12
		60	6/25	0/6
	60	30	8/25	1/8
		não tratadas	—	116/125
Avoyelles	55	30	1/25	0/1
		60	0/25	0/0
	58	30	0/25	0/0
		60	0/25	0/0
	não tratadas	—	92/100	27/92

Notas: (A) Plântulas nascidas / Sementes utilizadas.

(B) Plântulas c/ mosaico / Plântulas nascidas.

Verificou-se um atraso na germinação das sementes sujeitas ao tratamento.



Fig. 3 — Observação ao microscópio da reacção Serológica (Tipo 2/3) entre o Virus do Mosaico da Soja parcialmente purificado e o anti-soro específico

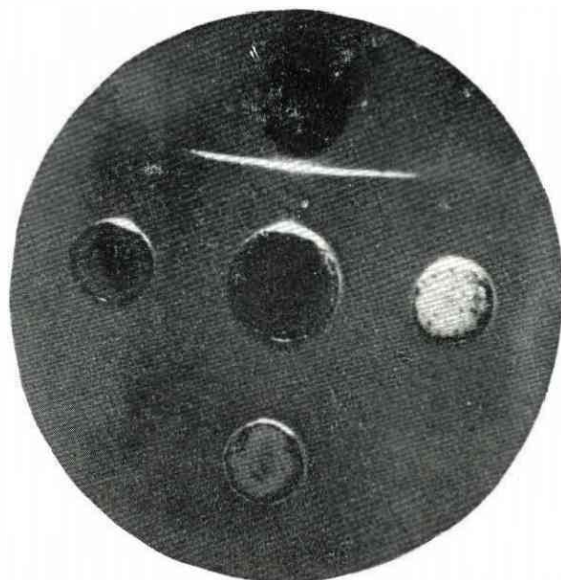


Fig. 4 — Difusão prévia do anti-soro para o Virus do Mosaico da Soja (cavidade central). Nas cavidades circundantes os seguintes antígenos: Virus do Mosaico da Soja, Virus X, Virus Y e Virus do Mosaico do Feijoeiro. Linha de precipitação correspondente ao Virus do Mosaico da Soja

e seleccionar cultivares resistentes como única via de limitar a doença no campo. Com esse fim procurou-se determinar o comportamento de 77 cultivares em relação ao Vírus do Mosaico da Soja. Como se tratava de um grande número, a realização do ensaio prolongou-se desde Fevereiro até Julho de 1961. Os ensaios sobre os cultivares da Estação Agronómica Nacional realizaram-se em 1960 em datas variadas. Atendendo-se ao facto de serem transmissíveis pela semente de soja diversos vírus, inclusivé o Vírus do Mosaico da Soja, procurou-se eliminar todas as plântulas infectadas provenientes da semente, bem como as plântulas com o primeiro par de folhas de conformação anómala. Inocularam-se em geral lotes de 25 plantas guardando para testemunhas de 5 a 10 plantas conforme o número disponível para cada cultivar. Anotou-se a sintomatologia, bem como o período de incubação e verificou-se que de todas as cultivares inoculadas mecânicamente só três, Bicolor de Calai, Large Seeded Tokyo e Mukden nunca apresentaram sintomas embora tivessem sido inoculadas 66,40 e 30 plantas respectivamente. A inoculação do extracto destas três cultivares a «Blackhawk» demonstrou não conterem o vírus, pondo-se assim de parte a possibilidade de serem porta-vírus sem sintomas.

As cultivares Creole, Haberland, Hahto, Herman, Hollybrook, Kingwa, Mammoth Yellow e Oakland (Quadro IX) apresentaram neste ensaio um número de plantas infectadas muito restricto, o que nos levou a repetir a inoculação mecânica dessas cultivares, com excepção de «Kingwa» e «Oakland» de que não se conseguiu novas plantas. Apenas duas plantas de «Haberland» apresentaram sintomas. Devemos notar que não conhecemos o grau de homogeneidade dos lotes de sementes das cultivares que nos foram fornecidos.

QUADRO IX

Cultivares	1.º Ensaio	2.º Ensaio
Creole	1/25 (*)	0/11 (*)
Haberland	3/25	2/31
Hahto	3/25	0/14
Herman	2/20	0/22
Hollybrook	2/25	0/19
Kingwa	2/41	—
Mammoth Yellow	1/9	0/33
Oakland	1/8	—

(*) Plantas infectadas / Plantas inoculadas.

O método de selecção baseado na inoculação mecânica não é o ideal para a selecção de cultivares resistentes, no caso de vírus transmissíveis por vectores biológicos.

Na impossibilidade de realizar ensaios no campo, procuramos fazer na estufa a transmissão do vírus com o afídeo *Myzus persicae* às cultivares que tinham apresentado maior resistência. Deu-se como período de infecção em «Blackhawk» meia hora e de transmissão em cada cultivar ensaiada uma hora. Para a transmissão à cultivar Bicolor de Calai, o período de infecção foi de 18 horas e de transmissão 24 horas. Como usualmente fez-se fumigação para a destruição dos afídeos e colocaram-se em seguida as plantas em estufa à prova de insectos, aguardando-se o aparecimento de sintomas. Paralelamente fez-se um ensaio na cultivar «Blackhawk» com 30 minutos e 1 hora para períodos de infecção e de transmissão. Ao fim de dez dias ou seja quando começaram a aparecer os trifoliolos, verificou-se infecção em todas as plantas da cultivar Blackhawk, mostrando-se nas outras cultivares os trifoliolos irregulares, com sintomas muito atenuados de mosaico rugoso. Em seguida pesquisou-se serologicamente o vírus nas plantas pelo método de difusão em agar (Quadro X). A reacção serológica permitiu-nos registar a presença do vírus num maior número de plantas do que o observado visualmente. Verificamos ainda que não havia, nas cultivares ensaiadas nenhuma que fosse imune ao vírus em estudo.

Em face de se não ter conseguido bons resultados com os tratamentos térmicos à semente e de não se ter encontrado nas culti-

QUADRO X

COMPORTAMENTO DE ALGUMAS CULTIVARES A TRANSMISSÃO PELO MYZUS PERSICAE

Cultivares	Plantas ensaiadas	Plantas com sintomas	Plantas com reacção serológica positiva
Bicolor de Calai	5	3	4
Large Seeded Tokyo	5	3	3
Mukden	4	1	3
Haberland	5	2	2
Herman	4	2	2
Kingwa	5	2	4
Mammoth Yellow	5	2	4
Oakland	5	1	2

vares ensaiadas nenhuma imune, faz-nos considerar que de momento só se pode contar para domínio desta enfermidade com algumas precauções durante a cultura. Neste sentido preconiza-se tal como HEINZE & KÖHLER (1940), a eliminação de todas as plantas infectadas nos campos destinados à produção da semente, isolamento das plantações destinadas a esse fim, extermínio dos afídeos vectores nas culturas de igual período vegetativo como a batateira, a faveira e outras leguminosas, eliminação das sementes abaixo do tamanho normal e duma maneira geral antecipação de sementeira na medida em que as condições meteorológicas e a cultivar de soja o permitam para que a cultura não coincida com a época de aparecimento dos insectos vectores.

5. Discussão e conclusões

Verificamos que o Vírus do Mosaico da Soja nas condições dos ensaios induziu infecções sistémicas não só em *Glycine soja* (L.) Sieb. et Zucc., mas também em *Canavalia ensiformis* D. C., *Mucuna deerigiana* (Bort.) Holl., *Mucuna utilis* Wallich e *Vicia narbonensis* L. Até esta data apenas HEINZE & KÖHLER (1940) tinham obtido infecções locais em *Phaseolus vulgaris* L. «Wachsdattel» e recuperado o vírus por inoculação retrógrada, mas só a partir das folhas inoculadas. QUANTZ (1961-62) indica também outros hospedeiros além da soja mas não ensaiou as espécies aqui mencionadas.

No que diz respeito à transmissão do Vírus do Mosaico da Soja por insectos, HEINZE & KÖHLER (1940) conseguiram-na com 8 espécies de afídeos: *Aphis fabae* Scop., *Aphis gossypii* Glover, *Aphis nasturtii* Kalt., *Myzus persicae* Laing, *Aulacorthum solani* Kalt., *Neomyzus circumflexus* Buckt. e *Macrosiphum euphorbiae* Thomas. CONOVER (1948) obteve transmissão com os afídeos *Acyrtosiphon pisum* Harris e *Myzus persicae* Sulz., esta já verificada pelos autores alemães. Nos ensaios que efectuámos, fez-se a transmissão com 13 espécies de afídeos compreendendo as 9 atrás indicadas e ainda: *Aphis craccivora* Koch, *Dactynotus sonchi* L., *Macrosiphum rosae* L. e *Megoura viciae* Buckt., até agora não mencionados como vectores do vírus. Das espécies citadas merece especial atenção *Myzus persicae* pois consegue transmitir o vírus após períodos de 5 minutos de alimentação tanto na planta doente como na sã, sem ser portanto necessário um período longo de incubação no vector. Das outras espécies

indicadas como vectores experimentais queremos destacar o aparecimento de *Aphis craccivora* num campo de soja.

Ensaio com o *Dactynotus sonchi*, *Megoura viciae* e *Macrosiphum rosae*, em especial estes dois últimos, devem ser aprofundados para se poderem tirar conclusões em definitivo.

Tentativas de transmissão com *Pseudococcus citri* Risso falharam. Semelhantemente outros autores não tinham obtido transmissão com outros insectos. Assim GARDNER & KENDRICK (1921), foram incapazes de obter a transmissão com Jassídeos e CONOVER (1948), não conseguiu transmissão com *Thrips tabaci* Lind.

Na transmissão por enxertia de encosto obtivemos sempre 100 % de transmissão verificando que bastava o simples contacto das partes feridas das plantas doentes e sãs para se dar a transmissão do vírus.

No estudo da transmissão do vírus pela semente de soja, verifica-se não haver qualquer relação entre a distribuição do vírus e a localização da semente na vagem ou com a inserção da vagem no caule. GARDNER & KENDRICK (1921) tinham obtido resultados similares no respeitante a esta última parte.

A sintomatologia do vírus em estudo variou amplamente e está dependente de dois factores: um, a cultivar, o outro, as condições ambientais, como as flutuações de temperatura, que tem um efeito marcante na manifestação de sintomas, conforme já havia verificado CONOVER (1948) que fez um estudo pormenorizado comparando os efeitos da temperatura na sintomatologia. Igualmente QUANTZ (1961-62) verificou o efeito da temperatura na manifestação de sintomas quer em soja, quer noutros hospedeiros.

No estudo das propriedades físicas do Vírus do Mosaico da Soja, os valores obtidos nos nossos ensaios para temperatura letal — 58° C — e longevidade «in vitro» — 2 a 3 dias — assemelham-se aos obtidos por PIERCE (1935). HEINZE & KÖHLER (1940) obtiveram 61° C para temperatura letal e 3 a 4 dias para longevidade «in vitro». CONOVER (1948) indica 64 a 66° C para temperatura letal e 4 a 5 dias como longevidade «in vitro». QUANTZ (1961-62) obteve 62° C para temperatura letal e 1 dia para longevidade «in vitro». No que diz respeito ao limite de diluição verificam-se igualmente diferenças. Assim o limite de diluição obtido nos nossos ensaios — 1:2000 — difere do de HEINZE & KÖHLER (1940) — 1:10 000; CONOVER (1948) não apresenta qualquer valor afirmando ter obtido resultados muito variáveis e QUANTZ (1961-62) — 1:1 000.

Conseguiu-se pela primeira vez a purificação do Vírus do Mosaico da Soja que até aqui, que tenhamos conhecimento ainda não tinha sido efectuada, tendo seguido a marcha de WETTER (1960) modificada.

Ao Microscópio Electrónico pelo método de contacto com metalização, observaram-se partículas em forma de bastonetes flexíveis com 744 m μ de comprimento, confirmando-se assim a localização no grupo 11 de BRANDES & WETTER (1959) ou seja no de 750 m μ como comprimento padrão. QUANTZ (1961-62) indica ter obtido 748 m μ para comprimento médio.

Com o vírus parcialmente purificado obtivemos por inoculação num coelho, um anti-soro de título 1:128, que nos permitiu detectar o vírus em Soja. MATTHEWS (1957), por comunicação pessoal de WATSON; indica a existência de um anti-soro para soja obtido a partir de suco fresco, não dando qualquer indicação quanto ao título. O título do vírus em extracto determinado serologicamente variou nos ensaios, tendo-se obtido como limite mínimo 1:4 e como limite máximo 1:32.

Os tratamentos térmicos à semente com o fim de eliminar o vírus não foram eficazes, pois a temperatura máxima que não inibe a faculdade germinativa não tem acção na destruição do vírus.

No ensaio que se realizou a fim de seleccionar cultivares resistentes ao vírus, verificou-se haver cultivares resistentes à inoculação mecânica. Essas mesmas cultivares comportaram-se como susceptíveis à transmissão por afídeos ou por enxertia.

6. Agradecimentos

A Missão de Estudos Agronómicos do Ultramar na pessoa do seu Chefe Engenheiro Agrónomo Lains e Silva, agradecemos o interesse e as possibilidades que nos facultou na execução deste trabalho.

Ao Director da Estação Agronómica Nacional, reconhecidos ficamos por nos ter permitido a sua realização no Departamento de Fito-patologia.

Ao Prof. Branquinho de Oliveira, Chefe do referido Departamento, bem como à Ex.^{ma} Sr.^a Dr.^a Maria de Lourdes de Oliveira, queremos expressar os nossos melhores votos de agradecimento pela sugestão do tema e conselhos que tão amavelmente nos dispensaram.

Ao Dr. J. Brandes do Institut für landwirtschaftliche Virusforschung, de Braunschweig, ficamos a dever a gentileza das observações e medições das partículas ao Microscópio Electrónico e a amabilidade com que nos atendeu.

Ao Prof. Eng. João Carvalho e Vasconcelos, ao Eng. Agrónomo Fernando Albano Iharco e aos Drs. Henrique Simões e Miguel Neves, agradecemos a amabilidade com que sempre nos atenderam e os valiosos esclarecimentos prestados.

Exprimimos muito particularmente a nossa mais viva gratidão à Ex.^{ma} Sr.^a Dr.^a Maria de Lourdes Borges sob a orientação de quem trabalhamos pela inestimável ajuda que se dignou dispensar-nos.

RESUMO

A partir de diversas cultivares de soja (*Glycine soja* (L.) Sieb. et Zucc.), existentes nos campos de cultura, em Oeiras, colheram-se 20 amostras em 11 das quais se identificou o *Vírus do Mosaico da Soja* (Soybean Mosaic Virus, GARDNER & KENDRICK, 1921).

Usou-se para estudo desse vírus o isolamento proveniente da cultivar «Hispidá» cujos sintomas no campo consistiam em Mosaico e distorção foliar. Manteve-se o vírus na estufa por infecções sucessivas de Soja «Blackhawk».

A identificação do vírus baseou-se na transmissibilidade, sintomatologia, propriedades físicas «in vitro» e características morfológicas das partículas observadas ao Microscópio Electrónico.

Verificou-se que o vírus é facilmente transmitido à Soja por inoculação mecânica com o auxílio de carborundo, como abrasivo.

Conseguiu-se pela primeira vez a transmissão a *Canavalia ensiformis* D. C., *Mucuna deeringiana* (Bort.) Holl., *Mucuna utilis* Wallich e *Vicia narbonensis* L. A transmissão a esta última espécie obteve-se nas mesmas condições usadas para a transmissão à Soja. As outras só se tornaram possíveis pela adição de tampão na obtenção do extracto. Submeteram-se as plantas a inocular a um período prévio de obscuridade sem qualquer influência na transmissão.

Nos ensaios de transmissão por afídeos comportaram-se como vectores: *Myzus persicae* Sulz., *Myzus ornatus* Laing, *Aulacorthum solani* Kalt., *Acrytosiphon pisum* Harris, *Neomyzus circumflexus* Buckton, *Megoura viciae* Buckton, *Dactynotus sonchi* L., *Macro-*

siphum euphorbiae Thomas, *Macrosiphum rosae* L., *Aphis craccivora* Koch, *Aphis fabae* Scop., *Aphis gossypii* Glover, *Aphis nasturtii* Kalt. As espécies: *Megoura viciae* Buckton, *Dactynotus sonchi* L., *Macrosiphum rosae* L. e *Aphis craccivora* Koch. ainda não estavam indicadas como vectores do vírus. Não se conseguiu transmissão por *Pseudococcus citri* Risso.

Transmitiu-se o Vírus por enxertia de encosto, verificando-se não ser necessária a ligação dos tecidos.

Observou-se haver comportamento diferente na transmissão do vírus pela semente de diversas cultivares. O vírus transmitiu-se em percentagem mais elevada nas cultivares «Yogetu» e «Harold» e mais baixa em «Glasman», «Pecking» e «Wabask». Parece não haver qualquer relação entre o vírus e a localização da semente na vagem ou da vagem no caule da planta.

O vírus nas condições ensaiadas tem uma temperatura letal de 58° C, mantém a infeciosidade 2 a 3 dias no extracto de planta mantido à temperatura ambiente e tem um limite de diluição de 1:2 000.

Purificou-se pela primeira vez o Vírus do Mosaico da Soja para o que se usou o método seguido por WETTER (1960), modificado. Aplicou-se na obtenção de um anti-soro específico, que apresenta o título de 1:128.

O título do vírus no extracto de Soja determinado serológicamente oscilou entre 1:4 e 1:32.

As partículas observadas ao Microscópio Electrónico apresentam-se em forma de bastonetes flexíveis com 744 m μ de comprimento.

Tratamentos térmicos a sementes de soja provenientes de plantas infectadas, não permitiram libertá-las do vírus.

Na selecção do cultivares resistentes, notou-se que «Bicolor de Calai», «Larged Seeded Tokyo» e «Mukden» são refractárias à infecção por inoculação mecânica, mas após transmissão por afídeos comportam-se como tolerantes, não apresentando no entanto sintomas evidentes.

SYNOPSIS

From various soybean varieties (*Glycine soja* (L.) Sieb. et Zucc.) under cultivation at Oeiras, 20 samples were taken on 11 of which soybean mosaic virus (Soybean Mosaic Virus, Gardner & Kendrick, 1921) was identified.

From the variety «Hispidá» which on field conditions showed such symptoms as mosaic, twisting and curling of the leaves, an isolate was made and used to study that virus.

Identification of the virus was based on the transmissibility, physical properties *in vitro* and morphological characteristics of the particles observed at the Electronic Microscope.

It was verified that the virus is easily transmitted to soybean by mechanical inoculation, with carborundum as an abrasive.

Transmission of the virus to *Canavalia ensiformis* D. C., *Mucuna deeringiana* (Bort.) Holl., *Mucuna utilis* Wallich and *Vicia narbonensis* L., was accomplished for the first time. Transmission to the latter species was obtained in the same conditions as for soybean. With the other species, however, a buffer solution had to be added to the extract for successful transmission of the virus. The plants to be inoculated were previously submitted to a period in darkness, which had no influence on transmission.

In trials of transmission by Aphides, *Myzus persicae* Sulz., *Myzus ornatus* Laing., *Aulacorthum solani* Kalt., *Acrytosiphon pisum* Harris, *Neomyzus circumflexus* Buckton, *Megoura viciae* Buckton, *Dactynotus sonchi* L., *Macrosiphum euphorbiae* Thomas, *Macrosiphum rosae* L., *Aphis craccivora* Koch, *Aphis fabae* Scop., *Aphis gossypii* Grover, *Aphis nasturtii* Kalt, acted as vectors. The species: *Megoura viciae* Buckton, *Dactynotus sonchi* L., *Macrosiphum rosae* L. and *Aphis craccivora* Koch had not yet been reported as vectors. Transmission by *Pseudococcus citri* Risso was not successful.

Transmission of the virus was made by approach grafting, it having been verified that union of the tissues is not necessary to accomplish transmission.

Differences were observed in the process of transmission by the seed of some varieties. The «Yogetu» and «Harold» varieties showed the highest percentage of virus transmission and the «Glasman», «Pecking» and «Wabask» the lowest. There seems to be no correlation between the virus and the position of the seed in the pod, or of the pod on the plant stem.

For the conditions under which the trials were carried out, thermal inactivation point was at 58° C, the virus maintained its virulence 2-3 days at room temperature, and dilution point was 1:2 000.

Purification of the soybean mosaic virus was made for the first time, using Wetter's method, slightly modified, for the obtention of an anti-serum with a 1:128 precipitation titre.

The highest virus titre in soybean extract ranged from 1:4 to 1:32.

Seen at the Electronic Microscope the particles have the appearance of flexible rods 744 m μ long.

Thermic treatments applied to the seed of infected soybean plants did not succeed in making them virus-free.

While selecting varieties for resistance it was noted that «Bicolor de Calai», «Large Seeded Tokyo» and «Mukden» are not susceptible to mechanical inoculation; however, after transmission by Aphides they show some tolerance to the virus without presenting evident symptoms of the disease.

BIBLIOGRAFIA

AITKEN, Y. & GRIEVE, B.

- 1943 A mosaic virus of subterranean clover. *J. Aust. Inst. agric. Sci.* 9:81-82 (in *Rev. appl. Mycol.* 22:485).

ALLINGTON, W. B.

- 1946 Bud blight of soybean caused by the tobacco ringspot virus. *Phytopathology* 36:319-322.

—; MOORHEAD, ELLEN L. & STAPLES, R.

- 1960 Alfafa mosaic virus in soybean. (Abs.) *Phytopathology* 50:627.

BANCROFT, J. B.; TUITE, J. & HISSONG, G.

- 1960 Properties of white clover mosaic virus from Indiana. *Phytopathology* 50:711-717.

BAUDYS, E.

- 1931 (Phytopathological Notes VII) (em Checoslovaco). *Ochr. Rost.* 11:178-197. (in *Rev. appl. Mycol.* 11:424).

BAWDEN, F. C.; CHAUDURI, R. P. & KASSANIS, B.

- 1951 Some properties of Broad-bean mottle virus. *Ann. appl. Biol.* 38:774-783.

BERKELEY, G. H.

- 1947 A strain of the alfafa mosaic virus on pepper in Ontário. *Phytopathology* 37:781-789.

BLENCOWE, J. & CALDWELL, J.

- 1949 Aspermy, a new virus disease of the tomato. *Ann. appl. Biol.* 36:320-322.

- BOS, L.; HAGEDORN, D. J. & QUANTZ, L.
1960 Suggested procedures for International Legume virus identification. *Tijdschr. PlZiekt.* 66:328-343.
- BRASSE, M. K.
1958a Density gradient centrifugation and its application to plant viruses. *Advanc. Virus Res.* 7:193-224.
1958b Properties, assay and purification of wheat streak mosaic virus. *Phytopathology* 48:439-445.
- BRANDES, J.
1957 Eine elektronenmikroskopisch schnellmethode zum Nachweis faden und Stäbchenförmiger viren, insbesondere in Kartoffel dunkelkelmen. *NachrBl. dtsh. PflSchDienst. Stuttgart.* 9:151-152 (in *Rev. appl. Mycool.* 37:244-245).
- & WETTER, C.
1959 Classification of elongated plant viruses on the basis of particle morphology. *Virology* 8:99-115.
- BRENNER, S. & HORNE, R. W.
1959 A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. biophys. Acta* 34:103-110.
- CHAMBERLAIN, E. E.
1939 Pea streak (*Pisum virus 3*). *N. Z. J. Sci. Tech.* 20A:365-381.
- CLINTON, G. P.
1916 Notes on plant diseases of Connecticut. *Rep. Conn. agric. Expt. Sta.* 1915:446-447 (fide GARDNER & KENDRICK, 1921).
- CONOVER, R. A.
1948 Studies of two viruses causing mosaic diseases in soybean. *Phytopathology* 38:724-735.
- COOPER, W. E.
1949 Top necrosis, a virus disease of guar. *Phytopathology* 39:347-358.
- COSTA, A. S.
1944 Quantitative studies with carborundum and its use in local — lesion tests. *Phytopathology* 34:288-300.
- DICKSON, B. T.
1924 Mosaic studies IV (Abs.) *Phytopathology* 14:346.

DOOLITTLE, S. P.

- 1920 The mosaic disease of cucurbits. *U. S. Dep. Agric. Bul.* 879 (fide SMITH, 1957).

DUNIN, M. S. & POPOVA, N. M.

- 1937 (The drop method of virus diagnosis in plant husbandry) (em russo). *State Publ. Off. Lit. collect. co. op. Farming «Selkhozgiz». Moscow* 48 pp. (in *Rev. appl. Mycol.* 17:762).

FEINBERG, J. G.

- 1958 Specific titration of biological solutions in agar gel plates. *Fourth International Congress of Biological Standardization, Brussels* : 194-221.

GARDNER, M. W. & KENDRICK, J. B.

- 1921 Soybean mosaic, *J. agric. Res.*, 22:111-114.

GRANCINI, P.

- 1941 Il «mosaico» della Soja. *Avvenire agric.* 48:231-235. (fide KREITLOW & al. 1957).

HAGEDORN, D. S. & QALKER, J. C.

- 1949 Wisconsin pea streak. *Phytopathology* 39:837-847.

HANSFORD, C. G.

- 1934 Annual Report of Mycologist, 1933. *Rep. Agric. Dep. Uganda 1933*: 48-51 (on *Rev. appl. Mycol.* 14:81-82).

HEINZE, K. & KÖHLER, E.

- 1940 Die Mosaikkrankheit der Sojabohne und ihre Übertragung durch Insekten. *Phytopath. Z.* 13:207-242.

JOHNSON, J.

- 1936 Tobacco streak, a virus disease. *Phytopathology* 26:285-292.

KENDRICK, J. B. & GARDNER, M. W.

- 1924 Soybean mosaic: seed transmission and effect on yield. *J. agric. Res.* 27:91-98.

KÖHLER, E. & KLINKOWSKI, M.

- 1954 Viruskrankheiten (in: *Handbuch der Pflanzenkrankheiten* P. Sorauer). Paul Parey, Berlin.

KREITLOW, K. W. & PRICE, W. C.

- 1949 A new virus disease of ladino clover. *Phytopathology* 39:517-528.

—; BOYD, HELEN C.; CHAMBERLAIN, D. W. & DUNLEAVY, J. M.

- 1957 A bibliography of Viruses infecting soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Plant Dis. Repr.* 41:579-588.

Le BEAU, F. J.

- 1947 A virus induced top necrosis in beans. (Abs.) *Phytopathology* 37:434.

LIHNELL, D.

- 1939 (Some observations concerning soybean diseases in our country). (em sueco). *Värtskyddsnotiser Stockh.*, 4-5:69-73 (in *Rev. appl. Mycol.* 19:192).

MATTHEWS, R. E. F.

- 1957 *Plant virus serology*. University Press. Cambridge. London.

MURATA, T.

- 1925 Soybean mosaic (em japonês). *J. Pl. Prot. Tokyo* 12:451-452 (fide KREITLOW et al., 1957).

OUCHTERLONY, O.

- 1948 Antigen-antibody reactions in gels. *Ark. Kemi. Min. Geol.* 26. (fide OUCHTERLONY, 1949).

- 1949 An «in vitro» test on the toxin producing capacity of *Corynebacterium Diphtherine*. *Lancet* 256:346-349.

PIERCE, W. A.

- 1935 The identification of certain viruses affecting Leguminous plants. *J. agric. Res.* 51:1017-1039.

QUANTZ, L.

- 1961-62 Untersuchungen über das Gewöhnliche Bohnenmosaikvirus und das Sojamosaikvirus. *Phytopath. Z.* 43:79-101.

RAWLINS, T. E. & TOMPKINS, C. M.

- 1936 Studies on the effect of carborundum as an abrasive in plant virus inoculation. *Phytopathology* 26:578-587.

SAMSON, R. W. & IMLE, E. P.

- 1942 A ringspot type of virus disease of tomato. *Phytopathology* 32:1037-1047.

SAYULESCU, T.; SANDU-VILLE, C.; RAYSS, T. & ALEXANDRI, A. V.

- 1935 (Phytosanitary conditions in Rumania during the year 1933-34) (em romeno). *Inst. Cerc. Agron. Romanei Publ.* 24:59 pp. (in *Rev. appl. Mycol* 15:201-202).

SHAPOVALOV, M.

- 1935 Graft versus insect transmissions of curly top in tomatoes (Tomato yellows). *Phytopathology* 25:844-853.

SINHA, R. C.

- 1960 Red clover mottle virus. *Ann. appl. Biol* 48:742-748.

SKOTLAND, C. B.

1958 Bean pod mottle virus of soybeans. *Plant. Dis. Repr.* 42:1155-1156.

SMITH, K.

1957 *A textbook of Plant Virus Diseases*. J. & A. Churchill Ltd. London.

———, & BALD, J. B.

1935 A description of a necrotic virus disease affecting tobacco and other plants. *Parasitology* 27:231-235. (Fide SMITH, 1957).

THOMAS, H. R.

1951 Yellow dot, a virus disease of bean. *Phytopathology* 41:967-974.

——— & ZAUMEYER, W. J.

1950 Red node, a virus disease of beans. *Phytopathology* 40:832-846.

VAN SLOGETREN, D. H. M.

1954a Serological microreactions with plant virus under paraffin oil. *Proc. 2nd Conf. Potato Virus Diseases Lisse-Wageningens 1954*:51-54.

WALTERS, H. J.

1958 A virus disease complex in soybean in Arkansas. *Phytopathology* 48:346.

WETTER, C.

1960 Partielle Reinigung einiger gestreckter Pflanzenviren und ihre verwendung als Antigen bei der Immunisierung mittels Freundschem Adjuvans. *Arch. Mikrobiol.* 37:278-292.

YU, T. F.

1939 A list of plant viroses observed in China. *Phytopathology* 29:459-461.

ZAUMEYER, W. J.

1938 A streak disease of peas and its relation to several strains of alfafa mosaic virus. *J. agric. Res.* 56:747-772.

——— & HARTER, L. L.

1943 Two new virus diseases of beans. *J. agric. Res.* 67:297-320.

——— & PATINO, G.

1960 Vein necrosis, another systemically infectious strain of alfafa mosaic virus in bean. *Phytopathology* 50:226-231.

ANÓNIMO

1957 Common names of virus diseases used in the Review of Applied Mycology. *Suppl. Rev. appl. Mycol.* 35, 78 pp.

