

DANOS OCASIONADOS POR UM POTYVIRUS EM *Clitoria ternatea* L. E SUA TRANSMISSIBILIDADE POR FERRAMENTAS DE CORTE

M.I. Florindo¹ e
J. Albérico A. Lima²

RESUMO

Testes de casa de vegetação revelaram ser um potyvirus isolado de cunhã, *Clitoria ternatea* L., transmitido por ferramentas utilizadas no corte de plantas doentes seguido do corte de plantas sadias. Plantas de cunhã sistemicamente infetadas pelo vírus apresentaram redução nos seguintes parâmetros avaliados: altura, peso verde, peso feno e matéria seca, quando comparados com plantas sadias cultivadas nas mesmas condições. Dependendo do experimento e época de avaliação, as diferenças observadas apresentaram as seguintes variações: **Altura** 214,3 - 40,2%; **peso verde** 10,6 - 39,2%; **peso feno** 18,28 - 45,7% e **matéria seca** 5,31 - 18,55%. Por outro lado, o vírus induziu aumentos do teor de proteína, variando de 23,3 - 51,2% nas plantas infetadas quando comparadas às testemunhas. Aumento correspondente não foi observado quando se analisou a quantidade de proteína por planta, devido a grande redução de massa verde, nas plantas infetadas. Estudos sorológicos mostraram ser o vírus relacionado, porém distintos do vírus do mosaico comum do feijoeiro e do vírus do mosaico do caupi "blackeye".

PALAVRAS CHAVES: Potyvirus, transmissibilidade de vírus, danos ocasionados por vírus.

SUMMARY

Green house studies showed that a virus isolated from *Clitoria ternatea* was transmitted by cutting tools used to cut infected plants followed by cutting health *C. ternatea* plants. Plants of *C. ternatea* systemically infected with the virus showed reduction in their height, green weight, hay weight and drought mass, when compared with health plants cultivated at the same conditions. Depending on the experiment and evaluation time, the differences presented the following variations: height 14,3 - 40,2%; green weight 10,6 - 39,2%; hay weight 18,28 - 45,7% and drought mass 5,31 - 18,55%. On the other hand, the virus induced an increase in protein ratio varying from 23,3 to 51,2% in the infected plants when compared with the health ones maintained as control. The increase was not detected when the quantity of protein was analysed by plant, due to the great reduction of the green mass in the infected plants. Serological studies showed that the virus is related to but distinct from bean common mosaic and blackeye cowpea mosaic viruses.

KEY WORDS: Potyvirus, virus transmission, virus effects.

INTRODUÇÃO

Clitoria ternatea L., vulgarmente conhecida por cunhã ou espelúia, é uma leguminosa tropical que floresce durante quase todo o ano em regiões tropicais (BRAGA³; CROWDER⁴). Possui boa resistência à seca, mas adapta-se melhor em solos com boa disponibilidade de água.

Com a descoberta da importância da cunhã para pecuária do Nordeste brasileiro, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas pela necessidade de maiores informações sobre seu nível tecnológico, tratos

1. Bolsista do CNPq.

2. Professor do Departamento de Fitotecnia da UFC e Bolsista do CNPq.

culturais e controles sanitários adequados ao seu cultivo, em virtude da escassa literatura pertinente.

Poucos são os casos de doenças registradas em cunhã, sobretudo as causadas por vírus. BOCK et al.² constataram em Quênia, África um vírus que o denominaram de "clitoria yellow vein virus" (CIMV, vírus do amarelecimento das nervuras da clitoria) e o classificaram como Tymovirus com base nas suas características morfológicas, físicas e biológicas. Referido trabalho parece constituir o primeiro relato de vírus nesta leguminosa. Em seguida, SRIVASTAVA et al.¹⁴ constataram a incidência de um outro vírus, na Índia, ocasionando sintomas de mosaico, deformação e redução da lâmina foliar de cunhã.

No presente trabalho, um vírus isolado de plantas de cunhã naturalmente infetadas no Estado do Ceará, foi considerado como membro do grupo potyvirus com base em estudos sorológicos, ao tempo em que se estudou a possibilidade da sua transmissão por ferramentas utilizadas no corte de plantas doentes seguido do corte de plantas sadias e seus efeitos em cunhã. Parte dos resultados desta pesquisa foi apresentada em Congresso e publicada na forma de resumo (LIMA et al.⁹).

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento e Estudos Sorológicos do Vírus

Amostras foliares coletadas de plantas de cunhã exibindo sintomas de mosaico em campo experimental do Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará, foram usadas para inocular plantas jovens de cunhã mantida em casa de vegetação. O inóculo foi preparado através da maceração de folhas com bons sintomas, na presença de solução tampão de fosfato 0,05M, pH 7,5, na proporção de 1:2 (p/v), e filtração, em gaze dupla, do extrato obtido. Ao filtrado foi adicionado pequena quantidade de carborundum e as inoculações foram efetuadas pela fricção das superfícies adaxiais das folhas com pedaços de gazes embebi-

dos com o inóculo.

Folhas de uma planta de cunhã artificialmente inoculada e exibindo mosaico em casa de vegetação, foram usadas para inocular **Chenopodium amaranticolor** Coste & Reyn, hospedeiro de lesões locais do vírus (FLORINDO6). Visando sua purificação biológica, o vírus foi reisolado em cunhã, a partir de uma única lesão em folhas de **C. amaranticolor**.

Estudos sorológicos com extratos de folhas de cunhã infetadas pelo vírus foram realizados mediante teste de dupla difusão em meio de agar, envolvendo anti-soros específicos para os seguintes vírus: "cowpea mosaic virus" (CpMV, vírus do mosaico do caupi); "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV, vírus do mosaico severo do caupi); **Cucumovirus**: "cucumber mosaic virus" (CMV, vírus do mosaico do pepino); **Potyvirus**: "bean common mosaic virus" (BCMV, vírus do mosaico comum do feijoeiro), "blackeye cowpea mosaic virus" (BICMV, vírus do mosaico do caupi blackeye), "papaya ringspot virus type-W" (PRSV-W, vírus da mancha anelar do mamoeiro tipo Melancia), "potato virus Y" (PVY, vírus Y da batatinha), "soybean mosaic virus" (SoyMV, vírus do mosaico da soja) e "watermelon mosaic virus-2" (WMV-2, vírus-2 do mosaico da melancia); e **Tymovirus**: "clitoria yellow vein virus" (CYVV, vírus do amarelecimento das nervuras da Clitoria). Os testes com os anti-soros para os potyvirus e o cucumovirus foram realizados em meio contendo 0,85% de agar Noble, 0,5% de dodecilsulfato de sódio (SDS) e 1,0% de NaN₃, enquanto que os testes com os anti-soros para os comovirus e o tymovirus foram efetuados em meio sem o detergente SDS, de acordo com metodologia descrita por LIMA & NELSON¹⁰ e LIMA⁸.

Transmissão do Vírus Através de Ferramentas de Corte

Devido a importância da cunhã como forrageira e a necessidade de repetidos cortes para produção de feno, foi realizado um estudo sobre a transmissibilidade do vírus, envolvendo ferramentas utilizadas no corte. Para tanto 60 plantas foram cultivadas

em condições de casa de vegetação, distribuídas em 10 vasos. As plantas foram cortadas 28 dias após o plantio, com uma faca usada anteriormente no corte de uma única planta infetada pelo vírus. Após o corte, as mesmas foram mantidas para produção de nova parte aérea e observadas com relação ao aparecimento de sintomas.

Avaliação dos Efeitos Causados pelo Vírus

Com o objetivo de verificar os efeitos do vírus na altura, peso verde, peso feno, teor de proteína bruta e matéria seca de plantas de **C. ternatea**, dois experimentos foram conduzidos, em condições de casa de vegetação em épocas distintas. Cada experimento foi constituído por 10 vasos, contendo três plantas cada um. A metade das plantas (15) de cada experimento foi inoculada com o vírus, 13 dias após o plantio, e a outra metade foi mantida como testemunha. Dois cortes foram realizados em cada experimento, ocorrendo o primeiro, 60 dias após a inoculação e o segundo 30 dias após o primeiro.

Após cada corte, foram determinados altura, peso verde, peso feno, percentagem de matéria seca e de proteína, seguindo as normas da AOAC¹. A altura foi determinada através de cinco medidas feitas para cada vaso, usando-se para cada três plantas, cinco galhos colhidos aleatoriamente. As plantas de cada vaso foram cortadas e pesadas para determinação do peso verde e, em seguida, foram levadas para uma estufa de circulação forçada a 65°C, até adquirirem o peso constante (peso feno).

Após a determinação do peso feno de cada grupo de três plantas, as plantas inoculadas foram misturadas e retirada uma única amostra para a determinação do teor de proteína e matéria seca. O mesmo foi realizado com as plantas sadias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes sorológicos revelaram que o vírus isolado de **C. ternatea**, no Ceará, trata-se de um potyvirus sorologicamente relacionado, porém distinto

do BCMV e do BICMV, e não relacionado com PRSV-W, PVY, SoyMV e WMV-2. Nenhuma reação foi observada entre o vírus e os anti-soros específicos para os Como e Tymovirus usados, evidenciando a ausência de mistura de infecção com referidos vírus. É comum o relacionamento sorológico entre membros do grupo potyvirus e nenhum caso de relacionamento sorológico tem sido observado entre potyvirus e vírus pertencentes a outros grupos (PURCIFULL & BATCHELOR¹³; LIMA et al.^{11,12}.

O vírus mostrou ser transmitido por ferramentas utilizadas no corte. Das 60 plantas cortadas, seis foram infetadas pelo vírus e apresentaram seus sintomas característicos, com a formação de mosaico logo no início da brotação nova, tendo sido a presença do vírus confirmada mediante testes sorológicos com anti-soro para BCMV. Tais plantas apresentaram um mosaico mais intenso, acompanhado de rugosidade, quando comparado com os sintomas apresentados pelas plantas inoculadas mecanicamente. Desta forma, toda precaução deve ser tomada para evitar a inoculação deste vírus em áreas cultivadas com cunhã, visto ser a mesma destinada a fins forrageiros e produção de feno, requerendo, portanto, a necessidade de repetidos cortes durante seu período de cultivo. Assim sendo, o vírus poderia ser disseminado, num curto período de tempo, dentro de uma grande área cultivada. Embora a percentagem de transmissão deste vírus por sementes de cunhã tenha se mostrado baixa (FLORINDO⁶), as mesmas podem desempenhar papel de grande importância na epidemiologia desta virose, uma vez que as sementes infetadas irão constituir fontes primárias de inóculo, aleatoriamente distribuídas dentro de uma cultura, facilitando a sua disseminação secundária por outros meios, inclusive ferramenta de corte.

O potyvirus teve bastante influência sobre o crescimento das plantas inoculadas, as quais mostraram um aspecto de estiamento caracterizado por caules finos e fracos, quando comparadas com aquelas são inoculadas (testemunha), havendo sua floração ocorrido uma semana depois da flo-

TABELA 1 - Médias relativas aos dados obtidos para altura, peso verde, peso feno, matéria seca e proteína da matéria seca de plantas de *Clitoria ternatea* L., infetadas por um potyvirus e de plantas sadias.

Parâmetros		Experimento		Experimento	
		1º corte	2º corte	1º corte	2º corte
Altura (m)	Pl. c/vírus	1,02	0,78	1,20	0,61
	Pl. sadias	1,22	1,05	1,40	1,02
	Diferenças	0,20*	0,27*	0,20*	0,41*
	% de Redução	16,40	25,70	14,30	
Peso verde (g)/planta	Pl. c/vírus	25,00	11,52	22,60	
	Pl. sadias	32,42	12,90	37,14	16,59
	Diferenças	7,42*	1,46	14,53*	5,43*
	% de Redução	22,80	10,60	39,20	32,70
Peso feno (g)/planta	Pl. c/vírus	6,32	3,04	6,64	2,03
	Pl. sadias	9,79	3,72	11,60	3,74
	Diferenças	3,47*	0,67	4,90*	1,71
	% de Redução	35,44	18,28	42,70	45,70
Matéria seca (%)	Pl. c/vírus	22,40	24,05	25,66	15,58
	Pl. sadias	26,72	27,30	27,10	19,13
	Diferenças	4,32	3,25	1,44	3,55
	% de Redução	16,16	11,90	5,31	18,55
Proteína (%)	Pl. c/vírus	17,60	17,50	18,25	
	Pl. sadias	13,20	14,20	14,05	16,40
	Diferenças	4,40	3,30	4,20	8,20
	% de Aumento	33,30	23,30	29,90	51,20
Proteína (g)/planta	Pl. c/vírus	0,98	0,48	1,05	0,43
	Pl. sadias	1,14	0,50	1,41	0,52
	Diferenças	0,16	0,02	0,36	0,09
	% de Redução	14,00	4,00	25,55	17,30

* - Significativo pelo teste "t", ao nível de 5% de probabilidade.

ração das plantas sadias.

As alturas médias das plantas infetadas pelo vírus apresentaram variações consideráveis nos dois períodos de cada experimento, mostrando-se, no entanto, sempre inferiores às alturas das plantas sadias. Da mesma forma, a produção de massa verde e, conseqüentemente, o rendimento de feno foram grandemente reduzidos pela infecção viral (Tabela 1). As plantas infetadas pelo vírus tenderam a apresentar maior teor de proteína e menor percentual de matéria seca. No entanto, em termos de proteína por planta, as sadias superaram as infetadas pelo vírus (Tabela 1).

As médias dos dados relativos à altura, peso verde, peso feno, matéria seca e teor de proteína na matéria seca das plantas infetadas e das plantas sadias de ambos os experimentos encontram-se na Tabela 1. As diferenças entre os dados obtidos para plantas infetadas e plantas sadias bem como os percentuais de redução ou aumento foram determinados para cada parâmetro e estão, também, relacionadas na Tabela 1. Embora as plantas infetadas hajam apresentado reduções no peso verde e peso feno, quando comparadas com plantas sadias (Tabela 1), somente nos primeiros cortes de ambos os experimentos notaram-se diferenças estatisticamente significativas. As plantas infetadas pelo vírus tenderam a apresentar maior teor de proteína e menor percentual de matéria seca. No entanto, em termos de proteína por planta, as sadias superaram as infetadas. (Tabela 1). O aumento na percentagem de proteína poderá ser resultante da presença do grande número de inclusões formadas pelo potyvirus em estudo (LIMA et al.⁹). Segundo HIBERT & McDONALD⁷; EDWARDSON⁴; LIMA et al.⁸ as inclusões citoplasmáticas induzidas pelos potyvirus nas células hospedeiras são de natureza protéica. Todavia, nada se pode afirmar sobre qualquer benefício deste aumento percentual de proteína para a alimentação animal, principalmente para os monogástricos, dada a inexistência de informações sobre a digestibilidade e valor biológico das proteínas das inclusões. Segundo GOODMAN et al.⁶, uma

infecção do TMV (vírus do mosaico do fumo), quando muito, acarreta um aumento de 30% de proteína solúvel de plantas de fumo, *Nicotiana tabacum* L. Desta forma, torna-se difícil, ou mesmo impossível, emitir opiniões generalizadas sobre a influência das infecções virais sobre o metabolismo das proteínas das plantas infetadas.

CONCLUSÕES

- 1 - O vírus isolado de *C. ternatea* no Ceará é um membro do grupo potyvirus, sorologicamente relacionado ao vírus do mosaico comum do feijoeiro;
- 2 - O vírus é capaz de ocasionar sérias reduções na altura, peso verde, peso feno e matéria seca de plantas de *C. ternatea*;
- 3 - O vírus induz um aumento no teor de proteínas das plantas infetadas, possivelmente, em consequência da grande massa de inclusões de natureza proteica produzida no citoplasma das células. No entanto, em termos de proteína por planta, as plantas sadias superaram as infetadas;
- 4 - As ferramentas de corte funcionam como eficiente forma de disseminação do vírus de plantas doentes para sadias. Desta forma, toda precaução deve ser tomada para evitar a introdução do vírus em campos de cunhã, visto ser a mesma, normalmente, destinada a produção de feno, requerendo repetidos cortes durante seu período de cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official methods of analysis. Lith ed., Washington D.C., 1970. 1015p.
- 02 - BOCK, K.R.; GUTHRIE, E.J. & MEREDITH, G. Clitoria yellow vein virus, a tymovirus from Kenya. *Ann. Appl. Biol.* 85:97-103. 1977.

- 03 - BRAGA, R. **Plantas no Nordeste, Especialmente do Ceará**. Fortaleza, 2a. ed. Imprensa Oficial, 1960. 540p.
- 04 - CROWDER, L.V. **Clitoria ternatea** L. as a forage and cover crop. **Niger Agric. J.** 11:61-65. 1975.
- 05 - EDWARDSON, J.R. Some properties of the potato virus-Y group. Fla. Agric. Exp. Stn. Monogr. Ser. NO. 4, 1974. 398p.
- 06 - FLORINDO, M.I. **Isolamento e caracterização de um potyvirus e avaliação dos danos ocasionados em cunhã, Clitoria ternatea** L. Fortaleza, Universidade Federal do Ceará, 1983. 47p. (Dissertação de Mestrado).
- 07 - GOODMAN, R.N.; KIRALY, Z. & ZAITLIN, M. **The biochemistry physiology of infectious plant disease**. Loudon D. Nostrand Company, INC, 1967. 327p.
- 08 - HIEBERT, E. & McDONALD, J.G. Characterization of some proteins associated with viruses in the potato y group. **Virology.** 56:349-361. 1973.
- 09 - LIMA, J.A.A. Testes sorológicos para identificação de vírus de leguminosas. **Fitopatol. bras.** 4:215-25, 1979.
- 10 - LIMA, J.A.A.; FLORINDO, M.I.; FERNANDES, E.R. Características citológicas e sorológicas, e círculo de hospedeiras de um vírus isolado de **Clitoria ternatea** L. **Fitopatol. bras.** 6:523, 1981.
- 11 - LIMA, J.A.A. & NELSON, M.R. Purificação e identificação sorológica do "cowpea mosaic virus" em **Vigna sinensis** Endl., no Ceará. **Ciênc. Agron.** 3:5-8, 1974.
- 12 - LIMA, J.A.A.; OLIVEIRA, F.M.E.S.; KIJAJIMA, E.W.; LIMA, M.G.A. Propriedades biológicas, citológicas e sorológicas de um potyvirus isolado de feijão-de-corda no Ceará. **Fitopatol. bras.** 6:205-16, 1981.
- 13 - LIMA, J.A.A.; PURCIFULL, D.E. & HIEBERT, E. Purification, partial characterization, and serology of blackeye cowpea mosaic virus. **Phytopathology** 69:1252-1258. 1979.
- 14 - PURCIFULL, D.E. & BATCHELOR, D.L. Immunodiffusion tests with sodium dodecyl sulfate (SDS) - treated plant viruses and plant viral inclusions. Univ. Florida Agric. Exp. Stn. Tech. Bull. No. 788, 1977. 39p.
- 15 - SRIVASTAVA, B.N.; SRIVASTAVA, K.M. & SINGH, B.P. Mosaic disease of **Clitoria ternatea** a new record from India. **Indian Phytopathology** 31:248-251. 1978.