

## Identificação de potyvirose e do Melon Yellowing associated virus (MYaV) em amostras de cucurbitáceas coletadas no Estado do Amazonas.

Mirtes Freitas Lima<sup>1</sup>; Mikhail Lastro<sup>2</sup>; Raquel Cassimiro Alves<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Hortaliças, BR 060 Km 09, Cx. Postal 218, CEP 70.359-970, Brasília, DF, <sup>2</sup>Universidade de Brasília, Cx. Postal 4467, CEP 70910-900, Brasília, DF, <sup>3</sup>Faculdade Católica, QS 07, Lote 01, EPCT, CEP 71966-700, Taguatinga-DF

### RESUMO

As viroses situam-se entre as doenças mais importantes para as cucurbitáceas. Como parte de um levantamento de vírus realizado em cucurbitáceas no Brasil, 25 amostras de abóbora (11), maxixe (6), bucha (3), pepino (3) e melancia (2), coletadas nos Municípios de Iranduba, Manacapuru e Rio Preto da Eva, no Estado do Amazonas foram analisadas quanto à presença de *Papaya ringspot virus* – type watermelon (PRSV-w), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), Melon yellowing associated virus (MYaV) e *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV). A análise foi realizada no Laboratório de Virologia da Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, utilizando-se os testes dot-Elisa (PRSV-w; WMV; ZYMV; CMV), DAS-Elisa (MYaV) e RT-PCR (ZLCV). A presença de vírus foi detectada em 52% (13) das 25 amostras analisadas, em infecção simples (8) ou mista (5). Os vírus detectados em maior frequência foram PRSV-w (8 amostras) e ZYMV (8 amostras). WMV-II e CMV ocorreram em três plantas e uma planta, respectivamente. ZLCV não foi detectado. O MYaV foi detectado em duas amostras, pepino e abóbora, sugerindo que a disseminação desse vírus vai além da Região Nordeste, onde foi relatada sua ocorrência.

**Palavras-chave:** Cucurbitaceas, vírus, detecção.

### ABSTRACT

#### Identification of potyviruses and of Melon Yellowing associated virus (MYaV) in cucurbit samples collected in the State of Amazonas.

Viruses are the cause of the main diseases in cucurbits. As a part of a survey for viruses infecting cucurbits that is being carried out all over Brazil, pumpkin (11 samples), gherkin (6), luffa plant (3), cucumber (3) and watermelon (2) samples, collected from Iranduba, Manacapuru and Rio Preto da Eva Counties, in the State of Amazonas were evaluated for the presence of *Papaya ringspot virus* – type watermelon (PRSV-w), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), Melon yellowing associated virus (MYaV) and *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) using polyclonal antisera raised against coat protein of each virus. Assays were carried out at the Virology Laboratory of Embrapa Vegetables, at Brasília, DF. PRSV-w, WMV, ZYMV and CMV detection was performed by dot-Elisa, while for MYaV and ZLCV, DAS-Elisa and RT-PCR tests were used, respectively. Virus detection reached 52% (13) of total samples, occurring in single (8) or mixed (5) infection. The most frequent viruses were PRSV-w (8

samples) and ZYMV (8 samples). WMV-II and CMV occurred in three plants and in one plant, respectively. ZLCV-positive samples were not detected. Surprisingly, MYaV was found in two samples,

cucumber and pumpkin, suggesting that MYaV dissemination is beyond Northeast region, where it was first registered.

**Keywords:** Cucurbits, virus, detection

As viroses estão no grupo das doenças mais importantes que afetam espécies da família Cucurbitaceae, causando redução na qualidade dos frutos e perdas significativas na produção. No Brasil, cerca de dez vírus já foram relatados no País, infectando cucurbitáceas (Moura *et al.*, 2001). A incidência e a severidade destas doenças podem variar segundo a interação patógeno, hospedeiro, vetor e meio ambiente (Provvidenti, 1996). Além desses fatores, a ocorrência de infecção mista, com a presença de diferentes espécies de vírus infectando a mesma planta, pode tornar a sintomatologia mais complexa e aumentar, significativamente, as perdas na produção. As perdas ocorrem em plantas infectadas em quaisquer estádios de desenvolvimento, sendo que os prejuízos, são maiores, quando a infecção ocorre na fase de plântulas.

Os vírus mais frequentemente detectados nestas culturas são *Papaya ringspot virus* – type watermelon (PRSV-w), *Watermelon mosaic virus* (WMV) e *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*, e *Cucumber mosaic virus* (CMV), gênero *Cucumovirus*, família *Bromoviridae*. Entretanto, dois novos patógenos detectados em cucurbitáceas passaram a integrar o grupo de vírus de importância econômica, nos últimos 15 anos: *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), gênero *Tospovirus*, família *Bunyaviridae* detectado em 1996 por (Pozzer *et al.*) e que afeta principalmente, abobrinha, e, mais recentemente, o Melon yellowing-associated virus (MYaV), gênero *Carlavirus*, família *Flexiviridae* e que tem sido associado à doença “amarelão do melão” (Nagata *et al.*, 2003), transmitido por mosca branca *Bemisia tabaci* biotipo B.

Como parte de um levantamento de viroses de cucurbitáceas no Brasil, este trabalho teve como objetivo avaliar a incidência de seis vírus (PRSV-w; WMV-II; ZYMV; CMV; ZLCV e, MYaV) em amostras coletadas no Estado do Amazonas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Vinte e cinco amostras de cucurbitáceas, provenientes dos Municípios de Iranduba, Manacapuru e Rio Preto da Eva, no Estado do Amazonas, na Região Norte do País, foram avaliadas quanto à presença de pelo menos seis vírus considerados importantes para este grupo de plantas. Foram analisadas amostras de abóbora (*Cucurbita* spp.; 11 amostras), maxixe (*Cucumis anguria*; 5), bucha (*Luffa cylindrica*; 4), pepino (*Cucumis sativus*; 3) e melancia (*Cucumis lanatus*; 2); a maioria das plantas exibindo sintomas suspeitos de viroses. A análise do material foi realizada no Laboratório de Virologia da Embrapa Hortaliças, Brasília, DF.

Na análise, utilizou-se o teste dot-Elisa para identificação de *Papaya ringspot virus* – type watermelon (PRSV-w), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) e *Cucumber mosaic virus* (CMV) e, o teste DAS-Elisa (*Double antibody sandwich*/

*Enzyme-linked immunosorbent assay*; Clark & Adams, 1977), empregando anti-soros policlonais desenvolvidos por Ávila *et al.* (2008), para detecção do Melon yellowing associated virus (MYaV). A presença de *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), foi verificada por transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), utilizando RNA total e um par de *primers* (não publicados) desenhados na região do genoma que codifica a proteína N, que amplifica um fragmento do genoma de cerca de 300 pb.

Inicialmente, as amostras foram inoculadas pela fricção do extrato de plantas infectadas em abobrinha de moita (*Cucurbita pepo*, cv. Caserta), no estágio de uma folha expandida, em casa de vegetação. Após um período de cerca de 15 dias, amostras foram coletadas e utilizadas nos testes dot-Elisa e extração de RNA.

Nos testes para identificação do MYaV, o antígeno foi obtido a partir de plantas originais, coletadas no campo. Para DAS-Elisa, o IgG e o conjugado foram utilizados na concentração de 1 µg/ml. Como antígeno, foram empregados extratos preparados a partir de folhas e de hastes de meloeiros em tampão de extração (1,4 M NaCl; 0,02 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,08 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O; 0,02M KCl; pH 7,4), na proporção de 1:10 (v:v; g/ml). Amostras consideradas positivas no teste DAS-Elisa apresentaram valores de leitura da absorbância pelo menos duas vezes superior ao valor médio da absorbância registrada para o extrato de planta sadia utilizada como controle negativo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas de abobrinha, cv. Caserta, inoculadas, exibiram uma diversidade de sintomas caracterizados por apresentar mosqueado, mosaico, amarelecimento de nervuras e distorção foliar, indicando que os sintomas observados nas amostras de cucurbitáceas originais que vieram do campo foram reproduzidos em *Cucurbita pepo*.

Do total de plantas analisadas, em 52% (13 amostras) foi detectada a presença de vírus, ocorrendo em infecção simples (8 amostras) ou em infecção mista (5 amostras). Esses resultados reafirmam a importância desses patógenos para espécies de cucurbitáceas. Amostras negativas e positivas reagiram como esperado.

As espécies de vírus detectadas com maiores frequências foram os potyvirus PRSV-w (8 amostras) e ZYMV (8 amostras). O MYaV foi detectado em duas amostras, sendo uma de pepino e outra de abóbora. Os valores das leituras de absorbância obtidos para as amostras de pepino e de abóbora foram 0,307 e 0,265, respectivamente. O valor médio da leitura de absorbância para o controle negativo foi de 0,056, enquanto que para o controle positivo, este valor foi de 0,893. Neste caso, as leituras para as amostras analisadas foram superiores a pelo menos 4 vezes o valor médio do controle negativo. A incidência de WMV-II e do CMV nas amostras foi baixa, ocorrendo em três plantas e em uma planta, respectivamente. A presença do ZLCV não foi detectada.

Estes resultados indicam a diversidade de vírus que ocorrem infectando cucurbitáceas nas amostras coletadas no Estado do Amazonas. Esta situação é similar a de outras regiões produtoras de cucurbitáceas do Brasil, em que o PRSV-w é predominante e que, entretanto, o ZYMV começa a ser detectado em frequências cada vez maiores, nos últimos anos.

O relato da presença do Melon yellowing associated virus (MYaV) em amostras coletadas no Estado do Amazonas, inicialmente, relatado como ocorrendo apenas na Região

Nordeste no Brasil (Lima *et al.*, 2009), indica que a abrangência desse vírus infectando cucurbitáceas no País, vai além da Região Nordeste. Estes resultados eram esperados, considerando os elevados níveis populacionais de mosca branca (*Bemisia tabaci*, biótipo A) no País, vetor do MYaV, ocorrendo no País.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo suporte financeiro ao Projeto “Caracterização de vírus em cucurbitáceas de importância econômica visando à geração de informações para o agronegócio brasileiro e para a agricultura familiar” (Processo: 578546/2008-6) e ao Dr. Luadir Gasparotto da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM pela coleta das amostras.

## REFERÊNCIAS

- AVILA, AC; INOUE-NAGATA, AK; NEVES, FM; MATOS, LG; DIAS, RCS; RANGEL, M; NAGATA, T. Produção de anti-soro e detecção por DAS-ELISA do Melon yellowing-associated virus em melão. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v.33, p.245-247. 2008.
- CLARK, MF; ADAMS, AN. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, v.34, p. 475–483, 1977.
- MOURA, MCCL; LIMA, JAA; OLIVEIRA, VB; GONÇALVES, MFB. Identificação sorológica de espécies de vírus que infetam cucurbitáceas em áreas produtoras do Maranhão. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.90-92. 2001.
- NAGATA, T; KITAJIMA, EW; ALVES, DMT; CARDOSO, JE; INOUE-NAGATA, AK OLIVEIRA, MRV; de AVILA, AC. Isolation of a novel carlavirus from melon in Brazil. **Plant Pathology**, v.52, p.797. 2003.
- POZZER, L; RESENDE, R de O; BEZERRA, IC; NAGATA, T; LIMA, MI; KITAJIMA, EW; AVILA, AC. Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV), a proposed new species in the *Tospovirus* genus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, p.432. 1996.
- PROVVIDENTI, R. Cucumber mosaic. In: ZITTER, A.; HOPKINS, D.L. & THOMAS, C.E. **Compendium of cucurbit diseases**. APS PRESS: St. Paul. 1996. p.438-39.

Guarapari - ES