

Reação de acessos de abóbora a vírus do gênero *Potyvirus*

Graziela da S Barbosa¹; Aline Kelly Q Nascimento¹; Fabiana R da Silva²; José Albersio de A Lima¹; Rita de C S Dias³

¹Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Fitotecnia, Av. Mister Hull, s/n, Campus do Pici, bloco 805, C.P. 6035, Fortaleza-CE; ²Universidade Federal Rural de Pernambuco. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife-PE; ³Embrapa Semiárido. BR 428, Km 152, C.P. 23, 56302-970 Petrolina-PE. grazy26@bol.com.br; alynekelly@yahoo.com.br; agro.fabirodrigues@gmail.com; albersio@ufc.br; ritadias@cpatsa.embrapa.br

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a avaliação das reações de acessos de abóbora (*Cucurbita* spp.) quanto a inoculações de vírus do gênero *Potyvirus*. Os ensaios foram conduzidos no período de fevereiro a março de 2012, em casa-de-vegetação no Laboratório de Virologia Vegetal (LabVV) da Universidade Federal do Ceará, envolvendo 13 acessos de *Cucurbita* spp. (BGC 512, BGC 527, BGC 531, BGC 537, BGC 552, BGC 553, BGC 565, BGC 566, BGC 571, BGC 578, BGC 586, BGC 682 e BGC 684) provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Cucurbitáceas da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. Oito plantas de cada acesso foram inoculadas com cada um dos vírus: *Papaya ringspot virus* type watermelon (PRSV-W), *Watermelon mosaic virus* (WMV) e *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV). As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação e avaliadas quanto às reações sintomatológicas e as infecções virais foram confirmadas por *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) indireto contra antissoros específicos para PRSV-W, WMV e ZYMV. Os acessos de abóbora não apresentaram imunidade ou extrema resistência a nenhum dos vírus testados. Apenas três acessos apresentaram mosaico leve quando inoculados com PRSV-W, sendo que 53% dos acessos foram considerados altamente susceptíveis ao mesmo vírus. Os sintomas mais severos foram observados com os acessos inoculados com ZYMV, onde 85% deles mostraram-se altamente susceptíveis. De outra parte, os acessos inoculados com WMV exibiram sintomas menos severos do que aqueles induzidos por PRSV-W e ZYMV, observando-se tolerância e resistência em 31% e 23% dos acessos, respectivamente. Os acessos de abóbora que se mostraram resistentes ao PRSV-W e ao WMV constituem fontes promissoras de resistência para programas de melhoramento genético de abóbora.

Palavras-chave: *Cucurbita* spp., PRSV-W, ZYMV, WMV, sintomatologia.

ABSTRACT

Reaction of pumpkin accesses to inoculations of virus from the genus *Potyvirus*

The present paper had the objective to evaluate the reactions of pumpkin (*Cucurbita* spp.) accesses to inoculation of virus from the genus *Potyvirus*. The experiments were developed during the period of February to March, 2012 in greenhouse conditions at the Plant Virus Laboratory, Federal University of Ceará, involving 13 accesses of *Cucurbita* spp. (BGC 512, BGC 527, BGC 531, BGC 537, BGC 552, BGC 553, BGC 565, BGC 566, BGC 571, BGC 578, BGC 586, BGC 682 e BGC 684) from the Active Cucurbit Germplasm Bank from Semi Arid Embrapa Center, Petrolina, PE. Eight plants from each pumpkin access were inoculated with each one of the virus: *Papaya ringspot virus* type watermelon (PRSV-W), *Watermelon mosaic virus* (WMV) and *Zucchini*

yellow mosaic virus (ZYMV). The inoculated plants were maintained at greenhouse conditions and evaluated for their symptom reactions, and the possible virus infections were confirmed by *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) against antisera specific for PRSV-W, WMV e ZYMV. Neither one of the pumpkin accesses was immune or extreme resistant to neither one of the viruses. Only three accesses presented mild mosaic when inoculated with PRSV-W, but 53% of the accesses were highly susceptible to this virus. The most severe symptoms were observed on those accesses inoculated with ZYMV and 85% of the accesses showed to be highly susceptible. On the other hand, the pumpkin accesses inoculated with WMV presented the mildest symptoms, indicating that 31% of them were tolerant and 23% were moderately resistant. The identification of source of resistance in cultivated cucurbit species is very important for production of resistant cultivars to control diseases caused by virus from the genus *Potyvirus*. The pumpkin accesses that showed to be resistant to PRSV-W and WMV constitute promising source of resistance for genetic cucurbit program for production of resistant cultivar.

Keywords: *Cucurbita* spp., PRSV-W, WMV, ZYMV, symptomatology.

O Nordeste brasileiro possui grande potencial para produção de diferentes espécies de cucurbitáceas, destacando-se a melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai, o melão (*Cucumis melo* L.) e a abóbora (*Cucurbita* spp.), dadas às condições favoráveis de clima e solo da região (Oliveira *et al.*, 2002). As abóboras possuem significativa importância socioeconômica, principalmente, na agricultura familiar, pela sua rusticidade, valor nutricional, conservação pós-colheita e utilização dos frutos refugos ou da produção excedente na alimentação animal. Além disso, fazem parte da alimentação básica das populações de várias regiões do país (Dias, 2006).

Entre as diversas doenças que se manifestam sobre as cucurbitáceas, as viroses afetam gravemente a qualidade e a quantidade dos frutos, representando um dos fatores mais limitantes para o seu cultivo (Lima *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2012). Mais de 20 vírus podem infetar naturalmente plantas desta família (Finetti-Sialer *et al.*, 2012), sobressaindo-se aqueles pertencentes ao gênero *Potyvirus*: vírus da mancha anelar do mamoeiro (*Papaya ringspot virus* type watermelon – PRSV-W), vírus do mosaico da melancia (*Watermelon mosaic virus* - WMV) e vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (*Zucchini yellow mosaic virus* - ZYMV), todos de importância econômica para as cucurbitáceas pela interferência nos cultivos do meloeiro, da melancia e da aboboreira. A patologia dessas espécies e dos vírus, de um modo geral, pode ser observada por uma série de sintomas, que incluem mosqueado, mosaico, clorose, deformação foliar e de frutos (Oliveira *et al.*, 2000; King *et al.*, 2012).

BARBOSA GS; NASCIMENTO AKQ; LIMA FR; LIMA JAA; DIAS RCS. 2012. Reação de acessos de *Cucurbita* spp. a vírus do gênero *Potyvirus*. Horticultura Brasileira 30: S2161-S2168.

As perdas na produção em detrimento das infecções causadas por vírus, que podem atingir até 100%, e os graus de incidência já foram estimados em várias regiões, inclusive no Nordeste brasileiro (Oliveira *et al.*, 2000; Ramos *et al.*, 2003). A forma mais eficiente utilizada para o controle de vírus tem sido a resistência genética de cultivares, sendo, portanto, importante a avaliação de genótipos visando a identificação de fontes de resistência e sua transferência para tipos comerciais como forma alternativa de controle (Oliveira *et al.*, 2002). Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivo a avaliação das reações sintomatológicas de acessos de *Cucurbita* spp. quanto à inoculação com vírus do gênero *Potyvirus*, visando a identificação de possíveis fontes de resistência.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos, entre os meses de fevereiro e março do ano de 2012, em casa-de-vegetação do Laboratório de Virologia Vegetal (LabVV), do Centro de Ciências Agrárias (CCA), da Universidade Federal do Ceará (UFC). Foram avaliados 13 acessos de *Cucurbita* spp. (BGC 512, BGC 527, BGC 531, BGC 537, BGC 552, BGC 553, BGC 565, BGC 566, BGC 571, BGC 578, BGC 586, BGC 682 e BGC 684), provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Cucurbitáceas da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

O plantio foi realizado em bandejas de isopor (128 células), utilizando-se de substrato estéril para hortaliças, colocando-se uma semente por célula. O transplântio das mudas para vasos de plástico contendo uma parte de esterco e duas de solo foi feito aos oito dias após a semeadura, quando essas apresentaram a primeira folha definitiva. Para cada acesso foram utilizados dois vasos contendo quatro plantas e um com duas plantas saudáveis como 'testemunhas'.

As plantas dos acessos de *Cucurbita* spp. foram inoculadas a partir do extrato vegetal de plantas infetadas com PRSV-W, WMV e ZYMV, nas folhas cotiledonares expandidas, em torno de 10 dias após a semeadura. Os extratos contendo os vírus foram obtidos a partir da maceração de tecido foliar infetado na proporção de 1,0 g de tecido para 2,0 ml de tampão fosfato de potássio 0,05 M e pH 7,5. Pequena quantidade de abrasivo (carborundum) foi adicionada aos extratos após filtrados em gaze. Posteriormente, as gazes embebidas com os extratos de plantas infetadas foram

friccionadas na superfície adaxial dos cotilédones das plantas sadias. Os isolados de vírus utilizados na presente pesquisa pertencem ao banco ativo de vírus do LabVV e foram obtidos de espécies vegetais naturalmente infetadas, em campos de produção de melão e/ou melancia dos estados do Ceará (PRSV-W), Rio Grande do Norte (ZYMV), Bahia e Pernambuco (WMV) (Oliveira *et al.*, 2000).

Foram realizadas seis avaliações quanto às reações sintomatológicas a cada dois dias. Os sintomas foram classificados como: ML= mosaico leve; M= mosaico; MS= mosaico severo; B= bolhosidade e DF= deformação foliar. As plantas foram classificadas quanto ao comportamento em: I= imune (extrema resistência); R= resistente (restrição do vírus ao conjunto de células inoculadas por reação da planta); T= tolerante (replicação e distribuição sistêmica do vírus, com sintomas fracos de mosaico leve ou infecção latente sem a presença de sintomas); S= susceptível (replicação e distribuição sistêmica do vírus, com sintomas de mosaico ou mosaico severo); AS= altamente susceptível (replicação e distribuição sistêmica do vírus, com sintomas de mosaico severo acompanhado de deformação foliar e/ou necrose sistêmica).

Aos 22 dias após a inoculação, amostras das plantas foram testadas contra antissoros específicos para PRSV-W, WMV e ZYMV por *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) indireto, a fim de confirmar as possíveis replicação e distribuição sistêmica dos vírus. Poços de placas foram cobertos com 100 µl de extratos obtidos a partir de folhas comprovadamente infetadas com cada vírus (antígeno homólogo), de folhas de plantas sadias (testemunhas) e com as devidas amostras a serem testadas. Os extratos foram preparados em tampão carbonato, pH 9,6, diluídos na proporção de 1:10 (p/v) e os antissoros específicos para os respectivos vírus, previamente absorvidos com extrato de tecido sadio, foram diluídos na proporção de 1:1.000. Após incubação (37 °C por 1 h), foram realizadas três lavagens com PBS-Tween, ficando a solução nos poços por 3 min em cada lavagem, e em seguida, uma lavagem rápida com água destilada. Após a secagem das placas, adicionou-se aos orifícios 100 µl do antissoro correspondente. As placas foram incubadas novamente a 37 °C por 1 h e, logo depois, submetidas a mais três lavagens com PBS-Tween. Após secagem, adicionou-se 100 µl de imunoglobulina G (IgG) de cabra anti-IgG de coelho conjugada à enzima fosfatase alcalina. Mais uma vez as placas foram incubadas (37 °C por 1 h) e depois lavadas com PBS-Tween e com água destilada. Por último, adicionou-

se 100 µl de substrato p-nitrofenil fosfato aos orifícios. Após 20 min, realizou-se a primeira leitura das placas em aparelho de leitura de ELISA ("Labsystems Multiskan MS") e após 20 min, uma segunda leitura, utilizando-se o comprimento de onda de 405 nm. De acordo com o critério adotado para as análises, foram consideradas positivas as leituras que corresponderam ao dobro dos valores de absorvância registrados para os extratos de plantas sadias que foram utilizadas como testemunhas (Ramos *et al.*, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nas reações sintomatológicas e nos resultados sorológicos, verificou-se que os acessos de abóbora não apresentaram imunidade ou extrema resistência a nenhum dos vírus testados: PRSV-W, WMV e ZYMV (Tabela 1). A susceptibilidade dos acessos foi verificada por meio da expressão de sintomas, que variaram de mosaico leve a mosaico severo, bolhosidade e deformação foliar e pela confirmação da presença dos vírus nas plantas por meio de ELISA indireto.

Apenas três acessos apresentaram mosaico leve quando inoculados com PRSV-W, sendo que 53% das plantas foram consideradas altamente susceptíveis. Mesmo sendo menos severo quando comparado ao ZYMV, o PRSV-W é considerado fator limitante na produção de diversas cucurbitáceas, principalmente quando a infecção ocorre no início do ciclo (Oliveira *et al.*, 2000).

Os sintomas mais severos foram observados entre os acessos inoculados com ZYMV, onde 85% deles foram altamente susceptíveis, sendo os sintomas semelhantes aos constatados por Ramos *et al.* (2003). Os sintomas foram bastante severos, causando além de mosaico, intensa bolhosidade e deformação foliar. Segundo Yakoubi *et al.* (2008), o ZYMV pode ocasionar sintomas muito mais severos nos frutos e nas folhas de espécies de cucurbitáceas do que o PRSV-W ou o WMV. Essa severidade já foi constatada em infecções simples e dupla, sendo a doença considerada uma das viroses mais destrutivas em cucurbitáceas, ocorrendo, tanto nos trópicos, como em regiões temperadas (Oliveira *et al.*, 2000).

Os acessos inoculados com WMV apresentaram sintomas bem menos severos que os ocasionados por PRSV-W e por ZYMV, observando-se tolerância e resistência moderada em 31% e 23% dos acessos, respectivamente. No entanto, o WMV pode ocasionar mosqueado, mosaico e deformação foliar e dos frutos, sendo os sintomas

BARBOSA GS; NASCIMENTO AKQ; LIMA FR; LIMA JAA; DIAS RCS. 2012. Reação de acessos de *Cucurbita* spp. a vírus do gênero *Potyvirus*. *Horticultura Brasileira* 30: S2161-S2168.

passíveis de serem confundidos com aqueles induzidos por outros vírus que infetam cucurbitáceas, inclusive o ZYMV (Oliveira *et al.* 2000). O WMV possui forte relacionamento sorológico com o ZYMV, enquanto o PRSV-W é sorologicamente distinto dos demais (Lima *et al.*, 1997). O desenvolvimento de cultivares de cucurbitáceas com resistência a vírus, sobretudo àqueles pertencentes ao gênero *Potyvirus* é, normalmente, um processo complexo e demorado. Como etapa inicial, faz-se necessária a identificação de fontes de resistência para posterior avaliação em programas de melhoramento de cucurbitáceas que visem o desenvolvimento de cultivares resistentes a um ou mais vírus do gênero *Potyvirus*. Nesse sentido, os acessos de abóbora BGC 586, BGC 512 e BGC 527 que se mostraram resistentes ao PRSV-W e os acessos BGC 537, BGC 552, BGC 553 e BGC 682 resistentes ao WMV constituem fontes promissoras de resistência para programas de melhoramento genético de abóbora.

REFERÊNCIAS

DIAS RCS; QUEIROZ MA; FONSECA MAJ; BARBOSA GS; SILVA CMJ. 2006. Coleta e caracterização preliminar de acessos de *Cucurbita* spp. no Estado de Pernambuco. In: ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 17, 2006, Recife. (CD ROM).

FINETTI-SIALER MM; MASCIA T; CILLO F; VOVLAS C; GALLITELLI D. 2012. Biological and molecular characterization of a recombinant isolate of *Watermelon mosaic virus* associated with a watermelon necrotic disease in Italy. *European J. Plant Pathology* 132: 317-322.

LIMA JAA; NASCIMENTO AKQ; RADAELLI P; PURCIFULL DE. 2012. Serology Applied to Plant Virology. In: Moslih Al-Moslih. (Org.). *Serological Diagnosis of Certain Human, Animal and Plant Diseases*. Rijeka, Croatia: InTech, 1. p.71-94.

LIMA JAA; QUEIROZ MA; RAMOS NF; GONÇALVES MFB. 2002. Sintomas atípicos em frutos de meloeiro e de melancia ocasionados por *Watermelon mosaic virus*. *Fitopatologia Brasileira* 27, n.4: 546-551.

LIMA JAA; VALE CC; OLIVEIRA VB. 1997. Viruses that infect cucurbits in the Northeast of Brazil. *Virus Reviews and Research* 2: 128-130.

OLIVEIRA VB; QUEIROZ MA; LIMA JAA. 2002. Fontes de resistência em melancia aos principais potyvirus isolados de cucurbitáceas no nordeste Brasileiro. *Horticultura Brasileira* 20: 589-592.

BARBOSA GS; NASCIMENTO AKQ; LIMA FR; LIMA JAA; DIAS RCS. 2012. Reação de acessos de *Cucurbita* spp. a vírus do gênero *Potyvirus*. *Horticultura Brasileira* 30: S2161-S2168.

OLIVEIRA VB; LIMA JAA; VALE CC; PAIVA WO. 2000. Caracterização biológica e sorológica de isolados de *potyvirus* obtidos de cucurbitáceas no Nordeste Brasileiro. *Fitopatologia Brasileira* 25: 628-636.

RAMOS NF; LIMA JAA; GONÇALVES MFB. 2003. Efeitos da interação de potyvirus em híbridos de meloeiro, variedades de melancia e abobrinha. *Fitopatologia Brasileira* 28: 199-203.

YAKOUBI S; DESBIEZ C; FAKHFAKH H; WIPF-SCHEIBEL C; FABRE F; PITRAT M; MARRAKCHI M; LECOQ H. 2008. Molecular, biological and serological variability of *Zucchini yellow mosaic virus* in Tunisia. *Plant Pathology* 57: 1146-1154.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, ao CNPq e a FUNCAP pela concessão de bolsas.



Tabela 1. Sintomas, resultado sorológico e comportamento de acessos de *Cucurbita* spp. aos vírus *Papaya ringspot virus* type watermelon (PRSV-W), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) e *Watermelon mosaic virus* (WMV), em casa de vegetação [Symptoms, serological results and behavior of *Cucurbita* spp. access in relation to PRSV-W, ZYMV and WMV in greenhouse experiments]. Fortaleza, UFC, 2012.

Amostra	PRSV-W			ZYMV			WMV		
	Sintomas ¹	Sorologia	Comportamento ²	Sintomas	Sorologia	Comportamento	Sintomas	Sorologia	Comportamento
BGC 512	ML	+	R	MS/B/DF	+	AS	M	+	T
BGC 527	ML	+	R	MS/B/DF	+	AS	M	+	T
BGC 531	MS/B	+	AS	MS/B/DF	+	AS	MS/B	+	AS
BGC 537	M/DF	+	AS	MS/DF	+	AS	ML	+	R
BGC 552	MS/DF	+	AS	MS/B/DF	+	AS	ML	+	R
BGC 553	M/B/DF	+	AS	MS/DF	+	AS	ML	+	R
BGC 565	MS/DF	+	AS	MS/B/DF	+	AS	MS	+	S
BGC 566	MS/B/DF	+	AS	MS/B/DF	+	AS	MS/B	+	S
BGC 571	MS	+	S	MS	+	S	MS/B	+	S
BGC 578	MS	+	S	MS/B/DF	+	AS	MS	+	S
BGC 586	ML	+	R	MS	+	S	M	+	T
BGC 682	MS	+	S	MS/B/DF	+	AS	ML	+	R
BGC 684	MS/B	+	AS	MS/B/DF	+	AS	MS	+	S

¹ML= mosaico leve; M= mosaico; MS= mosaico severo; B= bolhosidade; DF= deformação foliar; ²R= resistente; T= tolerante; S= susceptível; AS= altamente susceptível [ML= mild mosaic; M= mosaic; MS= severe mosaic; B= blistering; DF= leaf deformation; ²R= resistant; T= tolerant; S= susceptible; AS= highly susceptible]

