

MÉTODO ALTERNATIVO DE PURIFICAÇÃO DO VÍRUS DO MOSAICO-COMUM DO FEIJOEIRO^{1/}

Eunize Maciel Zambolim ²
Murilo Geraldo de Carvalho ²
Kiyoshi Matsuoka ²

1. INTRODUÇÃO

A imunização de animais com fitovírus, em preparações purificadas em alto grau, parece ser um requisito indispensável à utilização das modernas técnicas de investigação, baseadas no uso de anti-soros ou nos seus anticorpos purificados.

O vírus do mosaico-comum do feijoeiro, VMCF, é difícil de ser purificado satisfatoriamente. Esse vírus está presente em baixas concentrações no feijoeiro multiplicador e existe a tendência de as partículas se agregarem irreversivelmente uma vez fora da célula vegetal. Num dos trabalhos iniciais com o vírus, em 1959, Berks, citado por BOS (2), concentrou-o «por meio de um ciclo de centrifugação diferencial seguido de uma centrifugação a baixa velocidade angular, clarificação com éter, outra centrifugação baixa e diálise contra 0,85% de NaCl». Em 1962, SCOTT (12) purificou-o parcialmente a partir da extração em clorofórmio, n-butanol, tampão de fosfato neutro a 0,2 M (2:2:1/v:v:v) por grama de folha de feijoeiros 'Refugee', a que se seguiram ciclos de centrifugação diferencial. Os «pellets» foram dissolvidos em tampão de fosfato a 0,01 M. Mais recentemente, MEINERS *et alii* (9), valendo-se de um roteiro de purificação sugerido para o vírus do mosaico-amarelado do feijoeiro, BYMV, purificaram-no parcialmente, empregando tetracloreto de carbono e clorofórmio na extração, a partir de folhas tritoladas de 'S. G. Refugee'.

^{1/} Parte da tese de «Magister Scientiae» do primeiro autor, apresentada à Universidade Federal de Viçosa, MG.

Aceito para publicação em 12-3-1986.

² Departamento de Fitopatologia da U.F.V. 36570 Viçosa, MG. Os três autores são bolsistas do CNPq.

ultracentrifugação em gradiente de sacarose e uma ultrafiltração final. As preparações finais continham estruturas vegetais contaminantes.

DAMIRDAGH e SHEPHERD (5) verificaram que a presença de uréia e 2-mercaptopropano (2-ME) nos tampões de extração e de ressuspensão reduziu substancialmente a agregação das partículas do vírus do «etch» do tabaco e de outros «potyvirus». Observaram, ainda, que o polietilenoglicol («PEG») pode ser muito útil nas purificações, visto possibilitar a concentração inicial do vírus no homogeneizado clarificado. JAFARPOUR SHEPHERD e GROGAN (7), utilizando método semelhante ao empregado no trabalho anterior, obtiveram preparações finais do VMCF aparentemente livres de contaminantes. MORALES (10), adaptando o método desenvolvido por Hiebert e MacDonald para outros «potyviruses», conseguiu preparações do VMCF aparentemente puras e de bom rendimento.

A planta multiplicadora, o tampão de extração e o método de clarificação empregados são fatores básicos para o sucesso da purificação. MARAMAROSH e KOPROWSKI (8) recomendaram tampão de borato com pH moderadamente elevado, acrescido de etilenodiamina tetracetato de sódio (EDTA), para evitar agregação de vírus de partículas flexuosas e alongadas. VAN OOSTEN (14), na purificação de «plum pox vírus» um «potyvirus», utilizou Triton X-100 para clarificar o extrato, obtendo um produto final aparentemente livre de contaminantes. CARVALHO e SHEPHERD (3) obtiveram bons rendimentos de um «potyvirus» no alho e de outro na cebola, adotando, em princípio, tampão de borato e valores de pH moderadamente elevados nas sucessivas etapas da purificação, além do uso constante de uréia, a 0,5 M. Submeteram os vírus, após a primeira ultracentrifugação, a duas exposições de EDTA a 1mM, intercaladas com ciclos de centrifugação diferencial, com a ultracentrifugação em almofada de sacarose. Com essa etapa, objetivavam eliminar, em grande parte, ribossomos e macromoléculas de origem celular e assim facilitar a completa remoção de contaminantes residuais durante a subsequente ultracentrifugação isósmica final, em cloreto de césio.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Fonte, Identidade e Manutenção in vivo e in vitro dos Isolados Virais

Foram utilizados um isolado do VMCF, do «ATCC» (American Type Culture Collection), cedido pelo Dr. R.J. Shepherd, do Departamento de Fitopatologia da Universidade da Califórnia, E.U.A., e um isolado do vírus «IAC», proveniente do Instituto Agronómico de Campinas, São Paulo.

A estirpe «ATCC» e o isolado «IAC» foram mantidos «in vivo» no cultivar 'Santana', escolhido por sua pronta disponibilidade e por apresentar rapidamente sintomas evidentes de infecção: áreas amarelecidas e delimitadas pelas nervuras finas nas folhas primárias inoculadas e mosaico, epinastia e bolhas nas trifoliadas.

Folhas primárias do cultivar 'Santana' com sintomas típicos e evidentes de mosaico foram finamente cortadas e os fragmentos foram mantidos, por 48 h, a 4°C, no fundo de placa de Petri, em dessecador com sílica gel. Posteriormente, os fragmentos foram colocados sobre uma camada de algodão, sobreposta a outra, de sílica gel, no interior de pequenos frascos cilíndricos. Estes, após vedação e rotulagem, foram armazenados a -18°C. Para realizar o trabalho e para manter a pureza e a uniformidade dos isolados, esse estoque «in vitro» foi empregado, com intervalo de seis meses, nas inoculações de manutenção «in vivo».

2.2. Multiplicação dos Isolados Virais

As sementes de 'Santana' foram rotineiramente germinadas em caixas de areia. Posteriormente, foram transferidas quatro plantas por vaso de quatro litros, com terra e esterco, na proporção de 3:1, previamente tratados com brometo de metila, por 72 h. Essa providência visou obter plantas de tamanho uniforme na época de inoculação. Aproximadamente no oitavo dia do transplantio, as plantas mantidas em casa de vegetação foram inoculadas mecanicamente. Os extratos foram obtidos de fragmentos de folíolos das folhas trifoliadas de 'Santana' infectadas com «ATCC» ou com o isolado «IAC» e trituradas em tampão de fosfato a 0,05 M, pH 7,3, com sulfito de sódio, a 0,01 M. Na inoculação, correu-se suavemente o inóculo com gaze nas folhas primárias, previamente polvilhadas com carborundum 600 mesh. A seguir, as folhas inoculadas foram lavadas com água, para a remoção do excesso de inóculo.

O procedimento descrito foi repetido com intervalos semanais, mantendo-se, assim, a disponibilidade das folhas para o processo de purificação. Inicialmente, apenas folhas trifoliadas com sintomas de mosaico, epinastia e bolhas foram colhidas, 21 dias após a inoculação, e utilizadas na purificação. Posteriormente, apenas folhas primárias foram utilizadas porque, aparentemente, proporcionavam maior rendimento de vírus.

Os feijoeiros 'Santana' inoculados com «IAC» ou com «ATCC» foram mantidos em mesas separadas no mesmo compartimento da casa de vegetação.

2.3. Purificação do Vírus

«IAC» e «ATCC» foram inicialmente purificados a partir de folhas primárias e trifoliadas, seguindo o método proposto por CARVALHO e SHEPHERD (3) para o vírus do nanismo-amarelo da cebola. O método consistiu na extração do vírus em tampão de borato, clarificação com Triton X-100, centrifugação diferencial, entre tratamentos com EDTA, ultracentrifugação sobre almofada de sacarose, a 20%, estabilização das partículas com aldeído fórmico e ultracentrifugação isopícnica em CsCl, seguida de diálise.

Esse método, inicialmente adotado, foi modificado, visto não ter proporcionado preparações de rendimento viral satisfatório. O VMCF foi então purificado a partir de folhas primárias refrigeradas por 12 horas e trituradas em liquidificador na presença de tampão de borato 0,2 M, pH 8,3, acrescido de 2-ME a 0,15% e EDTA 0,01 M. O extrato foi filtrado em gaze e centrifugado a 5×10^3 g, por 15 minutos, e o sobrenadante foi clarificado com a adição de Triton X-100 a 2% (v/v). Após duas horas de agitação lenta, o pH da suspensão foi ajustado para 7,3, com ácido bórico a 0,2 M; a seguir, foi adicionado «PEG» a 6% (p/v), para concentrar o vírus no extrato. Após horas de agitação lenta, foi acrescentado cloreto de sódio a 0,5% (p/v) à suspensão floculada, para estimular a precipitação do vírus. Após 15 minutos de agitação, o vírus foi concentrado, mediante centrifugação a 2×10^4 g, por 15 minutos. O sedimento foi imediatamente ressuspenso em 1/5 do volume inicial em tampão de borato 0,05 M, acrescido de uréia 0,5 M, EDTA 6 mM e 2-ME a 0,1%, ficando em repouso durante 12 horas, antes de ser centrifugado a 9×10^3 g, por 10 minutos. O sobrenadante foi então ultracentrifugado sobre almofada de sacarose a 20%, em tampão de borato/uréia/2ME/EDTA a 2 mM/a $4,4 \times 10^4$ g, por 2 horas e 45 minutos. O pélete foi ressuspenso durante 15 horas. Após centrifugação a 6×10^3 g, por 10 minutos, o sobrenadante foi ultracentrifugado a 1×10^5 g, por 24 horas, em coluna de cloreto de céssio, em solução preparada com camadas superpostas de 1,3, 1,5 e 1,7 mg/ml de CsCl, dissolvido em tampão de borato/

EDTA/2ME. A banda opalescente formada pelo vírus foi retirada em sala escurecida, com o auxílio de uma seringa hipodérmica, com luz fluorescente incidente em ângulo, por baixo. O material recolhido foi ultracentrifugado a $7,4 \times 10^5$ g/90 minutos e o pélete foi ressuspensão no tampão de borato/uréia.

2.4. Avaliação da Qualidade e do Rendimento do Vírus Purificado

Os espectros de absorção das soluções que continham vírus purificado foram avaliados no espectrofotômetro PERKIN-ELMER UV-VIS, modelo 111. As leituras foram feitas entre os comprimentos de onda de 230 e 320 nm. Foram calculadas as razões entre as absorções máxima e mínima e as absorções em 280 e 261 nm, quocientes que auxiliaram na avaliação da pureza das soluções virais.

A concentração do vírus purificado foi estimada, dispondo-se da absorção em 261 nm e admitindo-se o coeficiente de extinção ($E_{261}^{1\text{cm}} = 0,1\%$) de 2,4 mg vírus/ml para o vírus do «etch» do tabaco (7) como aplicável ao VMCF.

Com o fim de detectar visualmente as impurezas e fotografar partículas de vírus, as preparações virais purificadas foram examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão ZEISS EM 109, em 50 kv, após contrastação com fosfotungstato de potássio a 2%, pH 6,8.

2.5. Preparo do Anti-Soro e Determinação do Título

Para a produção de anti-soros ao VMCF-ATCC foram inimunizados coelhos brancos, da raça Nova Zelândia, a partir de três meses de idade, mantidos em gaiolas metálicas. Os animais receberam ração balanceada que continham antibiótico. Coletou-se soro normal antes da primeira injeção.

Para a imunização, vias intramuscular e intravenosa, foram utilizadas, como imunógeno, partículas do VMCF-ATCC, obtidas segundo o método descrito em 2.3.

A primeira imunização consistiu em duas injeções da solução viral, uma intravenosa, em solução salina, e outra intramuscular, na coxa, emulsificada em volume igual de adjuvante incompleto de Freund, obtido do Instituto Adolf Lutz, de São Paulo. A seguir, foram aplicadas duas injeções intramusculares, com intervalos de sete dias. As quantidades de vírus aplicadas intramuscularmente, por vez, foram estimadas entre 0,8 e 1 mg.

As sangrias foram iniciadas 20 dias após a primeira injeção. Do animal em jejum de 12 horas eram coletados 30 ml de sangue através de pequenos cortes na veia marginal da orelha. O sangue era mantido em banho-maria, a 37°C, por 45 minutos, para estimular a coagulação, procedendo-se então à retirada do coágulo. Em seguida, centrifugava-se o soro a $2,2 \times 10^4$ g, por 10 minutos. O anti-soro, geralmente de cor palha, era acondicionado em frascos cilíndricos pequenos, em volumes iguais, e armazenado em congelador, para uso posterior.

Na imunização por via intramuscular, no músculo coxim-plantar, foram utilizadas partículas do VMCF-ATCC como imunógeno. A preparação viral foi emulsificada em adjuvante completo de Freund, em proporções iguais (v/v). Inicialmente, foram injetados 3 mg de vírus no segundo dedo da pata traseira. A segunda injeção, de 2 mg, foi aplicada, 15 dias após, na outra pata. Adotou-se o mesmo procedimento para a sangria, preparo e acondicionamento dos anti-soros.

Num círculo de papel celofane quadriculado (1), ajustado a toda a superfície do fundo de uma placa de Petri, foram colocadas as diluições de 1:2 a 1:1024 de cada anti-soro. Empregou-se salina tamponada com tris-HCL a 0,05 M, pH 7,3, nas

diluições. Para cada quadrícula, foram pipetados 20 μl de cada diluição, aos quais foram acrescentados 20 μl do antígeno purificado, a 0,5 mg/ml. O anti-soro e o antígeno foram misturados com palito de madeira e a placa permaneceu em banho-maria, a 40°C, por uma hora ou mais, no interior de uma placa maior, saturada de umidade. As leituras foram efetuadas em binocular estereoscópica, contra fundo escuro. Soro normal, nas diluições de 1:2 a 1:16, na referida salina tamponada, foi utilizado como controle.

3. RESULTADOS E DISCUSSAO

3.1. Purificação do Virus

As várias tentativas de purificar o VMCF a partir das folhas trilioladas foram insatisfatórias, possivelmente porque o vírus se multiplicava pobramente nessas folhas. Observou-se que as folhas primárias mostravam um sintoma distinto, que consistia em áreas amarelecidas, delimitadas pelas nervuras, e bem evidentes 10 a 12 dias após a inoculação. Em razão disso, passaram a ser preferidas como multiplicadoras exclusivas do VMCF destinado às purificações, substituindo as trilioladas. Os resultados dessa orientação justificaram a escolha, no que também concordaram as observações de SCOTT (12), e de MORALES (10), com esse vírus. Contudo, a opção pelas folhas primárias não foi suficiente, por si só, para que se obtivessem rendimentos satisfatórios de vírus no final das purificações. A banda viral formada após a ultracentrifugação em CsCl, embora se mostrasse típica de um «potyvirus», quando submetida à análise espectrofotométrica, revelou baixos rendimentos, em decorrência, talvez, da eliminação de partículas virais agregadas durante as breves centrifugações subsequentes à ressuspensão do vírus pelletizado.

Segundo van der Want, citado por BOS (2), a maioria das partículas do VMCF sedimenta com os cloroplastos durante as baixas centrifugações, sobretudo por se agregarem lateralmente. Procurou-se reduzir a quantidade de partículas agregadas com o uso de um redutor, 2-mercaptoetanol (2-ME), a 0,15%, no tampão de extração. Na ausência de um redutor eficiente já se observara ligeiro escurecimento do sobrenadante logo após a primeira baixa centrifugação.

DAMIRDAGH e SHEPHERD (5) relataram que a ureia e o 2-ME presentes no tampão de ressuspensão foram eficientes em reduzir a agregação das partículas do vírus do «etch» do tabaco ao mínimo, enquanto na ausência desses compostos as partículas se agregaram fortemente. Essa orientação foi também adotada aqui, para o VMCF, como fizeram CARVALHO e SHEPHERD (3) para o OYDV.

Roteiros demorados de purificação, sucedendo-se três ou mais ciclos de centrifugação diferencial, implicam perdas de fitovírus (8). Por isso, o roteiro seguido por CARVALHO e SHEPHERD (3) para o OYDV, que, inicialmente, se considerava para o VMCF, foi alterado, substituindo-se dois ciclos de centrifugação diferencial pela coacervação das partículas virais com polietilenoglicol («PEG») 6000 (Figura 1). Embora, segundo alguns autores (4; 11; 13), ele possa estimular a agregação das partículas de «potyvirus», dificultando a sua dispersão posterior, o «PEG» tem sido usado na purificação do VMCF (7, 10). Todavia, é provável que muitas partículas do vírus saiam da solução, nessa etapa, de forma reversível e sejam perdidas na centrifugação subsequente à ressuspensão do vírus ultracentrifugado.

MORALES (10) purificou com sucesso o VMCF depois de duas precipitações consecutivas com o mencionado coacervante nas concentrações de 6 e 20%. Na purificação do VMCF, empregando duas precipitações com o «PEG», verificou-se

FOLHAS PRIMÁRIAS DO FEIJOEIRO

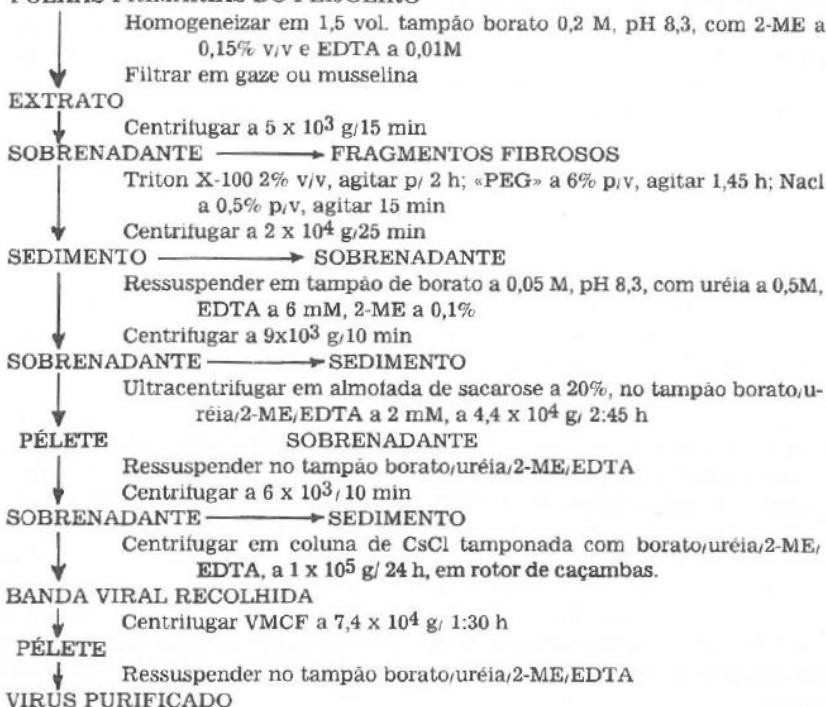


FIGURA 1 - Roteiro de purificação do vírus do mosaico-comum do feijoeiro, VMCF.

que o rendimento viral obtido foi aparentemente igual ao observado com a substituição da segunda precipitação com o «PEG», a 20%, por um ciclo de centrifugação diferencial. A alternativa da reprecipitação com o «PEG» não foi adotada porque, na ocasião, convinha poupar o coacervante.

Tendo o VMCF sido concentrado mediante coacervação e ultracentrifugação em almotada de sacarose a 20%, ficou estabelecido que, para esse vírus, nas condições referidas, eram dispensáveis o segundo e o terceiro ciclo de centrifugação diferencial antes de ser a preparação submetida à ultracentrifugação em gradiente de cloreto de césio. Esses ciclos adicionais intermediários teriam por finalidade a eliminação prévia de impurezas, ensejando restassem apenas resíduos de estruturas celulares para se destacarem do vírus na ultracentrifugação isópicica, facilitando sua eliminação. Contudo, acarretaram maiores perdas de vírus, ao se sucederem as etapas de sedimentação, ressuspensão e centrifugações baixas.

O roteiro modificado permitiu que, concluída a ultracentrifugação isópicica, ficasse evidente uma banda viral nítida, opalescente, afastada das estruturas contaminantes, que se lhe sobreponham na coluna do gradiente (Figura 2).

O espectro de absorção do VMCF purificado mostrou-se típico de um «potyvi-

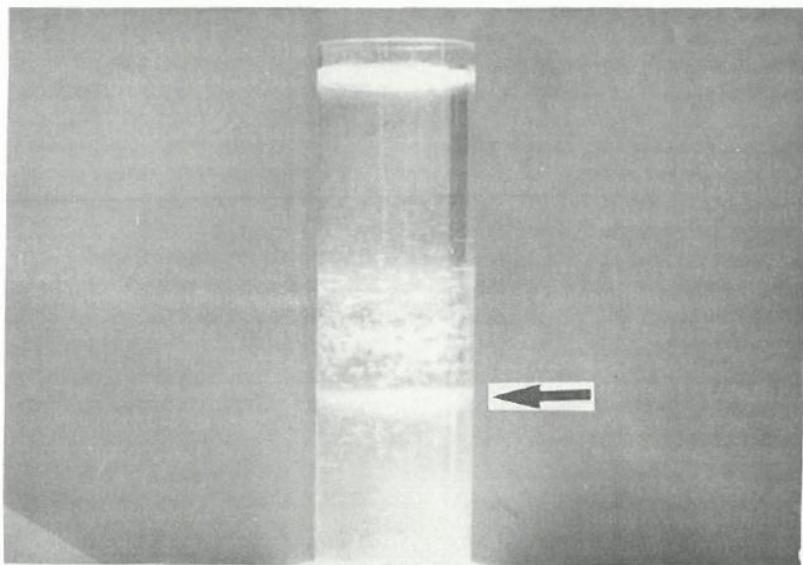


FIGURA 2 - Banda viral do VMCF-ATCC, formada na ultracentrifugação a $7,4 \times 10^4$ g, por 24 horas, em gradiente pré-formado de CsCl (Destacam-se acima da banda viral as impurezas, de origem celular, que acompanhavam o vírus até essa etapa).

rus», com absorção máxima em 261 nm e mínima em 245 nm, decrescendo continuamente a partir daquele valor de absorção. Os quocientes da absorção máxima pela mínima e da verificada em 260 nm pela observada em 280 nm foram de 1,13 a 1,18 e de 1,19 a 1,23, respectivamente, consideradas as várias preparações virais purificadas obtidas. Esses valores estão de acordo com os estabelecidos para as melhores preparações purificadas de «potyvirus» (6). A excelente qualidade da preparação viral foi posteriormente confirmada nos testes sorológicos de micro-precipitina e «ELISA», verificando-se que, consistentemente, os anti-soros produzidos com as preparações do VMCF não reagiram com o extrato foliar, concentrando ou não, obtido de feijoeiro sadio. As observações e micrografias do VMCF-ATCC, ao microscópio eletrônico, mostraram que as preparações purificadas do vírus eram homogêneas, com partículas longas e flexuosas, de morfologia semelhante à de um «potyvirus» (Figura 3). Tais observações auxiliaram na comprovação do alto grau de qualidade da preparação purificada, já sugerido pelos dados da análise espectrofotométrica.

O rendimento final de vírus purificado, considerada a correção em 300 nm para a dispersão da luz UV, foi de cerca de 3 mg por quilograma de folhas primárias coletadas entre o 10º e o 12º dia da inoculação. JAFARPOUR *et alii* (7) purificaram o VMCF com o emprego de um método semelhante ao de DAMIRDAGH e SHEPHERD (5) e, utilizando esse antígeno purificado, produziram em coelho anti-soro específico e de bom título. Não relataram, porém, o rendimento em vírus purificado. MORALES (10) relatou rendimentos de 8 mg por quilograma de folhas.

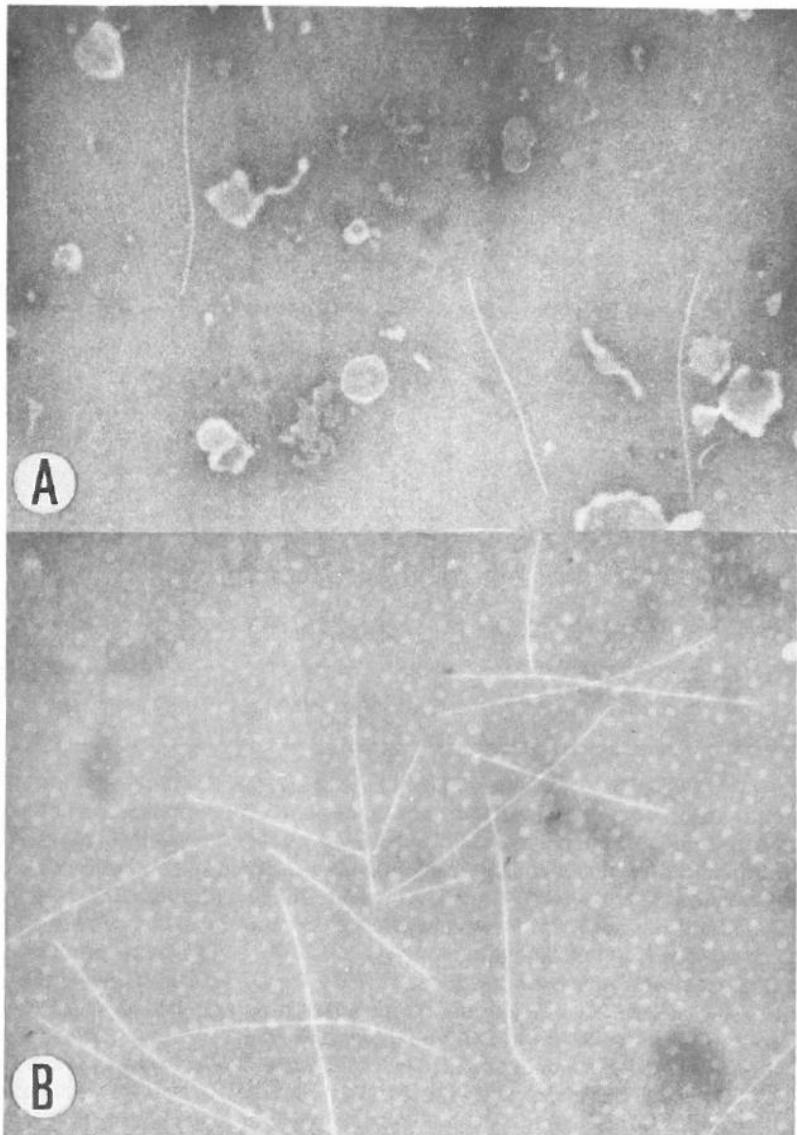


FIGURA 3 - Micrografias eletrônicas do VMCF-ATCC.

A - "Leaf dip", contrastação com fosfotungstato de potássio, a 2%, pH 6,8, aumentada 45800 X.

B - Vírus purificado (Nota-se, principalmente na comparação com a outra micrografia, a ausência de resíduos ou componentes provenientes da célula hospedeira. Contraste proporcionado com fosfotungstato de potássio, pH 6,8, aumentado cerca de 70700 X).

Apesar disto, o rendimento obtido no trabalho presente foi julgado satisfatório, principalmente em razão do alto grau de pureza biológica alcançada. Para o isolado «IAC» obtiveram-se as razões de absorção de 1,19 e 1,12, respectivamente, nas leituras em 260 e 280 nm e entre os valores de maior e de menor absorção. O rendimento do vírus purificado foi de 2 mg por quilograma de folhas primárias infectadas.

3.2. Qualidade de Anti-Soro

O título de 1:256 foi encontrado, no teste de microprecipitina, para o anti-soro preparado da sangria efetuada 15 dias após a última injeção, com imunização intravenosa, seguida de três intramusculares. Esse anti-soro não reagiu com os extractos foliares, nem nesse nem nos testes subsequentes em que foi utilizado.

A via coxim-plantar de imunização tornou possível um anti-soro de 1:512, em coleta realizada um mês depois da primeira injeção do antígeno. Esse anti-soro também não reagiu com os extractos foliares de planta avirótica com os quais foi testado. A técnica de imunização via músculo coxim-plantar pode ter sido mais eficiente do que a outra, o que estaria de acordo com o relato de MORALES (10) para o mesmo vírus. Porém, não há como assegurá-lo. Apesar de aceitáveis os títulos referidos para anti-soros, é provável que tivessem sido maiores, não fosse a presença de antibiótico na ração alimentar dos animais imunizados, o que lhes reprimiu a resposta imunogênica.

4. RESUMO

Objetivou-se purificar o vírus do mosaico-comum do feijoeiro, VMCF, em grau suficientemente elevado para permitir a produção de anti-soros de especificidade adequada a estruturação do ensaio de imunoabsorção com enzima ligada ao anticorpo («ELISA»). Inicialmente, um isolado obtido da ATCC foi purificado a partir de um método desenvolvido para o vírus do nanismo amarelo da cebola («Onion yellow dwarf virus, OYDV»), pelo qual se verificou ser possível conterem as folhas primárias do feijoeiro 'Santana' maiores concentrações do VMCF que as trifoliadas. O método foi simplificado e os isolados «ATCC» e «IAC» foram purificados mediante coacervação com polietilenoglicol no extrato clarificado, ultracentrifugação sobre almofada de sacarose e ultracentrifugação isópínica em CsCl. As análises espectrofotométricas do vírus purificado foram compatíveis com as obtidas com as preparações de um «potyvirus» totalmente livres de impurezas biológicas. Os anti-soros preparados com tais imunógenos, com títulos de 1:256 e 1:512, não reagiram com nenhum extrato foliar avirótico no teste de microprecipitina e, mais tarde, de «ELISA», indicando ter sido atingido o objetivo de alto grau de pureza das preparações finais do VMCF.

5. SUMMARY

(ALTERNATIVE METHOD TO PURIFY BEAN COMMON MOSAIC VIRUS)

Bean common mosaic virus, a potyvirus, was purified employing borate buffer at moderately high pH, in the extraction, and thereafter, in the presence of urea and 2-mercaptoethanol to prevent particle aggregation. Virus particles were precipitated with polyethyleneglycol just after juice extraction and clarification.

Only one cycle of differential centrifugation was performed before the final isopynic centrifugation in CsCl. The virus was not stabilized for this latter step. Yield of purified BCMV was about 3 mg per kilogram of primary leaves, which is acceptable in view of the high degree of purity of the final virus preparation. Antisera prepared with this antigen did not react at all in the microprecipitation and ELISA tests against healthy controls.

6. LITERATURA CITADA

1. ARAÚJO, M.A. *Sorodiagnose de duas viroses da batata (*Solanum tuberosum* L.), destacando-se a detecção do vírus X por dijusão radial*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1983. 47 p. (Tese M.S.).
2. BOS, L. *Bean common mosaic virus*. Kew, Surrey, C.M.I./A.A.B., 1971, 4 p. (Descriptions of Plant Viruses n.º 73)
3. CARVALHO, M.G. & SHEPHERD, R.J. Purificação do vírus do mosaico amarelo da cebola (OYDV) e do «estriado» do alho (GYSV). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, XVI, Belém, Pará, 1983. Resumos, p. 182.
4. CHOI, J.K.; MAEDA, T. & WAKIMOTO, S. An improved method for purification of turnip mosaic virus. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 43(4):440-448. 1977.
5. DAMIRDAGH, I.S. & SHEPHERD, R.J. Purification of the tobacco etch and other viruses of the potato Y group. *Phytopathology*, 60(1):132-142. 1970.
6. HOLLINGS, M. & BRUNT, A.A. *Potyvirus group*. Kew, Surrey, C.M.I./A.A.B., 1981. 7 p. (Descriptions of Plant Viruses n.º 245)
7. JAFARPOUR, B.; SHEPHERD, R.J. & GROGAN, R.G. Serologic detection of bean common mosaic and lettuce mosaic virus in seed. *Phytopathology*, (10):1125-1129. 1979.
8. MARAMAROSH, K. & KOPROWSKI, H. *Methods in Virology*. N. York, Academic Press, 1967. Vol. II, 682 p.
9. MEINERS, I. P.; GILLASPIE, A.G. Jr.; LAWSON, R.H. & SMITH, F.F. Identification and partial characterization of a strain of bean common mosaic virus from *Rinchosia minima*. *Phytopathology*, 68(3):283-287. 1978.
10. MORALES, F.J. Purificación y serología del virus del mosaico común del frijol. *Turrialba* 29(4):320-324. 1979.
11. SAKO, N.; MATSUO, K. & NONAKA, F. The detection of watermelon mosaic and cucumber mosaic viruses in cucurbitaceous plants by enzyme-linked immunosorbent assay. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 46(5):647-655. 1980.
12. SCOTT, A. H. Partial purification and serology of common bean mosaic virus. *Phytopathology*, 52(2):166. 1962.

13. UYEDA, I.; KOJIMA, M. & MURAYMA, D. Purification and serology of bean yellow mosaic virus. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 41(2): 192-203. 1975.
14. Van OOSTEN, J.J. Purification of plum pox (sharka) virus with the use of Triton X-100. *Netherland's Journal of Plant Pathology*, 78: 33-44. 1972.